



HAL
open science

Thérapie ciblée anti-OX40 Ligand dans des modèles murins de Sclérodermie systémique

Muriel Elhai

► **To cite this version:**

Muriel Elhai. Thérapie ciblée anti-OX40 Ligand dans des modèles murins de Sclérodermie systémique. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB077 . tel-01409707

HAL Id: tel-01409707

<https://theses.hal.science/tel-01409707>

Submitted on 6 Dec 2016

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 Paris Descartes

Ecole doctorale Bio SPC

Thérapie ciblée anti-OX40 Ligand dans des modèles murins de Sclérodermie systémique

Par Muriel ELHAI

Thèse de doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

Dirigée par Yannick ALLANORE

Présentée et soutenue publiquement le 18 novembre 2015

JURY

Mr le Pr. Christian JORGENSEN	Rapporteur
Mr le Pr. Carlo CHIZZOLINI	Rapporteur
Mr le Dr. Emmanuel DONNADIEU	Examineur
Mr le Dr. Gilles CHIOCCHIA	Examineur
Mr le Pr. Bruno CRESTANI	Examineur
Mr le Pr. Yannick ALLANORE	Directeur de thèse

RESUME

La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie auto-immune orpheline. Elle est caractérisée par une atteinte microvasculaire et une fibrose touchant la peau et les organes internes. La ScS est une maladie sévère avec une surmortalité significative. Jusqu'à présent, aucun essai thérapeutique n'a permis de démontrer qu'un produit ait une action anti-fibrosante et améliore significativement le pronostic de cette maladie.

La physiopathologie de la ScS fait intervenir une combinaison de facteurs environnementaux et de facteurs de susceptibilité génétique. Récemment *TNFSF4* a été identifié comme facteur de susceptibilité génétique à la ScS. *TNFSF4* code pour OX40 ligand (OX40 L). Le couple OX40-OX40L est impliqué dans la co-stimulation tardive des lymphocytes T, mais aussi dans la genèse et la réactivation de lymphocytes T mémoires et dans la prolifération et différenciation des lymphocytes B. Bloquer OX40L s'est avéré prometteur dans des modèles précliniques d'encéphalomyélite auto-immune, de polyarthrite rhumatoïde, de colite inflammatoire, de réaction du greffon contre l'hôte et d'asthme. Par ailleurs, ce blocage permettrait d'inhiber uniquement les lymphocytes T pathogènes récemment activés et d'éviter ainsi une immunosuppression globale, contrairement aux biothérapies actuellement disponibles en rhumatologie.

L'observation d'une surexpression de la protéine OX40L dans le derme des patients ScS nous a incités à étudier le rôle d'OX40L dans la ScS. L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier l'efficacité d'une thérapie ciblée anti-OX40L dans la ScS, par l'utilisation de modèles murins complémentaires de la maladie.

Nous avons tout d'abord cherché à optimiser le modèle de fibrose induite par la bléomycine, qui est un modèle bien validé, utilisé en général en première intention pour évaluer des anti-fibrosants potentiels, en particulier lorsqu'il s'agit de cibles inflammatoires. Nous avons également étudié si l'échographie à haute fréquence pouvait apporter une aide à l'évaluation cutanée chez ces animaux, mais nos résultats n'ont pas permis de démontrer une place spécifique à cet outil dans ce contexte. Les approches anti-OX40L ont débuté par l'utilisation de souris KO qui ont montré des résultats prometteurs dans le modèle induit par la bléomycine. Ensuite, des approches pharmacologiques ont été développées en utilisant un anticorps monoclonal neutralisant anti-OX40L dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine. L'intérêt du blocage d'OX40L a été conforté par la démonstration de propriétés non seulement de prévention mais aussi curatives contre la fibrose établie. L'étude des voies modulées par OX40L a mis en avant l'infiltrat inflammatoire et le relargage de cytokines pro-fibrotiques (IL-6 et TNF- α). De plus, le blocage d'OX40L semblait prévenir la fibrose dermique en inhibant l'activation des fibroblastes dépendant de la voie de signalisation AP-1.

Le rôle d'OX40L dans la phase inflammatoire du remodelage matriciel a été abordé par l'utilisation du modèle de cicatrisation cutanée. En revanche, le blocage d'OX40L n'a pas eu d'effet dans le modèle de fibrose non-inflammatoire qui caractérise les souris Tsk-1.

Etant donné le rôle clé en clinique de l'atteinte d'organe, notre approche a été enrichie par l'utilisation de souris transgéniques Fra2, qui sont un nouveau modèle de ScS caractérisé par une fibrose pulmonaire inflammatoire et une HTAP. L'effet de l'anticorps anti-OX40L a été remarquable dans ce contexte avec au scanner et à l'histologie une réduction significative de la fibrose pulmonaire, du remodelage vasculaire et des signes d'HTAP.

Enfin, l'étude longitudinale des sérums collectés dans notre cohorte de patients a montré que la forme soluble d'OX40L pourrait être un potentiel biomarqueur dans la ScS pour identifier les patients à risque de progression sévère.

Ainsi, nos résultats mettent en lumière le rôle d'OX40L dans la ScS et suggèrent que son blocage pourrait être un traitement potentiel dans la ScS et peut-être dans d'autres maladies fibrosantes. Ce travail met en exergue la relation inflammation-fibrose dans la physiopathologie de la ScS.

Ce travail de thèse souligne l'intérêt de combiner plusieurs modèles animaux dans l'approche préclinique de la ScS.

Mots-clés : Sclérodémie systémique, fibrose, auto-immunité, OX40 ligand, modèles murins

Targeted therapy against OX40 ligand in murine models of systemic sclerosis

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune orphan disease which is characterized by alterations of the microvasculature and fibrosis affecting the skin and internal organs. SSc is the most severe connective tissue disease associated with a high risk of mortality. Until now, there is no effective treatment to counteract the fibrotic process and to improve the prognosis of this disease.

SSc results from the combination of genetic and environmental factors. *TNFSF4* was recently identified as a genetic risk factor for SSc. *TNFSF4* encodes OX40L, which is involved in late T-cell co-stimulatory signals, but also in generation and reactivation of memory T cells and promotion of plasma cell phenotype. OX40L blockade was effective in reducing clinical symptoms in several animal models of autoimmune and inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, colitis, asthma or graft-versus-host-disease. The anti-OX40L antibody presents the advantage of a targeted therapy against pathogenic recently activated T cells, which might not expose patients to increased risk of infections, unlike other conventional immunosuppressants.

Following the observation of an increased expression of OX40L in fibrotic skin in SSc-patients, we aimed to investigate the contribution of OX40L in SSc and to assess the efficacy of a targeted therapy against OX40L in SSc, using complementary experimental mouse models. First, we characterized the optimum *in vivo* parameters required for the successful induction of dermal fibrosis in the widely used bleomycin-induced dermal fibrosis mouse model, which is usually the first step in most of pharmacological studies assessing anti-fibrotic therapies. We also aimed to determine whether ultrasonography could be used to assess skin fibrosis in this model, but our results showed that it was not efficient enough to assess dermal thickening in this model. Invalidation of OX40L prevented dermal fibrosis in the bleomycin mouse model. Then pharmacologic approaches, using a monoclonal anti-OX40L antibody, demonstrate that blockade of OX40L not only prevented dermal fibrosis, but also induced regression of established fibrosis in this model. We also showed that OX40L acts directly on both dermal fibroblasts and inflammatory cells and on cytokine release (IL-6, TNF- α), by regulating NF kappa B and AP 1 pathways. We observed that OX40L inhibition interfered with early inflammatory stages of matrix remodeling using the excisional wound healing mouse model. Conversely, blocking OX40L did not display antifibrotic properties in the non-inflammatory Tsk-1 mouse model.

Given that interstitial lung involvement and pulmonary arterial hypertension (PAH) are key prognostic factors in SSc, we aimed to assess the effects of OX40L pharmacological inhibition in a new murine model: the fra-2 transgenic mice, which are characterized by both fibrosing alveolitis and PAH. In this model, using both CT-scan and histology, we demonstrated that mice treated by anti-OX40L antibody were markedly protected from fibrosing alveolitis and vessel remodeling leading to PAH.

Furthermore, longitudinal analyses of our cohort of SSc-patients showed that soluble OX40L is a promising serum biomarker to predict the worsening of lung and skin fibrosis. Altogether, our results show that OX40L is as an attractive target in inflammation-driven fibrosis. This work also strengthens the relation between inflammation and fibrosis in SSc-pathogenesis. This work underlines advantages of combination of several animal models in translational approach to SSc.

Key words: Systemic sclerosis, fibrosis, autoimmunity, OX40 ligand, murine models

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Yannick Allanore pour son encadrement et son accompagnement durant ces quatre années de thèse, pour sa rigueur scientifique, ses remarques pertinentes et son exigence. Tu es pour moi un exemple de médecin chercheur accompli, j'ai beaucoup appris grâce à toi et j'espère que nous continuerons à travailler ensemble sur de beaux projets.

A Monsieur le Professeur Carlo Chizzolini et Monsieur le Professeur Christian Jorgensen pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Vous me faites l'honneur d'apporter à ce travail votre expertise en tant que chercheurs immunologistes et rhumatologues.

A Monsieur le Docteur Emmanuel Donnadiou,

Je suis honorée que vous ayez accepté d'être examinateur de ce travail et d'y apporter vos connaissances sur les lymphocytes T et la matrice extra-cellulaire.

A Monsieur le Docteur Gilles Chiocchia, pour avoir accepté de juger ce travail. Merci pour ton enseignement du modèle murin d'arthrite induite par le collagène. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse durant mon année de Master 2 et mes années de thèse.

A Monsieur le Professeur Bruno Crestani pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Merci d'y apporter votre expertise sur la pneumopathie interstitielle.

A Monsieur le Professeur André Kahan pour m'avoir accueillie dans son service. Je suis heureuse de ce début de clinicat, qui me permet d'approfondir mes connaissances sur la sclérodémie systémique et les rhumatismes inflammatoires chroniques.

A Monsieur le Docteur Jérôme Avouac,

Merci de m'avoir tant appris sur les modèles murins de sclérodémie systémique. Merci de ta gentillesse, de tes conseils et de ta disponibilité.

A tous ceux qui ont participé à ce travail de thèse, notamment à **Olivia Amiar** pour son enthousiasme et son aide sur le modèle murin Fra-2 : ça a été un plaisir pour moi de t'encadrer ; à **Nadira** qui m'a beaucoup aidée sur les techniques d'immunomarquage et le modèle de cicatrisation cutanée et à **Jérémy Sadoine** pour son analyse rigoureuse des scanners qui a beaucoup apporté à l'évaluation pulmonaire des souris fra-2.

Merci à **Maryline Favier** et **Corinne Lesaffre** de la plateforme d'histologie pour leurs nombreuses coupes et inclusions, pour leurs conseils concernant les colorations et les techniques d'immunomarquages.

Merci à la plateforme de microscopie, notamment à **Béatrice Durel** pour ses conseils avisés et à **Thomas Guilbert** qui nous a permis de développer une nouvelle technique d'évaluation de la fibrose.

A la plateforme PIPA, notamment à **Gilles Renault**, **Carmen Marchiol** et **Franck Lager** pour leur collaboration dans le cadre de l'évaluation échographique de nos différents modèles murins.

Merci à **Catherine Chaussain** d'avoir accueilli nos souris à Montrouge pendant de nombreux mois.

Merci à tous mes collègues du laboratoire à Hardy puis à Roussy.

Tout d'abord, un grand merci à **Barbara** qui est devenue au fil des années une amie précieuse. Merci pour ton accueil au labo, pour ton enseignement sur les techniques de biologie cellulaire et de génétique notamment, merci pour tes conseils toujours avisés sur les manip. Merci également pour nos fous rires, les karaokés et nos « balades murines » à Montrouge ou à Cochin...

Merci aux autres membres de la famille Suridermie : **Maeva** et **Maxime**.

Merci aux « Funky girls » du labo (**Clotilde**, **Nada**, **Camélia**, **Emna**, **Nathalie**, **Anne** et **Sonia**) pour les moments sympas passés au labo et à l'extérieur, pour les discussions bébé et mariage.

A mes **amis** pour leur fidélité.

A mes **parents** pour leur soutien, leur amour et leur gentillesse.

A ma **sœur** pour notre complicité sans faille.

Et enfin à mes deux hommes :

A **Fabrice** pour ton soutien logistique, informatique et psychologique pendant ces années de thèse. Merci d'avoir supporté les week-ends et soirées boulot et d'avoir tout mis en œuvre pour que mon travail se passe dans les meilleures conditions possibles. Merci de me rendre si heureuse jour après jour.

A mon petit homme, **Antoine**, qui illumine mes journées. Merci de m'avoir fait découvrir le grand bonheur qu'est la maternité.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	2
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	10
I. FIGURES	10
II. TABLEAUX	12
ABREVIATIONS	13
CHAPITRE 1 : LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE : ASPECTS CLINICO- BIOLOGIQUES	15
I. Epidémiologie	15
1. Critères de classification.....	16
2. Incidence et prévalence	17
3. Pronostic	18
4. Polyautoimmunité.....	20
II. Différentes atteintes.....	22
1. Syndrome de Raynaud.....	22
2. Manifestations cutanées.....	23
3. Manifestations pulmonaires.....	26
4. Manifestations musculo-squelettiques.....	30
5. Manifestations digestives	31
6. La crise rénale sclérodermique	31
III. Les auto-anticorps.....	32
IV. Les traitements.....	34
CHAPITRE 2 : LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE : PHYSIOPATHOLOGIE	35
I. Une maladie multifactorielle	35
1. Les facteurs environnementaux	35
2. Facteurs génétiques.....	36
II. Les différents processus physiopathologiques impliqués	49
1. Vasculopathie	49
2. L'atteinte inflammatoire dysimmunitaire	54
3. La fibrose.....	69
CHAPITRE 3 : LES MODELES ANIMAUX DE SCLERODERMIE SYSTEMIQUE	90

CHAPITRE 4 : THERAPIE CIBLEE ANTI-OX40 LIGAND AU COURS DE LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE	99
I. OX40 Ligand : Présentation et fonctions biologiques	99
1. Introduction	99
2. Induction de l'expression d'OX40-OX40L et mécanismes régulateurs.....	99
3. Voies de signalisation d'OX40-OX40L	101
4. Rôle d'OX40-OX40L dans l'accumulation et la différenciation des lymphocytes T 103	
5. Rôle d'OX40-OX40L dans la fonction et le développement des lymphocytes T régulateurs.....	104
6. Rôle dans la maintenance et la réactivation des LT mémoires.....	104
7. Effets de l'interaction OX40-OX40L sur les cellules non T	106
II. Rôles d'OX40-OX40L dans les maladies inflammatoires et l'auto-immunité	108
III. Pourquoi cibler la voie OX40-OX40L ?.....	111
IV. Premières expériences en thérapie humaine	112
V. OX40-OX40L dans la Sclérodémie systémique	112
OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE	116
CHAPITRE 5 : TRAVAUX ORIGINAUX.....	118
I. Article 1 : Effet combiné du fond génétique et du sexe dans le modèle murin de fibrose dermique induite par la bléomycine.	118
II. Article 2: Intérêt de l'échographie cutanée comme outil de mesure de la fibrose cutanée dans différents modèles animaux de sclérodémie systémique.	132
III. Article 3 : Le blocage d'OX40L protège de la fibrose inflammatoire	142
CHAPITRE 6 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	211
I. Discussion	211
1. Le blocage d'OX40L prévient la fibrose inflammatoire et la vasculopathie.....	211
2. Mécanismes d'action d'OX40L.....	213
3. Les modèles animaux de ScS	217
4. Transposition à la recherche clinique : le blocage d'OX40L : un traitement prometteur de la ScS	219
5. Premières expériences en pathologie humaine	220
II. Perspectives	221
1. Mécanismes impliqués	221
2. Rôle dans la ScS : évaluation dans d'autres modèles murins complémentaires.	223
3. Evaluation du blocage d'OX40L dans d'autres maladies fibrosantes	224

4. Perspectives sur le plan thérapeutique	225
5. Perspectives sur le plan physiopathologique	226
CONCLUSION	227
Annexe 1	228
Annexe 2	246
Annexe 3	252
Annexe 4	258
Annexe 5	264
Annexe 6	274
BIBLIOGRAPHIE	286

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

I. FIGURES

Figure 1 : Biais de sexe selon l'âge au début de la maladie

Figure 2 : Classification de LeRoy

Figure 3 : Causes de mortalité dans la cohorte européenne Eustar

Figure 4 : Polyautoimmunité au cours de la ScS

Figure 5 : Prévalence des différentes atteintes dans la ScS

Figure 6 : Aspects cliniques de la fibrose cutanée

Figure 7 : Score de Rodnan modifié

Figure 8 : Pneumopathie interstitielle non spécifique

Figure 9 : Pneumopathie interstitielle commune

Figure 10 : L'autoimmunité partagée

Figure 11 : Histologie d'un vaisseau au cours de la ScS

Figure 12 : Infiltrat lymphocytaire T dermique au cours de la ScS

Figure 13 : Balance Th1-Th2 au cours de la ScS

Figure 14 : Effet des cellules Th17 sur le fibroblaste chez l'homme

Figure 15 : Rôles du lymphocyte B au cours de la ScS

Figure 16 : Coupe de derme d'un témoin sain observée en microscopie optique par génération de seconde harmonie

Figure 17 : Coupe de derme d'un patient ScS observée en microscopie optique par génération de seconde harmonie

Figure 18 : Origine des myofibroblastes

Figure 19 : Voies de signalisation du TGF- β

Figure 20 : Physiopathologie de la ScS

Figure 21 : Modèle de costimulation OX40-OX40L en 2 temps

Figure 22 : Voies de signalisation d'OX40L

Figure 23 : Effet de l'interaction OX40-OX40L sur le lymphocyte T

Figure 24 : Effet de l'interaction OX40-OX40L sur les cellules non lymphocytes T

Figure 25 : Expression connue d'OX40-OX40L sur les acteurs de la physiopathologie de la ScS

Figure 26 : Génotypage des souris $tsk-1^{+}/tnfsf4^{-/-}$

Figure 27 : Les souris invalidées pour OX40L ne sont pas protégées de la fibrose dans le modèle murin $tsk-1$

Figure 28 : Expression par PCR quantitative d'OX40 et OX40L dans la peau des souris wild type (wt) et Fra-2

Figure 29 : Expression par PCR quantitative d'OX40 et OX40L dans le poumon des souris wild type (wt) et Fra-2

II. TABLEAUX

Tableau 1 : Critères de classification de la ScS ACR/Eular 2013

Tableau 2 : Auto-anticorps spécifiques de la ScS

Tableau 3 : Anomalies intrinsèques des fibroblastes au cours de la ScS

Tableau 4 : Rôle du TGF- β dans la fibrose

Tableau 5 : Médiateurs impliqués dans l'activation extrinsèque des fibroblastes

Tableau 6 : Effet de la modulation de l'interaction OX40-OX40L *in vivo* dans des modèles murins de maladies auto-immunes

ABBREVIATIONS

α -SMA : *alpha-smooth muscle actin*

AP-1: *Activator protein-1*

BAFF: *B-cell activating factor*

CMV: *Cytomégalo virus*

CTGF (CCN2): *Connective tissue growth factor*

DAMPs: *Danger-associated molecular pattern*

DLCO: *Diffusing capacity for carbon monoxide*

DNMT: *DNA methyltransferase*

EGR-1: *Early growth response protein 1*

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERK: *Extracellular-signal-regulated kinases*

ET-1: *Endothéline 1*

EUSTAR: *European Scleroderma Trials and Research group*

FAK: *Focal adhesion kinase*

Fra-2: *Fos-related antigen 2*

GVHD: *Graft-versus-host disease*

HLA: *Human leukocyte antigen*

HTAP: *Hypertension artérielle pulmonaire*

IC 95% : *Intervalle de confiance à 95%*

IFN: *Interféron*

IL: *Interleukine*

MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*

MMP: *Matrix metalloproteinase*

NF κ B: *Nuclear factor kappa B*

NK: *Natural killer*

NO: *Monoxyde d'azote*

OR: *Odds-ratio*

OX40L: *OX40 ligand*

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

PF4: *Platelet factor 4*

PPAR- γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

ScS: *Sclérodemie systémique*

SiRNA: *small interfering RNA*

SNP: *Single nucleotide polymorphism*

TCR: *T-cell receptor*

TGF- β : *Transforming growth factor-beta*

TH1: *T-helper cell type 1*

TH2: *T-helper cell type 2*

TH17: *T-helper cell type 17*

TIMP-1: *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1*

TLR: *Toll-like receptor*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TNFSF4: *Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 4*

Tsk-1: *Tight-skin 1*

uPA: *urokinase-type plasminogen activator*

uPAR: *urokinase-type plasminogen activator receptor*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

WT: *wild type*

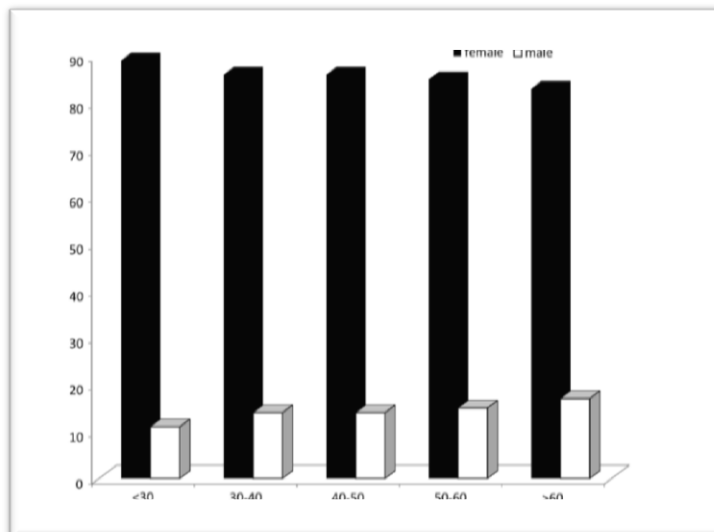
CHAPITRE 1 : LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE : ASPECTS CLINICO-BIOLOGIQUES

I. Epidémiologie

La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie systémique auto-immune appartenant au groupe des maladies du tissu conjonctif, aussi dénommées « connectivites ». Il faut la différencier de la sclérodémie localisée (ou morphée) qui se manifeste par une atteinte cutanée isolée sans atteinte viscérale. La ScS est caractérisée par une atteinte vasculaire précoce puis par une fibrose tissulaire et systémique touchant de nombreux organes dont principalement la peau, le poumon, le cœur, le rein et le tube digestif (1). La ScS touche préférentiellement la femme entre 45 et 64 ans avec 85 à 90% de femmes atteintes dans la cohorte européenne Eustar (European Scleroderma Trials and Research group) et ce quel que soit l'âge au début de la maladie (Figure 1) (2). Dans l'annexe 1, est présenté un travail que j'ai effectué sur le biais de sexe dans la ScS à partir de la cohorte européenne Eustar, afin de déterminer si les caractéristiques cliniques et le pronostic différaient entre les hommes et les femmes.

Figure 1 : Biais de sexe selon l'âge au début de la maladie

Extrait de Elhai M et al. Ann Rheum Dis 2014 (2)



Cette figure représente la distribution de la maladie par âge et par sexe. En abscisses, figure l'âge de début, tandis que l'axe des ordonnées correspond au pourcentage d'hommes et de femmes. La colonne noire représente les femmes et la blanche les hommes.

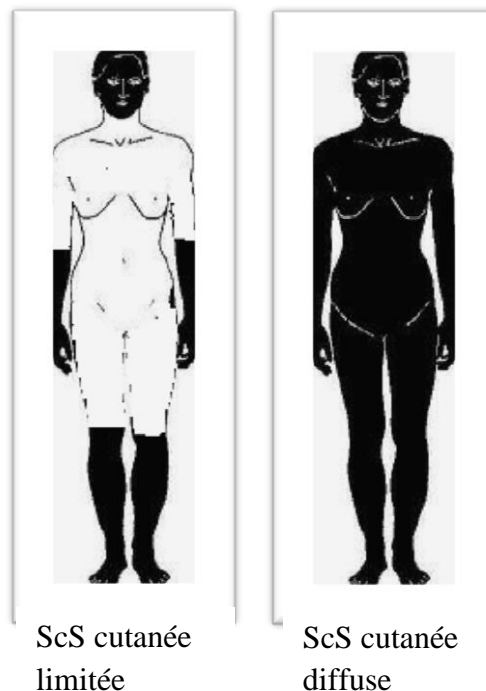
1. Critères de classification

De nouveaux critères ACR/EULAR ont été récemment validés pour permettre un diagnostic précoce de ScS, avant un stade de fibrose avancée (3,4) (Tableau 1). Ces critères viennent remplacer les critères ACR 1980 qui manquaient de sensibilité, notamment pour la détection des formes précoces et cutanées limitées de la maladie (5).

Deux principales formes cliniques de ScS ont été individualisées selon le maximum d'extension cutanée dans la classification proposée par LeRoy (Figure 2) (3) : les formes cutanées limitées sont caractérisées par une sclérose du visage et de la partie distale des membres ne remontant pas au-dessus des coudes ni au-dessus des genoux ; et les formes cutanées diffuses représentent 30 à 40% des patients et touchent le tronc et la racine des membres. La répartition est environ de 55% de formes cutanées limitées, 35% de formes cutanées diffuses et 10% des patients n'ont pas d'atteinte cutanée (6). Les formes cutanées diffuses sont caractérisées par des atteintes viscérales plus précoces et plus graves que les formes cutanées limitées.

Figure 2 : Classification de Leroy

D'après LeRoy EC et al. J Rheumatol 1988 (3)



2. Incidence et prévalence

La ScS est une maladie orpheline, comme l'attestent les données de prévalence comprises entre 7 et 489 cas par million d'habitants selon la période étudiée, la zone géographique et la méthodologie des études (7). Son incidence est comprise entre 0,6 et 122 cas par million d'habitants par an. Il existe de grandes variations de prévalence selon la zone géographique considérée avec une prévalence plus élevée aux Etats-Unis et en Australie qu'au Japon et en Europe, avec, par ailleurs, en Europe un gradient Nord-Sud (7). En France, la prévalence a été estimée par une étude en Lorraine à 132 cas par million d'habitants (8). Une autre étude plus ancienne, réalisée en Seine-Saint-Denis, l'avait estimée à 158 cas par million d'habitants (9). Les études longitudinales ont montré une augmentation de la prévalence de la maladie au cours du temps avec une prévalence qui semble doubler en 10 ans (10,11). Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette augmentation : une amélioration des performances diagnostiques grâce notamment à une meilleure information des médecins, une amélioration de la survie mais aussi une réelle augmentation de la prévalence de la maladie, possiblement en lien avec des facteurs environnementaux. L'existence d'un facteur environnemental est suggéré par la mise en évidence de foyers de surprévalence dans certaines régions : à titre d'exemple, à proximité des aéroports de Londres et de Rome (12,13).

Tableau 1 : Critères de classification de la ScS ACR/EULAR 2013

D'après Van Den Hoogen F. et al. Ann Rheum Dis 2013 (4)

Domaines	Critères ^(a)	Valeur
Epaissement cutané des doigts des 2 mains (remontant jusqu'aux articulations métacarpo-phalangiennes) <i>(critère suffisant)</i>	-	9
Epaissement cutané des doigts <i>(ne compter que le score le plus élevé)</i>	Doigts boudinés	2
	Sclérodactylie	4
Lésions digitales des pulpes <i>(ne compter que le score le plus élevé)</i>	Ulcère pulpaire	2
	Cicatrice d'ulcère	3
Télangiectasies	-	2
Anomalies capillaroscopiques	-	2
Hypertension artérielle pulmonaire ou fibrose pulmonaire <i>(score maximal=2)</i>	-	2
Phénomène de Raynaud	-	3
Auto-anticorps spécifiques	Anti-centromères	3
	Anti-topoisomérases de type I	
	Anti-RNA polymérase III	

^(a)Un score supérieur ou égal à 9 permet une classification en sclérodermie systémique avec une sensibilité et une spécificité respectives de 91 et 92%.

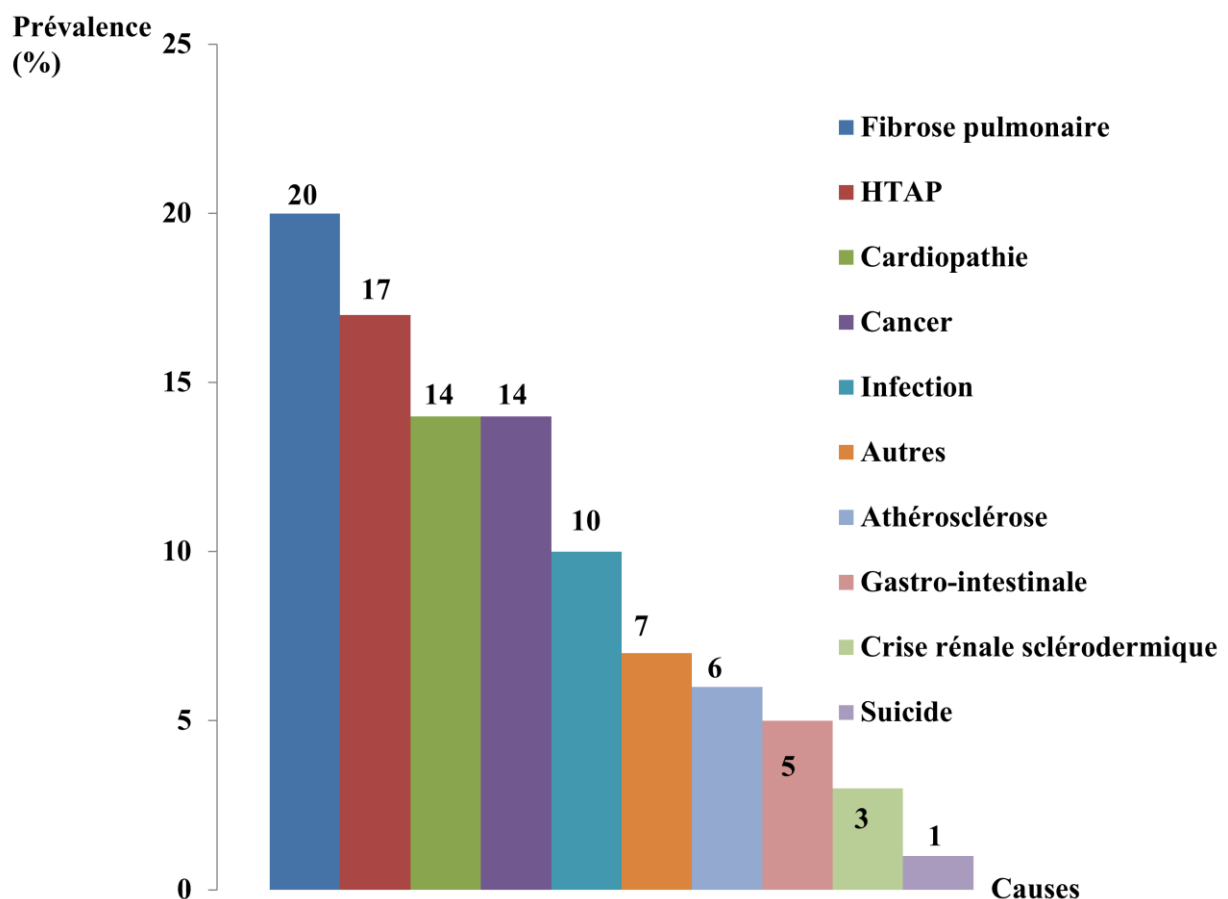
3. Pronostic

La ScS est une maladie sévère : il s'agit de la plus grave des maladies systémiques auto-immunes : dans une méta-analyse récente, la mortalité standardisée mesurée à partir de 9 études contrôlées portant sur 2691 malades a été estimée par le SMR (standardized mortality ratio) comme égale à 3,53 [IC 95% : 3,03-4,11] en comparaison à la population générale appariée pour l'âge et le sexe. Les causes cardiopulmonaires expliquaient 52% des décès observés (14). Nous avons ensuite étudié l'évolution au cours du temps de cette surmortalité et il s'avère qu'elle n'a pas baissé au cours de ces 40 dernières années, suggérant l'absence de progrès en terme de survie dans cette maladie (14). Ces données ne font que refléter que les

résultats obtenus dans les essais thérapeutiques randomisés; en effet, aucun médicament n'a jusqu'à présent prouvé son efficacité pour lutter contre le processus fibrosant systémique de cette maladie.

Nous étudions actuellement les causes de mortalité dans la cohorte européenne EUSTAR en 2014 qui comprend 11381 patients. Au total, 1100 décès ont été enregistrés. Les décès étaient dans 70% des cas attribués directement à la ScS. Les décès étaient liés dans 20% des cas à une fibrose pulmonaire, dans 17% à une hypertension artérielle pulmonaire et dans 14% à des causes cardiaques. Les autres causes de mortalité sont représentées Figure 3 (manuscrit en préparation). Les facteurs prédictifs de mortalité sont en cours d'analyse.

Figure 3 : Causes de mortalité dans la cohorte européenne Eustar
(11381 patients, 1100 décès)



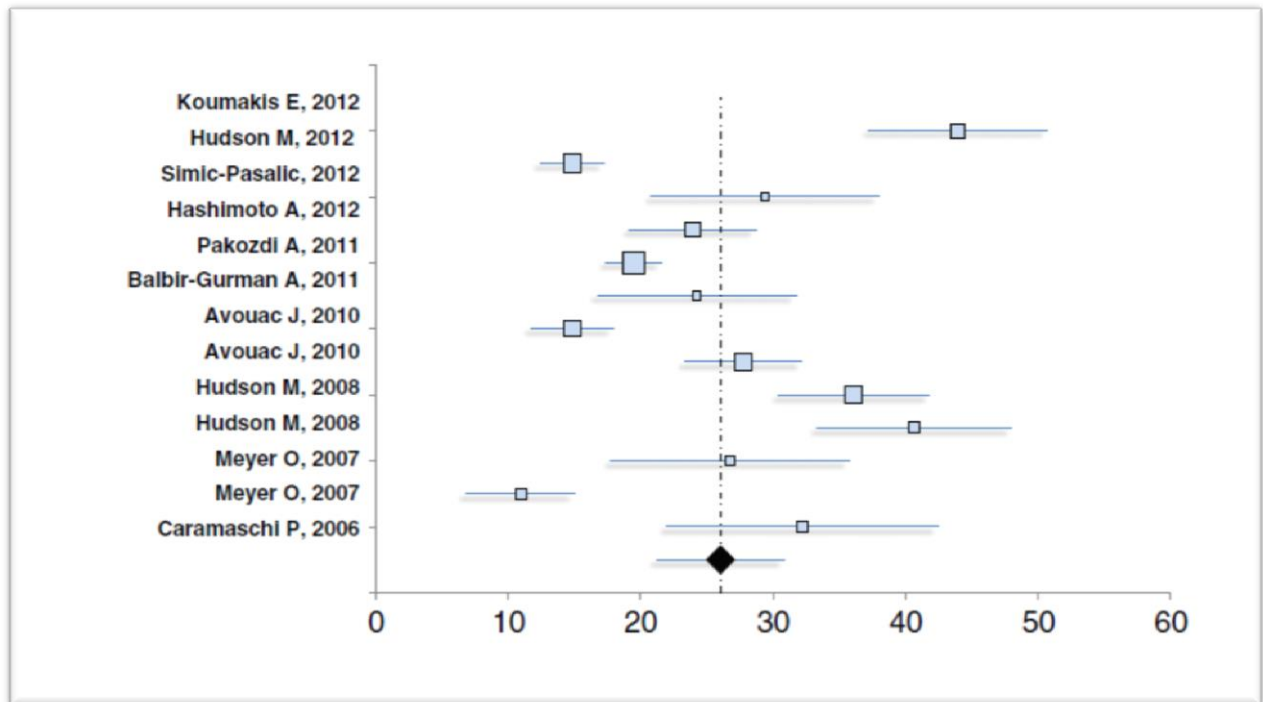
Enfin, il faut garder à l'esprit que la ScS est une maladie extrêmement hétérogène tant sur le plan de sa présentation initiale que dans son évolution. Ainsi, il importe de continuer à chercher et valider des facteurs prédictifs d'évolution vers une atteinte sévère ce qui permettra de définir des groupes de patients avec un pronostic péjoratif qui devront probablement être suivis de manière plus rapprochée et être traités de manière plus agressive. C'est dans cette optique que les travaux actuels, menés notamment par le groupe européen EUSTAR, visent à identifier des biomarqueurs sériques ou génétiques prédictifs d'une évolution vers des atteintes d'organes significatives.

4. Polyautoimmunité

Il existe au cours de la ScS une polyautoimmunité familiale et individuelle. Ainsi, un tiers des apparentés au premier degré de patients atteints de ScS pourraient développer une maladie auto-immune (15,16). De même, les patients atteints de ScS ont un risque accru de développer eux-mêmes une autre maladie auto-immune et cette polyautoimmunité est observée chez 25% des patients (Figure 4). Les maladies les plus fréquemment associées à la ScS sont, par ordre décroissant, la thyroïdite auto-immune, le syndrome de Goujerot Sjögren et la dermatomyosite (17). En annexe 2, est présentée une méta-analyse de plusieurs études épidémiologiques évaluant la prévalence et les facteurs associés à la poly-autoimmunité au cours de la ScS. Ces patients ScS avec polyautoimmunité ont une maladie moins sévère (fréquence plus élevée de femmes, de formes cutanées limitées et de formes associées à la positivité des anticorps anti-centromères) (17,18).

Figure 4: Polyautoimmunité au cours de la ScS

Extrait de Elhai M et al. Autoimmune Rev 2013 (17)



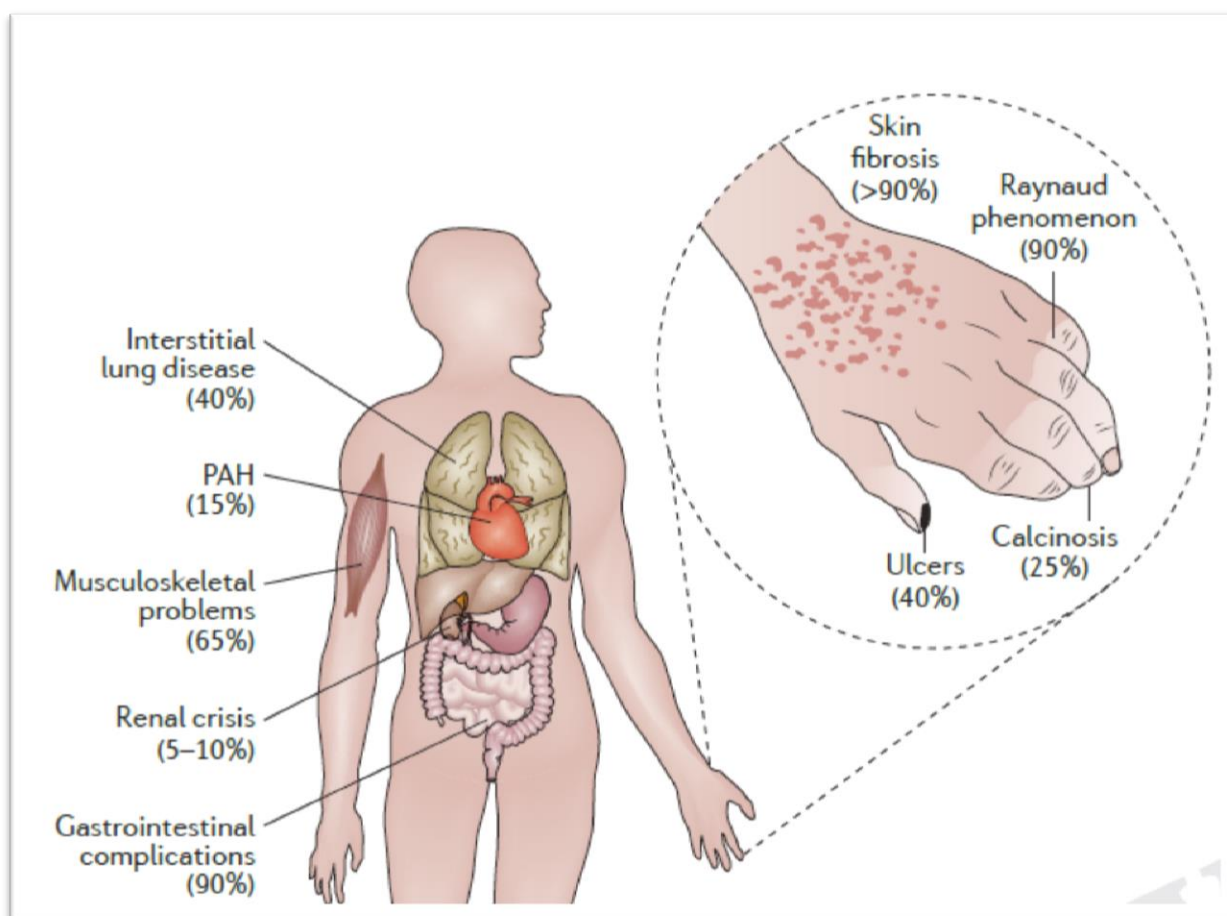
Cette figure résume les résultats de la méta-analyse évaluant la prévalence de la poly-autoimmunité au cours de la ScS. Les différentes études sont présentées en ordonnées par le nom de leur premier auteur et la date de publication de l'étude ; en abscisses figurent les prévalences de poly-autoimmunité obtenues dans chacune de ces études (en pourcentages). Les carrés représentent l'estimation de la prévalence, la taille du carré est proportionnelle au poids donné à l'étude, les lignes représentent les intervalles de confiance à 95% dans chacune des études. Le losange noir correspond à la prévalence combinée des différentes études et la ligne représente l'intervalle de confiance à 95% correspondant.

II. Différentes atteintes

Les différentes atteintes de la ScS ainsi que leurs prévalences respectives sont représentées sur la Figure 5.

Figure 5 : Prévalence des différentes atteintes de la ScS

Extrait de Allanore Y et al. Nature Reviews Disease Primers 2015



1. **Syndrome de Raynaud**

Le syndrome de Raynaud se définit comme une ischémie paroxystique des extrémités, déclenchée par le froid ou le stress. Il est complètement réversible en quelques minutes car il résulte d'un spasme artériolaire. Le syndrome de Raynaud typique comporte 3 phases : blanche (correspondant à l'ischémie), bleue (stase) puis rouge (vasodilatation réactionnelle). Le syndrome de Raynaud est dans 80% des cas primitif (« maladie de Raynaud »), mais dans

la ScS, il s'agit d'un syndrome de Raynaud secondaire. La maladie de Raynaud est très fréquente dans la population générale (5 à 10%), prédomine chez la femme, débute à l'adolescence, touche les 2 mains de façon bilatérale et symétrique, en épargnant les pouces et ne s'accompagne pas de trouble trophique ni de nécrose. Au contraire, le syndrome de Raynaud secondaire débute après 40 ans, touche tous les doigts et peut s'associer à des troubles trophiques (ulcères).

Au cours de la ScS, le syndrome de Raynaud est observé dans plus de 95% des cas et présent dans toutes les formes quelle que soit l'étendue de l'atteinte cutanée. Il s'agit habituellement du premier signe de la maladie, précédant de plusieurs mois à années l'apparition de signes cutanés. Il est particulièrement sévère et peut entraîner des troubles trophiques (ulcères) voire des amputations digitales. Plus de la moitié des patients atteints de ScS auront au cours de leur maladie un épisode d'ulcère digital, dans les $\frac{3}{4}$ des cas dans les 5 premières années d'évolution (19).

2. Manifestations cutanées

La fibrose cutanée est la lésion princeps de la maladie. Elle débute le plus souvent par une sclérodactylie qui correspond à une infiltration scléreuse des doigts qui prennent souvent au départ un aspect boudiné, lorsqu'il existe une part inflammatoire. Puis la sclérose cutanée s'étend de façon centripète avec un aspect souvent œdémateux inflammatoire, parfois prurigineux dans les premières mois de la maladie qui laisse place ensuite à un aspect induré puis atrophique de la peau dans les formes tardives. La figure 6 montre des aspects typiques de fibrose cutanée touchant le visage. L'évolutivité des lésions de sclérose cutanée, qui est un facteur pronostique péjoratif, peut être évaluée par le score de Rodnan modifié (20) (Figure 7). Il s'agit d'un score valide, reproductible et sensible au changement. Il reste le critère de jugement principal de la plupart des essais thérapeutiques.

Figure 6 : Aspects cliniques de la fibrose cutanée



La fibrose cutanée est visible sur ces 2 photographies avec disparition des rides du front, présence de plis radiés péri-buccaux et limitation de l'ouverture buccale. On note sur la première photographie des télangiectasies témoins de l'atteinte vasculaire et sur la deuxième photographie des zones dépigmentées.

Figure 7 : Le score de Rodnan modifié

	DROIT					GAUCHE			
Doigts	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Mains	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Avant-bras	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Bras	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

Face	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Face antérieure du thorax	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Abdomen	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

Cuisses	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Jambes	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Pieds	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

Score total : ... / 51

Evaluation de l'extension de la sclérose cutanée au cours de la sclérodermie systémique
Evaluation clinique de l'épaisseur cutanée par la palpation simple de l'examineur en 17 points:

0 = Absence d'atteinte

1 = Léger épaissement

2 = Epaissement modéré

3 = Epaissement sévère

3. Manifestations pulmonaires

La ScS expose à deux complications principales : la pneumopathie interstitielle diffuse (atteinte parenchymateuse) et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (atteinte vasculaire). Il s'agit des principales causes de mortalité liées à la ScS (21).

a) La pneumopathie interstitielle

La prévalence de la pneumopathie interstitielle au cours de la ScS est très variable selon les séries et selon la méthode utilisée pour la dépister. Le scanner thoracique haute résolution détecte une atteinte pulmonaire interstitielle chez 55 à 90% des patients ScS (24–27), mais si on considère les données autopsiques, près de 100% des patients ScS ont une atteinte pulmonaire (22,23). En revanche, des anomalies aux épreuves fonctionnelles respiratoires sont observées chez seulement 40 à 75% des patients ScS (24).

La pneumopathie interstitielle apparaît le plus souvent dans les premières années suivant le diagnostic (dans les 3 premières années pour 25% des patients) (25). Elle touche plus volontiers les formes cutanées diffuses avec anticorps anti-topoisomérases de type 1. Les signes cliniques sont aspécifiques et incluent une dyspnée d'effort puis de repos et une toux sèche.

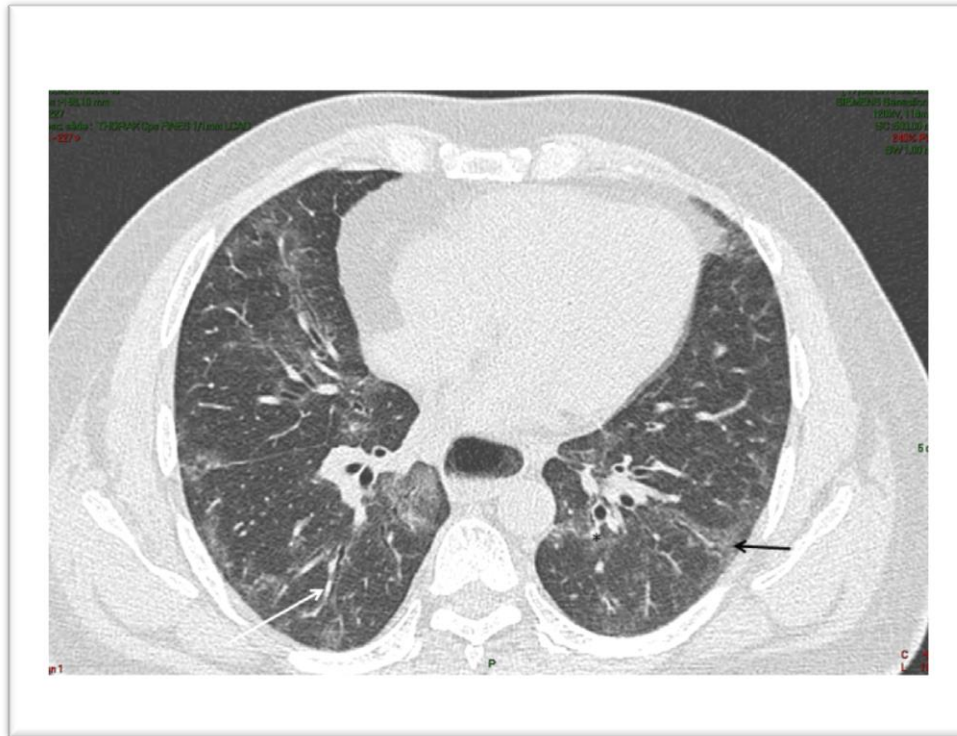
Compte-tenu de sa fréquence et de son pronostic potentiellement défavorable, il est important de dépister cette atteinte. Toutefois, les épreuves fonctionnelles respiratoires et le test de marche de 6 minutes, utilisés en pratique courante sont peu sensibles (26). Le scanner thoracique haute résolution est l'examen le plus sensible pour la dépister (23). L'aspect le plus fréquemment observé est celui d'une pneumopathie interstitielle non spécifique avec une prédominance de lésions en verre dépoli, de réticulations intra-lobulaires et de bronchectasies par traction (Figure 8). Toutefois, un aspect de pneumopathie interstitielle commune ou usuelle, caractérisée par des réticulations intra-lobulaires et des images en « rayons de miel » prédominant dans les lobes inférieurs et dans les régions sous-pleurales, peut être observé (Figure 9) (27). Ces lésions pulmonaires sont le plus souvent irréversibles. En effet, les images en verre dépoli vont regresser au cours du suivi chez seulement 5% des patients. Ainsi, ces lésions en verre dépoli correspondent à des lésions de fibrose déjà établie dans la majorité des cas (28) avec un risque élevé de progression vers un aspect en rayons de miel (29)

Les données histologiques sont inutiles et dangereuses. Elles montrent un aspect de pneumopathie interstitielle non spécifique chez environ 70% des patients versus <30% pour la pneumopathie usuelle (27,30).

L'atteinte pulmonaire interstitielle doit être dépistée et réévaluée régulièrement au cours du suivi du fait de sa gravité potentielle. Toutefois, la répétition des scanners doit être limitée compte-tenu des risques liés aux rayons X (31). De nouvelles approches non ou moins irradiantes, comme l'échographie et le scanner faible dose, ont été développées dans le cadre de l'évaluation de l'atteinte pulmonaire avec des résultats préliminaires prometteurs (32–34). Des épreuves fonctionnelles respiratoires sont également réalisées tous les 6 mois à tous les ans pour rechercher une atteinte des échanges gazeux sous forme d'une diminution de la DLCO (diffusion/transfert du CO) ou d'une atteinte restrictive avec diminution de la capacité pulmonaire totale (et de la capacité vitale forcée) inférieure à 80% de la valeur prédite (21).

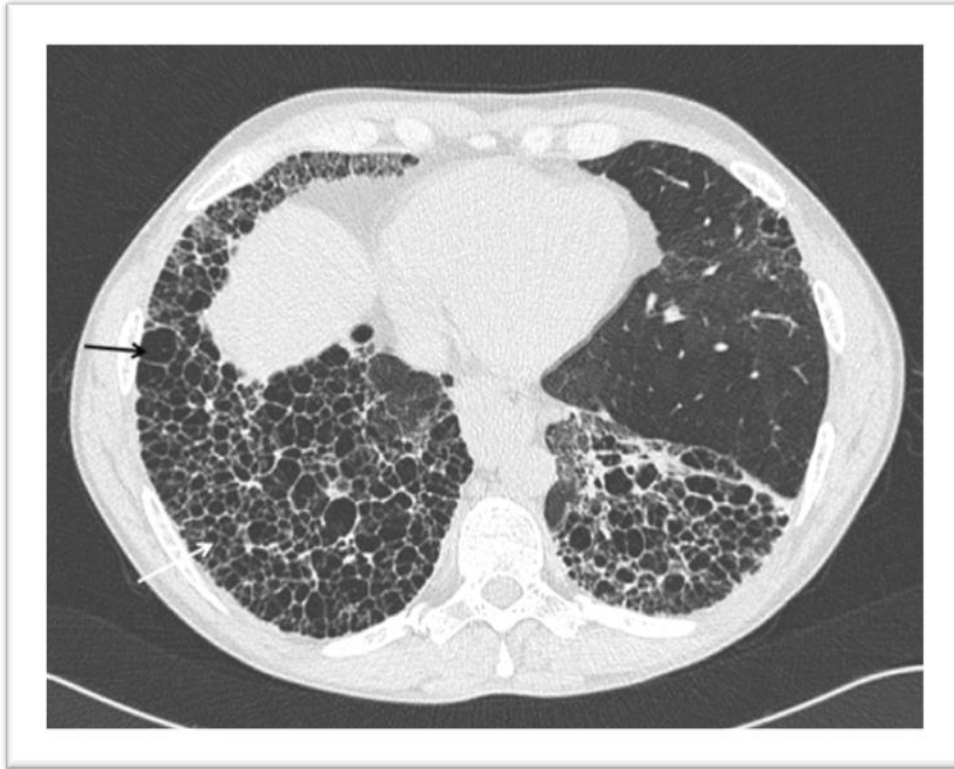
Chez la plupart des patients, l'atteinte interstitielle est modérée et stable au cours du temps. L'identification des facteurs pronostiques péjoratifs est donc essentielle. Les fibroses extensives au scanner thoracique haute résolution (étendue $\geq 20\%$) ou avec un retentissement aux épreuves fonctionnelles respiratoires avec une diminution de la capacité vitale forcée au-dessous de 70% (pour les étendues indéterminées au scanner), ont un risque accru d'aggravation et une diminution de la survie à 5 ans (85%) en comparaison aux formes limitées (60%) (35,36). De même, plusieurs autres facteurs pronostiques péjoratifs ont été identifiés, tels qu'un âge élevé, une origine afro-américaine, la présence d'anticorps anti-topoisomérases de type I et une ScS précoce (évoluant depuis moins de 4 ans) (37–40). L'aggravation des paramètres fonctionnels, comme la capacité vitale forcée est probablement un facteur de mauvais pronostic, même si cela n'a pas encore été documenté dans la ScS.

Figure 8 : Pneumopathie interstitielle non spécifique



*Aspect en verre dépoli au scanner thoracique en haute résolution Flèche noire : plages de verre dépoli ;
flèche blanche : des opacités réticulaires intra-lobaires ; étoile : bronchectasies par traction.*

Figure 9 : Pneumopathie interstitielle commune



Aspect en rayon de miel au scanner thoracique haute résolution avec destructions micro (flèche blanche) et macro-kystiques (flèche noire).

b) Hypertension pulmonaire et l'hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension pulmonaire est définie au cathétérisme cardiaque droit par une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure à 25 mmHg au repos.

Cinq classes d'hypertension pulmonaire ont été définies selon la conférence de Dana Point (41,42) :

- Groupe 1 : Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) définie par une pression capillaire inférieure ou égale à 15 mmHg au cathétérisme cardiaque droit (atteinte pré-capillaire), sans atteinte pulmonaire sévère.
- Groupe 2 : Hypertension pulmonaire avec cardiopathie gauche définie par une pression capillaire supérieure à 15 mmHg (atteinte post-capillaire).
- Groupe 3: Hypertension pulmonaire avec maladie respiratoire et/ou hypoxie. Elle est définie par une atteinte pré-capillaire (pression capillaire inférieure ou égale à 15 mmHg)

associée à une fibrose pulmonaire sévère (avec en général une capacité pulmonaire totale et/ou une capacité ventilatoire forcée inférieures à 60%).

- Groupe 4 : Hypertension pulmonaire avec maladie thrombo-embolique chronique définie par une atteinte pré-capillaire associée à des défauts segmentaires de perfusion du parenchyme pulmonaire au scanner (aspect de perfusion en mosaïque).
- Groupe 5: Hypertension pulmonaire de mécanisme multifactoriel ou incertain

Dans la ScS, l'hypertension pulmonaire est dans la majorité des cas liée à une HTAP (groupe 1), mais il peut s'agir d'une hypertension pulmonaire du groupe 2 ou du groupe 3. L'HTAP complique volontiers les formes cutanées limitées anciennes avec anticorps anti centromères, mais peut également s'observer au cours des formes cutanées diffuses.

Dans la ScS, la prévalence de l'hypertension pulmonaire pré-capillaire (HTAP et hypertension pulmonaire avec maladie respiratoire et/ou hypoxie) a été estimée à 9% dans une méta-analyse, tandis qu'une étude italienne récente l'évalue à 5% (43,44). Il s'agit d'une des principales causes de décès au cours de la ScS. Ainsi, la survie à 3 ans est estimée à 60% dans les HTAP primitives et à 50% dans les hypertensions pulmonaires avec maladie respiratoire (45). De plus, le pronostic de l'HTAP associée à la ScS est plus sombre que celui de l'HTAP idiopathique ou de l'HTAP liée à d'autres causes (toxique, génétique, VIH, autres connectivites...) avec une mortalité 3 fois plus importante (25).

La fréquence et la gravité de cette atteinte imposent donc un dépistage systématique et répété. Le dépistage repose sur le dosage sanguin du NT proBNP, l'échographie cardiaque par voie trans-thoracique et les épreuves fonctionnelles respiratoires avec mesure de la DLCO (46–48). Ce dépistage semble crucial car quelques travaux récents ont montré une amélioration du pronostic, probablement en lien avec un diagnostic et une prise en charge précoces (49–51).

4. Manifestations musculo-squelettiques

L'atteinte de l'appareil locomoteur est fréquente au cours de la ScS ; elle toucherait 46 à 97% des patients (52).

L'atteinte musculo-squelettique se manifeste le plus souvent par des arthralgies inflammatoires; mais des synovites sont observées cliniquement chez 16% des patients dans la cohorte européenne Eustar (52,53). Toutefois, l'évaluation clinique de l'état articulaire est rendue difficile par la sclérose cutanée, les contractions des doigts en flexion et l'aspect boudiné des doigts. C'est pourquoi, d'autres outils d'évaluation articulaire plus sensibles sont

développés, comme l'échographie articulaire (54). En annexe 3, est présenté notre travail sur l'atteinte échographique des mains et des poignets chez des patients atteints de ScS vus consécutivement.

D'autres atteintes musculosquelettiques sont observées, comme les téno-synovites fibreuses présentes chez 10% des patients dans la cohorte Eustar, les contractions en flexion observées chez 30% des patients, les lésions de calcinose (20%) avec des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite dans les tissus mous, l'ostéoporose ou une atteinte musculaire (52,53). L'atteinte musculosquelettique grève le pronostic fonctionnel des malades, mais elle constitue également un marqueur pronostique péjoratif prédictif d'une progression de la maladie sur le plan viscéral, avec aggravation du score cutané de Rodnan, apparition d'ulcères digitaux, diminution de la fonction cardiaque et risque de crise rénale sclérodermique, tous ces facteurs étant des facteurs de risque indépendants de mortalité au cours de la ScS (2,21,55).

5. Manifestations digestives

L'atteinte digestive est fréquente au cours de la ScS, observée chez 75 à 90% des patients et peut atteindre l'ensemble du tube digestif de l'œsophage jusqu'au rectum. Elle s'observe autant dans les formes cutanées limitées que dans les formes cutanées diffuses.

L'atteinte œsophagienne est la plus fréquemment observée au cours de la ScS ; elle touche 50 à 90% des patients (56). Les symptômes les plus fréquents sont le reflux gastro-œsophagien (50-80%) et la dysphagie (50%). Les risques essentiels sont l'œsophagite (avec un risque de sténose peptique) qui peut conduire à l'endobrachyœsophage, qui est une lésion pré-cancéreuse (56,57). L'atteinte grêlique est observée chez environ 40% des patients. Elle est caractérisée par un hypopéristaltisme intestinal pouvant favoriser une pullulation microbienne et des pseudo-occlusions intestinales.

6. La crise rénale sclérodermique

Il s'agit de l'atteinte rénale spécifique de la ScS ; elle constitue une complication grave de la maladie. Sa prévalence était comprise entre 12 et 18% dans les séries américaines, alors qu'elle a été estimée à seulement 2% dans la base de données européennes EUSTAR (58,59). Toutefois, cette différence peut être expliquée par des différences ethniques et par des différences de répartition des auto-anticorps entre les Etats-Unis et l'Europe. Par exemple, les

auto-anticorps anti-ARN polymérase III qui ont été associés à la crise rénale sclérodermique sont plus fréquemment observés en Amérique du Nord (14%) qu'en Europe (9%) (60). La crise rénale sclérodermique touche principalement les formes cutanées diffuses et survient habituellement dans les 4 premières années d'évolution de la maladie.

III. Les auto-anticorps

La ScS est une maladie auto-immune avec présence d'auto-anticorps chez plus de 95% des patients au diagnostic (61). La plupart de ces auto-anticorps sont des anticorps anti-nucléaires avec une fréquence comprise entre 85 et 99% (62). Ils peuvent précéder l'apparition du phénotype clinique de la ScS. La majorité des anticorps anti-nucléaires (80%) détectés au cours de la ScS correspondent à des anticorps spécifiques de la ScS dirigés contre des auto-antigènes ubiquitaires. Il est habituellement admis qu'ils sont mutuellement exclusifs et qu'il n'y a pas de changement de spécificité au cours de la maladie. Par exemple, dans une étude, seulement 4% des sérums de 69 patients ScS avaient au-moins 3 anticorps différents (63). Toutefois, l'utilisation de biopuces à antigènes semble contredire cette notion de monospécificité, avec dans une étude l'identification, chez la majeure partie des patients, de plusieurs auto-anticorps (62). Les prévalences et associations cliniques des auto-anticorps spécifiques dans la ScS sont décrites dans le Tableau 2.

Les anticorps anti-topoisomérase de type I (ou anti-Sc170) sont hautement spécifiques de la ScS avec une spécificité de l'ordre de 99% et une sensibilité plus faible, inférieure à 25%. Ils sont observés dans 9,4 à 42% des cas selon les études. Leur prévalence a été estimée à 36,9% en combinant les données obtenues par immunofluorescence indirecte, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), et immunoblot, tandis qu'elle n'était que de 24,3% si on n'utilisait que la technique ELISA (64). Ces auto-anticorps sont associés à un pronostic péjoratif.

Les anticorps anti-centromères sont observés chez 20% à 40% des patients avec une prévalence variable selon l'éthnicité (moindre chez les afro-américains) (65). Les patients avec anticorps anti-centromères ont un pronostic plus favorable que les patients avec d'autres auto-anticorps spécifiques (66,67).

D'autres anticorps comme les anti-ARN polymérase de type III peuvent être détectés : ils sont présents chez 6 à 9% des patients en France, mais leur prévalence globale a été estimée à 11% dans le monde avec une répartition géographique variable (prévalence aux alentours de

14% aux Etats-Unis) (60). Les patients avec anti-ARN polymerases III semblent avoir un risque accru de cancer, dont le diagnostic est fait peu de temps avant ou après le diagnostic de ScS, ce qui suggère l'existence d'un phénomène paranéoplasique dans ces cas (68–70). Ce point est détaillé dans le chapitre 2.II.2.c.ii

Les anticorps anti-U3 RNP sont très spécifiques de la ScS et sont plus fréquemment observés chez les patients afro-américains que chez les blancs ou asiatiques (62). Ils sont associés à un pronostic péjoratif, en particulier chez les sujets à peau noire (71).

Tableau 2 : Auto-anticorps spécifiques de la ScS

Anticorps	Fréquence	Association clinique
Anti-topoisomérase de type I	9,4-42%	Forme cutanée diffuse Pneumopathie interstitielle Atteinte musculo-squelettique Pronostic défavorable
Anti-ARN polymérase III	11%	Forme cutanée diffuse Crise rénale sclérodermique Cancer Ectasie vasculaire antrale gastrique
Anti-fibrillarine (anti U3 ribonucléoprotéines)	4-10%	Forme cutanée diffuse HTAP Myosite
Anti-centromères	20-40%	Forme cutanée limitée Calcinose Atteinte intestinale HTAP
Anticorps anti-Th/To	2-5%	Forme cutanée limitée Pneumopathie interstitielle

Malgré l'association forte entre ces auto-anticorps et un phénotype clinique, ces auto-anticorps ne sont pas sensibles ou spécifiques à 100% d'une atteinte clinique. Ainsi, un dépistage régulier des complications liées à la ScS doit être réalisé chez tous les patients quel que soit leur statut pour les auto-anticorps.

D'autres auto-anticorps associés à la ScS peuvent être détectés, tels que les anti-PmScl observés dans 5% des cas dans une cohorte allemande de 863 patients et présents dans les formes de chevauchement avec une polymyosite, les anti-U1 RNP (présents chez 5% des patients dans cette même cohorte, que l'on observe habituellement dans les formes de

chevauchement avec une connectivite mixte), et les anti-Ku (1%) que l'on observe dans les formes de chevauchement avec un lupus ou une polymyosite (72,73).

Certains auto-anticorps contre des auto-antigènes non ubiquitaires ont été identifiés au cours de la ScS avec mise en évidence d'un rôle pathogène. Ils ont permis de mieux comprendre certains mécanismes physiopathologiques de la ScS. Ces données sont détaillées dans le chapitre 2.II.2cii.

IV. Les traitements

La prise en charge actuelle est essentiellement symptomatique. Aucun traitement de fond n'a jusqu'à présent montré son efficacité pour prévenir ou guérir la fibrose systémique avancée. Les stratégies anti-cytokiniques, comme le Tocilizumab apparaissent comme prometteuses (74). Une autre approche thérapeutique développée actuellement est l'utilisation de traitements anti-remodelage avec des résultats encourageants (75–79).

Une option thérapeutique future sera peut-être de cibler plusieurs aspects de la maladie en combinant des médicaments immunorégulateurs et des traitements inhibant le remodelage matriciel.

Pour des informations supplémentaires, vous pouvez vous référer à l'Annexe 4, où figure une mise au point récente sur la ScS.

CHAPITRE 2 : LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE : PHYSIOPATHOLOGIE

I. Une maladie multifactorielle

1. Les facteurs environnementaux

La ScS résulte de l'association d'événements environnementaux sur un fond génétique de susceptibilité.

Certains agents environnementaux ont un rôle bien établi. C'est le cas de la silice cristalline pour laquelle une méta-analyse récente portant sur 16 études (1101 cas) confirme cette association avec un Odds-ratio (OR) estimé à 3,20 (intervalle de confiance à 95% (IC 95%) : 1,89-5,43), avec un risque accru en particulier chez les hommes (80). De même, une étude prospective française comparant 100 patients ScS et 300 contrôles retrouve une association forte avec un OR : 5,32, IC95% : 2,25-13,09, $p < 0,0001$, en particulier chez les hommes (81). L'exposition à la silice est actuellement reconnue au tableau 25 bis des maladies professionnelles en France. Les mécanismes impliqués sont partiellement connus : des études expérimentales ont montré que la silice administrée par voie intra-trachéale et intra-veineuse était responsable de modifications de la réponse immunitaire humorale et cellulaire; la destruction du tissu pulmonaire par la silice, l'internalisation des particules par les cellules endothéliales lors du passage dans la circulation et leur présence au niveau lymphatique seraient responsables d'une activation lymphocytaire T et B, de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de l'activation des fibroblastes.

D'autres facteurs environnementaux sont fortement suspectés comme les solvants organiques et les fumées de soudage. Dans une méta-analyse portant sur 11 études (1291 cas), le risque de développer une ScS chez les patients exposés aux solvants organiques est estimé à 2,4 (IC 95% : 1,7-3,4) et semble encore plus marqué chez les hommes (80). Ces données sont confirmées dans l'étude française avec des OR à 2,46, IC95% : 1,12-5,32 pour les solvants organiques et 8,17, IC95% : 2,29-36,5 pour les solvants aromatiques. Les cétones et le white spirit ont également été associés à la ScS dans cette étude. Les mécanismes sont mal connus : les solvants pourraient pénétrer au travers de la peau et par inhalation et se lieraient aux acides nucléiques et aux protéines, déclenchant une réponse immunitaire cellulaire et humorale (82).

Les fumées de soudage ont également été impliquées dans le développement de la ScS dans l'étude prospective française avec un OR égal à 2,6, IC95% : 1,15-5,81, p=0,021.

L'association entre le ScS et d'autres facteurs environnementaux tels que les résines epoxy, les vibrations, les anorexigènes ou la silicone n'a pas été confirmée (81).

Parmi les autres types de facteurs environnementaux, des virus ont également été suspectés: certains patients ont des anticorps sériques anti-cytomégalovirus (CMV): leur rôle pathogène n'est pas connu, mais ils pourraient jouer un rôle dans l'apoptose des cellules endothéliales. Par ailleurs, l'ARN du virus de l'Epstein-Barr a été mis en évidence dans les fibroblastes et myofibroblastes, présents dans les lésions sclérotiques (83).

2. Facteurs génétiques

Il s'agit d'une maladie multigénique qui résulte de la combinaison de plusieurs facteurs de susceptibilité génique ayant pour chacun d'entre-eux un poids faible. Ces allèles de susceptibilité peuvent être associés dans des combinaisons variables, ce qui peut contribuer à l'hétérogénéité de la maladie. Le rôle des facteurs génétiques a été appréhendé par plusieurs approches.

a) Etudes épidémiologiques

Différents types d'études épidémiologiques plaident en faveur d'une composante génétique dans la physiopathologie de la ScS.

Les études de jumeaux permettent de bien évaluer le poids de la génétique dans le développement d'une maladie puisque les jumeaux monozygotes ont un patrimoine génétique identique et que l'on peut considérer que leur exposition à des facteurs environnementaux dans l'enfance est similaire. Ainsi, les ressemblances ou différences observées sont attribuées majoritairement à leur fond génétique. Une seule étude de jumeaux est disponible à ce jour (84). Elle est basée sur l'analyse de 42 paires de jumeaux dont 24 monozygotes et montre une faible concordance pour l'expression clinique de la maladie (4,7%). Toutefois, il existe une forte concordance pour la présence d'anticorps anti-nucléaires (40% pour les dizygotes, 90% pour les monozygotes), ce qui suggère qu'il existe une part génétique, mais qu'elle n'explique pas à elle seule le développement de la maladie et que la composante génétique pourrait surtout être impliquée dans les processus immunitaires (85,86). Cependant, une étude complémentaire, à partir de cette même cohorte a montré qu'il existait chez ces jumeaux une

concordance d'expression génique des fibroblastes dermiques en culture avec un phénotype pro-fibrotique, en particulier de gènes régulés par le TGF- β , dont *ACVR1B* (activin A receptor, type IB), *COL1A2* (chaîne alpha 2 du collagène I), *COL8A1* (chaîne alpha 1 du collagène VIII), *SPARC* (secreted protein acidic and rich in cysteine), *CTGF* (connective tissue growth factor), *THY1* (Thy-1 cell surface antigen), *AGTRL2* (angiotensin receptor-like 2), *FHL2* (four and a half LIM domains 2) ou *ARHB* (Ras homolog gene family, member B). La surexpression de *COL1A2*, *SPARC* et *CTGF* a ensuite été confirmée par PCR quantitative (87).

La deuxième approche a consisté à étudier l'aggrégation familiale de la maladie. A partir de 3 cohortes américaines, réunissant 703 familles dont 11 multiplex (avec plus de 2 individus atteints) pour la ScS, le risque relatif de ScS pour les apparentés au premier degré a été estimé à environ 13 avec un taux de récurrence à 1,6% contre 0,026% dans la population générale (88). Le risque maximal était observé chez les frères et sœurs avec un risque estimé à 15 (10 à 27 selon les cohortes). Ce risque représente le plus fort facteur de risque de la maladie établi, mais à l'échelon individuel le risque est faible chez les apparentés au premier degré (inférieur à 1%).

A l'échelle des populations, l'existence d'un foyer de surprévalence de la maladie dans l'Oklahoma où la prévalence de la ScS est estimée à 469 pour 100000 habitants chez les Indiens Choctaw versus 31 pour 100000 dans la population générale plaide également pour l'existence d'une composante génétique à la ScS (89). Il faut également noter que le phénotype développé par les Indiens Choctaw atteints est relativement homogène avec une majorité de formes sévères : formes cutanées diffuses avec anticorps anti-Scl70 et fibrose pulmonaire.

b) Etudes génétiques

Les études génétiques ont le plus souvent utilisé une analyse par association dans des approches gènes candidats ou plus récemment pan-génomiques, du fait de la rareté de la maladie et de familles multiplex (86). Dans les approches de type gènes candidats, les SNP (single nucleotide polymorphism) ont été choisis du fait d'une pertinence sur le plan biologique ou car ils avaient été identifiés comme facteurs de susceptibilité génétique dans d'autres maladies auto-immunes. En revanche, dans les approches de type génome entier, aucune hypothèse n'est faite *a priori* et le génome est étudié en entier.

Dans la ScS, les gènes identifiés peuvent se diviser en 3 groupes qui correspondent aux 3 axes physiopathologiques de la maladie : les données les plus solides (obtenues sur de larges cohortes et répliquées dans des cohortes indépendantes) concernent des gènes impliqués dans l'auto-immunité et la réponse inflammatoire (90). Cependant, quelques gènes participant à l'apoptose et à la fibrogénèse ont également été identifiés.

Nous ne présentons ici que les associations validées dans au-moins 2 cohortes indépendantes.

Gènes impliqués dans la dysimmunité

- ❖ Complexe majeur d'histocompatibilité: HLA (human leukocyte antigen) et présentation antigénique

La ScS est associée aux molécules HLA de classe II dont le génotype varie fortement selon l'éthnicité et parfois le sexe (par exemple *DQA1*0501* est plus fortement associé à la maladie chez les hommes (91)). Mais, il existe également une variation importante selon la présence de différents auto-anticorps associés à la ScS: anti-topoisomérase I avec *DRB1*11-*1502* (92), *DQB1*03-*04* (93) , *DPB1*1301* (94) et *DPB1**0901* (95) et les anticorps anti-centromères avec *DRB1*0101*, *DRB1*0104*, *DRB1*0108*, *DQB1*0501*, *DPB1*0402* (92,95). Dans la première approche génome entier réalisée, l'association la plus forte ($P= 8.16 \times 10^{-13}$) était observée avec 5 SNPs localisés dans les régions *HLA-DPB1* et *-DPB2* (96). Une étude plus fine de cette région a identifié les variants rs3128930, rs7763822 et rs7764491 comme portant l'association, en particulier dans les formes avec anticorps anti-topoisomérases I. Dans la cohorte de réplique américaine, rs7763822 et rs7764491 étaient les plus fortement associés à la ScS avec anticorps anti-topoisomérases de type I. En 2010, une approche génome entier portant sur 2296 patients ScS et 5171 contrôles sains a été réalisée avec 280000 SNPs analysés (97). L'association la plus forte était portée par la région HLA en 6p21, dans laquelle le variant rs6457617 situé dans la région *HLA*DQB1* avait la plus forte significativité ($p = 2.31 \times 10^{-18}$) (97). Cependant, il reste à définir si ces associations sont relatives à la maladie par elle-même ou profil d'auto-anticorps spécifique.

Ainsi, ces résultats montrent le poids du système HLA dans la composante génétique de la maladie et soulignent le rôle de la dysimmunité dans la physiopathologie de la ScS. Toutefois, la structure complexe du système HLA en terme de déséquilibre de liaison rend difficile une analyse plus fine et l'identification de variants causaux.

❖ Immunité innée

❖ Voies de signalisation de l'interféron (IFN) (*IRF5*, *IRF7*, *IRF8*)

L'interféron de type I est un médiateur clé de l'immunité innée déclenché en réponse à une infection microbienne.

Le gène *IRF5* code pour un facteur de transcription impliqué dans la signalisation par les toll like receptors (TLRs) et l'activation de l'interféron de type I. Différents variants de *IRF5* ont été associés à la ScS, notamment rs2004640, qui crée un site d'épissage conduisant à un transcrit alternatif. Ce variant a été identifié en stratégie gène candidat avec notamment une association avec la fibrose pulmonaire liée à la ScS pour le génotype homozygote (98). A noter que cette association avec la fibrose pulmonaire persistait pour l'allèle et le génotype en analyse multivariée, après ajustement pour la forme cutanée et la positivité des anticorps anti-topoisomérase I. Cette association entre des variants d'*IRF5* et la ScS a été répliquée dans une cohorte indépendante japonaise (99). Dans l'étude génome entier publiée par Radstake et al. en 2010, en dehors de HLA, un SNP localisé dans la région *TNPO3-IRF5* avait la plus forte association (97). L'association *IRF5*-ScS a également été confirmée dans une seconde approche génome entier (100).

IRF8 est un autre facteur régulateur de la voie de signalisation de l'interféron. Dans une méta-analyse de 4 études génome entier comprenant 2296 patients et 5171 contrôles sains, *IRF8* (rs11642873) a été associé à la forme cutanée limitée (OR=0,75, $p=2,32 \times 10^{-12}$) (101). L'association avec *IRF8* a été confirmée dans une étude indépendante qui a identifié le SNP rs11117432 comme facteur de susceptibilité pour la ScS et confirmé l'association avec rs11642873 dans une méta-analyse (102). Le variant protecteur rs11117432 augmentait l'expression de l'IFN-gamma, et diminuait l'expression de l'IFN de type I.

Un SNP (rs1131665) localisé dans la région exonique d'*IRF7* a été associé à la ScS avec anticorps anti-centromères dans 2 cohortes européennes et françaises (103), mais ces résultats n'ont pas été confirmés par une étude indépendante.

Ainsi, ces résultats soulignent le rôle important de l'interféron de type I et de l'immunité innée dans la ScS.

❖ Toll like receptors

Le SNP rs5743704 de *TLR2* a été associé avec la ScS avec anticorps anti-topoisomérase dans 2 cohortes européennes avec augmentation de la production d'IL-6 et de TNF- α suite à

la stimulation du TLR-2 (104). Ces résultats n'ont pas été confirmés dans une étude indépendante.

❖ *Interleukin 1 receptor associated kinase-1 (IRAK1) et methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2)*

Des SNPs des gènes *IRAK1* et *MECP2* ont été associés à la ScS. Ces deux gènes sont portés par le chromosome X, ce qui soulève l'hypothèse d'un lien entre ces facteurs de risque et le biais de sexe observé dans la ScS. *IRAK1* joue un rôle dans la modulation de l'activation de la voie de signalisation NF- κ B (nuclear factor- κ B) induite par l'IL-1 tandis que *MECP2* participe à la régulation de la transcription de gènes sensibles à la méthylation.

MECP2 code pour une protéine, la methyl-CpG-binding protein, qui se lie spécifiquement aux îlots CpG méthylés. Un SNP de *IRAK1* (rs1059702) a été associé à la ScS cutanée diffuse, à la ScS avec anticorps anti-topoisomérases I et à la forme avec fibrose pulmonaire dans deux cohortes indépendantes européennes (105)

Dans une étude portant sur 3065 femmes ScS et 2630 contrôles sains issus de 5 cohortes caucasiennes indépendantes, les SNPs rs1059702 du gène *IRAK1* et rs17435 de *MECP2* ont été associés à la forme cutanée diffuse. Toutefois, l'analyse par régression logistique conditionnelle a montré que l'association d'*IRAK1* rs1059702 avec la forme cutanée diffuse était expliquée par l'effet de *MECP2* rs17435. En revanche, le SNP rs1059702 d'*IRAK1* était associé à la fibrose pulmonaire (106).

❖ Immunité adaptative

❖ *CD247*

CD247 code pour une sous-unité zeta du TCR (T cell receptor) qui participe au complexe T-cell receptor/CD3. L'association entre un SNP de *CD247* et la ScS a été mise en évidence pour la première fois dans une étude génome entier (97) et a été confirmée dans une cohorte indépendante (107).

❖ *STAT 4 (Transcription factor signal transducer and activator of transcription 4)*

STAT4 code pour un facteur transcriptionnel qui régule l'expression de nombreux gènes. Il joue un rôle dans l'orientation des lymphocytes T helpers vers des phénotypes Th1 (T-helper cell type 1) et Th17 (T-helper cell type 17). Le variant rs7574865 de *STAT4* a été associé à la

ScS dans deux larges études européennes indépendantes (108,109), notamment pour la forme cutanée limitée (108). Deux études complémentaires nord-américaine et japonaise ainsi que 2 études génome entier ont confirmé cette association avec la ScS, en particulier avec la forme cutanée limitée et la forme avec anticorps anti-centromères (97,100,110,111).

❖ *TNFSF4 (Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 4)*

Les résultats des études génétiques sont détaillés dans le chapitre 4. V

❖ *PTPN22 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid))*

PTPN22 code pour la protéine LYP, qui est une tyrosine phosphatase exprimée par les lignées lymphoïdes. Elle régule l'activation lymphocytaire en interagissant avec des kinases effectrices: elle semble moduler négativement la sélection des cellules T négatives dans le thymus et inhibe les cellules auto-réactives en périphérie. Le SNP rs2476601 (allèle *PTPN22*620W*) induit un gain de fonction qui peut empêcher la délétion des cellules T autoréactives dans le thymus ou peut entraîner une activité insuffisante des lymphocytes T régulateurs. A partir d'une très large série nord-américaine portant sur 905 patients et 656 contrôles, une association allélique avec l'allèle *PTPN22*620W* a été mise en évidence (112). L'étude de 7 SNPs dans une cohorte française de 659 patients et 504 témoins sains n'a pas détecté d'association allélique ou génotypique, après exclusion des patients présentant une autre maladie auto-immune connue pour être associée à *PTPN22*, mais une association haplotypique avec l'haplotype portant l'allèle de susceptibilité *PTPN22*620W* a été mise en évidence (113). Une méta-analyse des données publiées a confirmé cette association, en particulier pour les formes avec anticorps anti-centromères (p poolé=0,02, OR 1,22, IC 95% :1,05-1,42). (114).

❖ Lymphocyte B: *BANK 1 (B cell-specific scaffold protein with ankyrin) et BLK (B lymphocyte kinase)*

Des données génétiques ont conforté la probable implication des lymphocytes B dans la physiopathologie de la ScS.

Deux SNPs non synonymes et fonctionnels de *BANK1* ont été associés à la forme cutanée diffuse dans deux études indépendantes, portant respectivement sur 1295 patients ScS et 11137 contrôles français et allemands (115) et 2380 patients ScS et 3270 contrôles sains européens (116).

Un autre gène spécifique des lymphocytes B, *BLK* a été associé à la ScS. Il transduit le signal en aval du B cell receptor. Deux variants de la région *C8orf13-BLK* (rs13277113 et rs2736340) ont été étudiés chez 1050 cas et 694 contrôles nord-américains et répliqués chez 589 cas et 722 contrôles espagnols. En analyse combinée, les deux variants étaient associés à la ScS (117). Dans une méta-analyse, l'association entre le SNP rs13277113 et la ScS a été confirmée, en particulier pour les formes cutanées diffuses (118).

❖ *CCR6 (Chemokine receptor 6)*

La protéine CCR6, est exprimée par les lymphocytes T Th17 et est impliquée dans le recrutement des lymphocytes T Th17 dans les tissus cibles. *CCR6* rs10946216 a été associé à la ScS avec anticorps anti-topoisomérases I dans 3 populations européennes (119) et cette association a été confirmée dans une cohorte de réplication indépendante (120). Ces résultats plaident pour un rôle de la voie Th17 dans la physiopathologie de la ScS.

❖ *TNFAIP3 (Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3)*

TNFAIP3 (6q23) code pour la protéine A20, une protéine en doigt de zinc, qui régule négativement la voie de signalisation NFκB, facteur de transcription régissant de nombreux mécanismes cellulaires, prépondérant dans les phénomènes inflammatoires. Trois variants ont été génotypés dans une cohorte européenne de 1656 patients et 1311 contrôles et le SNP rs5029939 a été associé à la maladie (121). De plus, une association forte a été mise en évidence avec la forme cutanée diffuse, la fibrose pulmonaire et l'HTAP suggérant que *TNFAIP3* pourrait contribuer à la sévérité de la maladie. Dans une autre étude portant sur 2 cohortes françaises regroupant au total 1607 patients et 1504 contrôles, *TNFAIP3* a été associé au sous-type ScS avec polyautoimmunité avec un OR égal à 3,51, IC95% : 2,28-5,41 ; $p=8,58 \times 10^{-9}$ (122).

Par ailleurs, un autre SNP de *TNFAIP3* a été identifié comme facteur de susceptibilité à la ScS avec anticorps anti-centromères dans une étude ayant utilisé des puces de génotypage sur mesure appelées « Immunochip » (123). Ces puces sont composées de 195806 SNPs identifiés dans de larges études d'association menées sur 11 maladies auto-immunes et inflammatoires.

❖ *TNIP1 (TNFAIP3 interacting protein 1)*

TNIP1 code pour une protéine régulatrice d'A20. Le SNP rs2233287 a été associé à la ScS dans l'étude génome entier européenne (100). L'expression de la protéine TNIP1 était diminuée dans la peau lésionnelle de patients ScS. Par ailleurs, l'ARNm et la protéine TNIP1 étaient moins exprimés par des fibroblastes dermiques issus de patients ScS cultivés *in vitro* en comparaison à des fibroblastes dermiques issus de sujets contrôles sains. Enfin, l'adjonction de TNIP1 recombinante a diminué *in vitro* la synthèse de collagène par des fibroblastes dermiques de patients sains et atteints de ScS, après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-1 β). *TNIP1* a également été identifié comme facteur de susceptibilité pour la ScS dans une étude indépendante incluant 4389 ScS et 7611 contrôles sains européens et américains (124).

❖ *ATG5 (Autophagy-related 5)*

Ce gène joue un rôle dans l'autophagie, processus impliqué dans l'immunité innée et adaptative. Le SNP rs9373839 a été identifié comme facteur de susceptibilité à la ScS dans une étude regroupant au total 5850 patients ScS et 9401 contrôles européens (123).

❖ Voie de signalisation de l'IL-12

IL-12 intervient dans la différenciation des cellules T vers une voie Th1. Quatre SNP dans la voie de signalisation de l'IL-12 ont été associés à la ScS (rs7758790 du gène *SHIP1-IL12A*, rs2304256 du gène *TYK2*, rs436857 du gène *IL12RB1* et rs3790567 du gène *IL12RB2*) (123,125–127).

❖ *Interleukine 21*

Les récepteurs de l'IL-21 sont exprimés sur les lymphocytes B, T et les cellules NK (natural killer). L'interleukine 21 joue un rôle dans la différenciation des lymphocytes T Th17, dans la prolifération et différenciation des lymphocytes T et des lymphocytes NK. Le SNP rs6822844 a été associé à la ScS dans une étude récente incluant 4493 patients ScS et 5856 contrôles sains caucasiens (128).

Gènes impliqués dans l'apoptose et le destin cellulaire

❖ *DNASEIL3 (Deoxyribonuclease I-like 3)*

DNASEIL3 joue un rôle dans la fragmentation de l'ADN durant l'apoptose. Le SNP rs35677470 a été associé à la ScS, en particulier la forme avec anticorps anti-centromères, par deux études ayant utilisé la puce de génotypage « Immunochip » (123,129).

❖ *SOX5 (SRY (sex determining region Y)-box 5)*

SOX5 est un facteur de transcription impliqué dans la détermination du destin cellulaire. Il a été identifié comme facteur de susceptibilité à la ScS avec anticorps anticentromères dans une méta-analyse d'études génome entier avec réplication des résultats dans des cohortes indépendantes (101).

Gènes impliqués dans les voies de signalisation de la fibrose

❖ *CSK (c-Src tyrosine kinase)*

CSK est impliquée dans la régulation de la différenciation des myofibroblastes en modulant la fonction des kinases src. Ces src kinases contribuent au processus de fibrose en régulant la transmission du signal médié par les intégrines suite à l'adhésion des fibroblastes à la matrice extracellulaire; elles sont impliquées dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Le SNP rs1378942 de *CSK* a été associé à la ScS dans une méta-analyse d'études génome entier (130).

❖ *CAVI (Cavéoline 1)*

La cavéoline 1 est un inhibiteur de la fibrose tissulaire. Une diminution de l'expression de la protéine cavéoline 1 a été observée dans la peau et les poumons de patients ScS (131). Le SNP rs959173 a été associé à la ScS dans une méta-analyse incluant les données d'une étude génome entier sur une cohorte française et une étude de réplication dans une cohorte italienne comprenant au total 1355 sujets ScS et 2619 contrôles (OR poolé : 0,81, p=0,0018). La corrélation génotype/expression protéique a montré une expression plus élevée de la protéine dans la peau de patients ScS et contrôles porteurs de cet allèle protecteur (132).

❖ *GRB10 (Growth factor receptor-bound protein 10)*

La protéine GRB10 interagit avec des récepteurs aux tyrosines kinases. Le SNP rs12540874 a été associé à la ScS cutanée limitée dans une méta-analyse d'études génome entier (101).

Ainsi, ces données confirment l'existence d'une composante génétique dans la physiopathologie de la ScS. La majorité des facteurs de susceptibilité génétique identifiés et répliqués sont impliqués dans la réponse inflammatoire et auto-immune, soulignant le rôle important, peut-être initiateur de la phase dysimmunitaire auto-immune dans la fibrose.

Par ailleurs, comme beaucoup de maladies multigéniques, plusieurs facteurs de susceptibilité génétique contribuent au fond génétique de susceptibilité de la maladie, avec pour chacun d'entre eux un poids faible. Il est également possible que ces facteurs de susceptibilité génique aient un effet multiplicatif augmentant encore la susceptibilité à la maladie par des interactions gène-gène ou gène-environnement.

Cette association de facteurs de susceptibilité génique va dans le sens du concept de « seuil de tolérance » immune (133). Ainsi, la somme de plusieurs facteurs génétiques définit le seuil de tolérance du sujet, qui sera abaissé par rapport à un sujet n'ayant pas ce fond génétique de susceptibilité aux maladies auto-immunes et lorsque l'état d'activation (déterminé par des facteurs environnementaux) dépasse ce « seuil de tolérance immune », la maladie auto-immune apparaît (par défaut d'élimination des cellules auto-réactives).

Les variants identifiés sont, dans la majorité des cas, situés dans des régions non-codantes (introniques) et sans prédiction de fonction régulatrice. Ainsi, l'existence d'un variant causal reste souvent difficile à établir et le rôle biologique des variants reste peu clair. Une des hypothèses est que ces SNPs seraient en déséquilibre de liaison avec les variants causaux situés dans des régions codantes. Une autre hypothèse émergente est qu'ils pourraient influencer la transcription d'ARN régulateurs comme des micro-ARN ou des longs ARN non-codants (134).

De plus, la plupart de ces gènes ont également été reconnus comme facteurs de susceptibilité pour d'autres maladies auto-immunes (dont notamment le lupus systémique) qui ne sont pas caractérisées par un phénotype fibrosant, suggérant l'existence d'un fond génétique commun aux différentes maladies auto-immunes, aussi appelé « auto-immunité partagée » (Figure 10) (86). Parmi ces gènes, *TNFAIP3* a été associé à la polyautoimmunité (122). Les données épidémiologiques confortent ce concept d'auto-immunité partagée: il existe à l'échelon individuel mais aussi à l'échelon familial un sur-risque de développer une ou plusieurs autres maladies auto-immunes associées à la ScS (17,135).

Ainsi, la question qui se pose est quel est l'impact réel de ces variants génétiques sur le phénotype clinique de la ScS. Pour déterminer la contribution de ces SNPs au phénotype de la maladie *in vivo*, des modèles murins de ScS peuvent être utilisés. Une première étude a cherché à évaluer la contribution fonctionnelle de *STAT4* au phénotype fibrotique de la ScS, en utilisant deux modèles murins complémentaires de fibrose cutanée (136). Des variants génétiques de *STAT4* ont été associés à la ScS, mais également à d'autres maladies auto-immunes non fibrosantes (108–111,137,137–141). Les souris invalidées pour *STAT4* (*stat4*^{-/-}) étaient protégées de la fibrose dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine, qui reproduit les stades inflammatoires précoces de la maladie par rapport aux souris *stat4*^{+/+} (136). Cette protection du phénotype fibrotique était accompagnée d'une diminution de l'infiltrat inflammatoire, notamment de l'infiltrat lymphocytaire T et du taux de cytokines pro-inflammatoires dans la peau lésionnelle. En revanche, les souris *stat4*^{-/-} n'étaient pas protégées de la fibrose dans un modèle de fibrose non inflammatoire : le modèle *tsk-1*. Ainsi, ces résultats suggèrent que *STAT4* joue un rôle dans la phase inflammatoire de la fibrose et exerce un effet pro-fibrotique par activation de la prolifération lymphocytaire T et du relargage de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques. Ces résultats permettent ainsi de valider les résultats des études génétiques et de confirmer le rôle de *STAT4* dans le développement de la ScS.

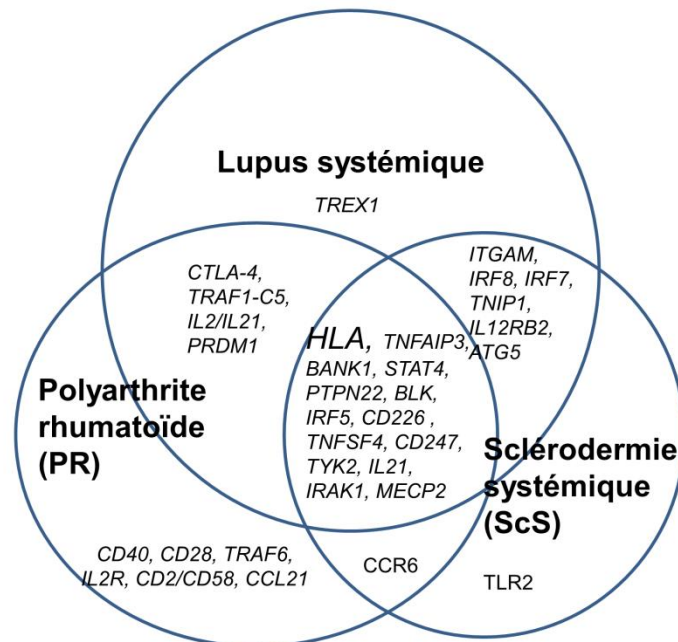
Dans ce même modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine, nous avons confirmé la contribution de *CD226* à la fibrose dermique inflammatoire (142). *CD226* code pour la protéine DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1) qui est impliquée dans la co-stimulation des lymphocytes T (143). Ce gène a été identifié comme facteur de susceptibilité génétique pour la ScS, mais également pour d'autres maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (144–147). Les résultats de cette étude sont présentés dans l'Annexe 5.

Afin de mieux préciser la contribution de *CD226* aux différentes maladies auxquelles il a été associé, nous avons évalué l'effet de l'inactivation de *CD226* dans le modèle murin d'arthrite induite par le collagène, modèle de polyarthrite rhumatoïde. Et nous avons observé que les souris invalidées pour *CD226* n'étaient pas protégées de l'arthrite dans ce modèle, ce qui suggère l'absence de contribution de *CD226* au phénotype de la polyarthrite rhumatoïde (148). Ces résultats sont détaillés dans l'Annexe 6.

Ces résultats renforcent l'idée qu'il existe certes un fond génétique commun aux différentes pathologies auto-immunes, mais que les variants sont impliqués dans le déterminisme d'un phénotype particulier, en l'occurrence pour *CD226* dans le phénotype fibrotique mais pas dans le phénotype arthritique. Ces résultats incitent donc à la validation de la contribution des

différents gènes aux différents phénotypes spécifiques des maladies auxquelles ils ont été associés.

Figure 10 : L'auto-immunité partagée



Sur la figure, sont représentés les différents facteurs génétiques associés au lupus systémique, à la polyarthrite rhumatoïde et la sclérodermie systémique et à plusieurs de ces maladies. Les gènes représentés ne concernent que les résultats les plus fiables validés dans des cohortes de réplication.

Enfin, le poids individuel des différents loci identifiés (de même que leur effet cumulatif) reste faible avec des odds-ratio de l'ordre de 1,20-1,30, ce qui soulève la question de l'héritabilité manquante. Différentes causes pourraient y contribuer : (i) il est possible que des variants fréquents dans la population générale mais de faible poids génétique ne soient pas détectés par des tours du génome dont la puissance serait insuffisante, (ii) des variants rares peuvent passer inaperçus, car leur détection par l'association indirecte avec des tagSNP serait limitée par des corrélations faibles entre ces variants et ces tagSNPs (polymorphismes génétiques en déséquilibre de liaison important avec d'autres polymorphismes mononucléotidiques, ils sont sélectionnés de manière à réduire le besoin de génotypage), (iii) l'hétérogénéité génétique est aussi probable ; pour limiter ce biais, il faudrait que les études génétiques portent sur des formes plus homogènes et (iv) c'est l'interaction gène-gène ou

gène-environnement qui pourrait contribuer au risque de développer la maladie, soulevant la question de l'épigénétique au cours de la ScS.

c) Rôle de l'épigénétique

Plusieurs facteurs environnementaux sont impliqués dans la survenue de la ScS, avec pour certains une imputabilité bien démontrée. Par ailleurs, des facteurs environnementaux, comme la bléomycine ou l'acide hypochloreux sont utilisés pour générer des modèles animaux de la maladie (149). Mais, le mécanisme d'action de ces agents demeure inconnu. Cette forte implication des facteurs environnementaux a soulevé la question de l'épigénétique au cours de la ScS. À la différence des mutations génétiques qui sont permanentes, reliées à des altérations de l'ADN, et que l'on retrouve dans toutes les cellules, les modifications épigénétiques sont responsables des modifications stables de la transcription pour un type cellulaire donné. Ces modifications peuvent être déclenchées par des facteurs environnementaux.

Plusieurs études ont souligné le rôle de l'épigénétique dans la physiopathologie de la ScS (150,151). Les différents mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation de l'expression génique comprennent la méthylation des brins d'ADN, la méthylation ou l'acétylation des histones et la sur- ou sous-expression de micro-ARNs (150,152).

Plusieurs modifications épigénétiques ont été observées au cours de la ScS :

- la méthylation du promoteur de la NO (monoxyde d'azote) synthase endothéliale avec pour résultante une diminution de production du monoxyde d'azote, qui est un vasodilatateur, ce qui peut contribuer aux altérations fonctionnelles de l'endothélium vasculaire (150).
- une hypométhylation significative des lymphocytes CD4+ de patients ScS en comparaison à des contrôles (153).
- la déméthylation des éléments régulateurs sur le chromosome X inactif : il a été montré au cours de la ScS une hyperexpression de CD40L, codé par le chromosome X. Cette déméthylation des éléments régulateurs sur le chromosome X inactif contribuerait à l'hyperexpression de CD40L par les lymphocytes T CD4 des femmes atteintes de SSc (154).

Les modifications épigénétiques observées dans les fibroblastes sont détaillées dans le chapitre II.3.c.i.a.

II. Les différents processus physiopathologiques impliqués

La physiopathologie de la ScS est caractérisée par une microangiopathie précoce et généralisée, une réponse immunitaire activée et dérégulée conduisant à des phénomènes d'auto-immunité et une fibrose systémique, vasculaire et interstitielle tissulaire (155). Les types cellulaires impliqués dans le développement de la ScS incluent les cellules endothéliales, les plaquettes, les péricytes, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et myofibroblastes ainsi que des cellules de l'immunité (lymphocytes T, lymphocytes B, monocytes, macrophages et cellules dendritiques).

1. Vasculopathie

Il semblerait que l'atteinte vasculaire soit un élément précoce et peut-être causal dans la séquence pathogénique. Au cours de la ScS, il existe des lésions initialement fonctionnelles puis structurales de l'endothélium. Le spasme artériel et artériolaire est impliqué dans la survenue du syndrome de Raynaud, qui constitue presque toujours le mode d'entrée dans la maladie. Puis, il existe des lésions structurales de l'endothélium avec une prolifération myointimale responsable d'une ischémie permanente du tissu. Cette atteinte structurale de l'endothélium est impliquée dans les complications sévères de la maladie telles que l'HTAP, la crise rénale sclérodermique ou la cardiomyopathie.

a) Lésions endothéliales précoces

Les altérations fonctionnelles des cellules endothéliales entraînent une hyperproduction d'endothéline-1 (ET-1), de thrombine et thromboxane qui sont des agents vasoconstricteurs et une diminution de la production de facteurs vaso-dilatateurs comme le monoxyde d'azote et les prostacyclines.

Les modifications structurales visibles au stade précoce de la maladie incluent un espacement des cellules endothéliales et une vacuolisation du cytoplasme. Ces modifications semblent être la conséquence d'une apoptose des cellules endothéliales.

Différents facteurs ont été impliqués dans l'apoptose des cellules endothéliales : des agents chimiques ou infectieux, tels que le CMV, une activation de l'immunité cellulaire ou la production d'auto-anticorps anti-cellules endothéliales (156).

Récemment, une étude a suggéré qu'une répression du facteur de transcription GATA-6 dans les cellules endothéliales pourrait contribuer au développement de la vasculopathie, dans sa forme la plus sévère : l'HTAP (157). En effet, l'expression de GATA-6 est réduite dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des vaisseaux occlus et non occlus au cours de l'HTAP *in vivo*, suggérant que la réduction de GATA-6 surviendrait avant l'occlusion vasculaire et pourrait témoigner d'une phase précoce d'activation des cellules endothéliales et/ou d'un dysfonctionnement au cours de l'HTAP. De plus, les souris invalidées pour GATA-6 dans leurs cellules endothéliales développent spontanément des signes d'HTAP.

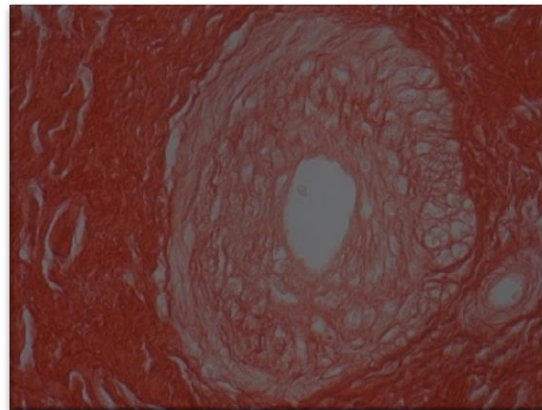
L'apoptose endothéliale a été associée au développement de la réponse dysimmunitaire et de la fibrose. Ainsi, on observe un infiltrat périvasculaire constitué de macrophages, lymphocytes B et T (1,158–162). Une des hypothèses émises est qu'un défaut d'élimination des cellules apoptotiques pourrait entraîner une phagocytose par les cellules dendritiques et les macrophages, avec ensuite présentation des antigènes vasculaires aux lymphocytes T CD8, responsable ensuite de la cascade dysimmunitaire (163). Ces corps apoptotiques peuvent aussi activer la voie alterne du complément, les plaquettes et les voies de coagulation, responsables de micro-thromboses vasculaires et d'une hyperplasie de l'endothélium avec un amincissement de la lumière du vaisseau avec pour résultante une hypoxie et une ischémie chronique du tissu avec production de radicaux libres (164,165).

Il existe à ce stade un phénotype « pro-thrombotique » et « pro-adhérent » de l'endothélium qui exprime des molécules d'adhésion telles qu'ICAM-1, VCAM-1 et sélectine ainsi que le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) qui vont favoriser le recrutement de lymphocytes activés dans les tissus cibles (166).

b) Remodelage de la paroi vasculaire

Au cours de la ScS, on observe un remodelage de la paroi vasculaire avec épaissement de l'intima et de la média ainsi qu'une fibrose adventicielle (Figure 11).

Figure 11 : Histologie d'un vaisseau au cours de la ScS



On observe un épaissement de la paroi du vaisseau avec prolifération myo-intimale et diminution de la lumière du vaisseau

Différentes cellules concourent au remodelage aberrant de la paroi vasculaire : les fibroblastes activés, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. L'hypoxie chronique est responsable de l'attraction des fibroblastes in-situ et de leur activation, par le relargage de facteurs pro-fibrotiques (tels que la sérotonine, le TGF- β , le PDGF et l'ET-1) et de radicaux libres par l'endothélium activé. Ces fibroblastes sécrètent de grandes quantités de matrice extracellulaire, ce qui entraîne une fibrose de la paroi vasculaire. Les cellules musculaires lisses pourraient également favoriser les lésions de prolifération myo-intimales typiques de ScS. En conditions normales, ces cellules ont un phénotype contractile, indifférencié et régulent le diamètre des vaisseaux. La dysfonction endothéliale, l'infiltrat leucocytaire et les altérations de la matrice extracellulaire sont responsables de l'attraction des cellules musculaires lisses vers la couche intimale où elles se transformeraient en myofibroblastes et synthétiseraient de grandes quantités de matrice extracellulaire (167). Les cellules épithéliales/endothéliales activées vont également pouvoir subir une transdifférenciation en myofibroblastes, entraînant une fibrose de la paroi du vaisseau (168).

c) Rôle du stress oxydant

L'épaississement de la paroi vasculaire en raison de la prolifération intinale et des cellules musculaires lisses est responsable d'un vasospasme artériel et artériolaire avec phénomènes d'ischémie-reperfusion et production de radicaux libres. Les radicaux libres semblent jouer un rôle dans la fibrose, en favorisant la prolifération des fibroblastes et leur production de collagène (169). Ils sont également produits par les cellules inflammatoires. Ce point est détaillé dans le chapitre II.3.e.iv

d) Angiogenèse et vasculogénèse

Il existe au cours de la ScS des anomalies des processus de compensation des lésions vasculaires. Ces processus de compensation sont l'angiogenèse (correspondant à une néovascularisation à partir des cellules endothéliales résidentes) et la vasculogénèse qui fait intervenir le recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants à partir de la moelle osseuse. L'hypoxie chronique entraîne la production dérégulée du facteur d'hypoxie HIF (hypoxia inducible factor) et de facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance endothéliale VEGF (vasculator endothelial growth factor). La production de VEGF pourrait être une tentative de réparation des dégâts vasculaires mais son action est inefficace et/ou incomplète comme l'illustre l'augmentation des taux sériques de VEGF qui est corrélée à la présence de plages avasculaires en capillaroscopie (170).

Il y a initialement une production augmentée de progéniteurs endothéliaux circulants sous l'influence des agressions vasculaires, puis probablement un « épuisement » médullaire, responsable du défaut de vasculogénèse (171). Il a également été suggéré l'existence d'un processus auto-immun humoral avec une apoptose des progéniteurs endothéliaux circulants liée à la présence d'anticorps anti-cellules endothéliales participant au défaut de vasculogénèse (172).

Enfin, des travaux ont suggéré l'expression d'isoformes anti-angiogéniques du VEGF et également que la perte d'expression du facteur cellulaire endothélial EGFL7 dans les cellules endothéliales et leurs progéniteurs pourraient jouer un rôle dans la vasculopathie de la ScS et contribuer à l'altération de l'angiogenèse (173).

Toutefois, l'efficacité réparatrice des progéniteurs endothéliaux circulants dans la ScS est également discutée (174).

e) *Relation entre vasculopathie et fibrose*

Plusieurs études ont suggéré que la vasculopathie pourrait entraîner le processus de fibrose :

Il a été mis en évidence *in vitro* une activation des fibroblastes avec résistance à l'apoptose, induite par des médiateurs issus de l'apoptose endothéliale, tels que le perlecan et la chondroïtine sulfate (175).

Les modèles murins ont souligné le lien vasculopathie-fibrose :

Les souris transgéniques pour le facteur transcriptionnel Fra-2 (Fos-related antigen-2) de la famille des facteurs AP-1 (activator protein-1 family) présentent une atteinte microvasculaire similaire à celle observée au cours de la ScS avec une apoptose endothéliale précoce puis une HTAP ainsi qu'une fibrose dermique et pulmonaire mimant la pneumopathie interstitielle non spécifique de la ScS (176,177).

Les souris transgéniques pour le VEGF (vascular endothelial growth factor) développent une fibrose dermique spontanée. De plus, dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine et dans le modèle génétique de fibrose non inflammatoire tight-skin 1 (tsk-1), la fibrose est plus importante chez les souris VEGF^{+/+} en comparaison à des souris wild type (wt) (178). Ces souris VEGF^{+/+} présentent une vasculopathie similaire à celle observée au cours de la ScS. L'effet pro-fibrotique du VEGF a été confirmé *in vitro* sur des cultures de fibroblastes dermiques.

Récemment, un nouveau modèle murin de ScS a été proposé : le modèle de souris invalidées pour le récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPAR)(179,180). L'activateur du plasminogène de type urokinase uPA est impliqué dans la survie des cellules endothéliales et son activité anti-apoptotique est dépendante de uPAR (181). Ces souris étaient caractérisées par une fibrose (dermique, pulmonaire et cardiaque) survenant en parallèle d'une apoptose endothéliale et d'une raréfaction capillaire, mimant l'atteinte vasculaire observée au cours de la ScS.

Différentes cellules et médiateurs sont impliqués dans l'activation des fibroblastes secondaire à la vasculopathie:

- Les cellules endothéliales activées peuvent sécréter des facteurs pro-fibrotiques (ET-1, CTGF, TGF- β , platelet-derived growth factor (PDGF) et IL-6) qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, leur différenciation en myofibroblastes et la production de matrice extracellulaire (182,183).
- L'endothélium activé exprime des molécules d'adhésion et des cytokines/chémokines responsables de l'attraction au niveau périvasculaire d'un infiltrat inflammatoire

susceptible d'activer secondairement les fibroblastes, par la sécrétion de cytokines pro-fibrotiques, telles que l'IL-6, l'IL-13 et le TGF- β (187).

- Les plaquettes activées peuvent également contribuer à la prolifération fibroblastique par sécrétion de médiateurs pro-fibrotiques contenus dans leurs granules, notamment le PDGF, CXCL4 ou platelet factor 4 (PF4) (qui est également synthétisé par les cellules dendritiques) et la sérotonine (184–186).
- L'hypoxie chronique induite par le vasospasme et le remodelage de la paroi vasculaire est impliquée dans l'activation des cellules mésenchymateuses et dans la perpétuation du processus de fibrose (165).

Ainsi, l'atteinte vasculaire joue un rôle important et probablement initiateur dans la physiopathologie de la ScS.

2. L'atteinte inflammatoire dysimmunitaire

Le système immunitaire aussi bien inné qu'adaptatif est impliqué dans la pathogénie de la ScS. Suite à un facteur environnemental sur un terrain génétique particulier, il existe une activation du système immunitaire dérégulée conduisant à un recrutement de lymphocytes T, B, de monocytes/macrophages dans les lésions dermiques et les organes atteints et à des phénomènes d'auto-immunité.

L'importance de la phase dysimmunitaire dans le processus de fibrose est soulignée par l'observation d'une production de collagène accrue dans les fibroblastes adjacents à l'infiltrat inflammatoire.

a) Rôle de l'immunité innée

i. Rôle des monocytes, macrophages et mastocytes :

Les monocytes et les macrophages infiltrent de manière précoce la peau des patients avec une ScS débutante (159,160). Ces cellules sont également observées dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine et dans le modèle murin de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) (graft-versus-host disease) (187). Elles peuvent synthétiser des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques capables d'augmenter le chimiotactisme, la prolifération, la différenciation des myofibroblastes et leur synthèse de collagène. Par ailleurs, elles expriment

à leur surface de grandes quantités de molécules présentatrices d'antigènes et pourraient ainsi induire l'activation des lymphocytes T.

Le rôle des macrophages est souligné par les études récentes qui ont mis en évidence un phénotype activé de type M2 des macrophages au cours de la ScS. Sous l'influence de stimuli environnementaux, les macrophages peuvent se différencier en différents sous-types, principalement classés en activation classique (M1) ou alternative (M2). La polarisation M2 est marquée par une synthèse de cytokines pro-fibrotiques telles que l'IL-4, IL-10, IL-13, CTGF et IL-6, ainsi que de l'enzyme arginase-1 qui peut stimuler la synthèse de collagène. Ainsi, les taux de CD163, un marqueur de macrophages de type M2, sont augmentés dans le sérum des patients ScS ainsi que sur les macrophages présents dans la peau fibrotique et les poumons de patients (188,189). Toutefois, les mécanismes impliqués dans la différenciation des macrophages demeurent inconnus.

De nombreux mastocytes, notamment des mastocytes dégranulés, infiltrent la peau des malades dès le début de la maladie, à la fois au sein des lésions de fibrose mais également en peau saine (190). Plusieurs données *in vivo* dans des modèles murins de la maladie ont mis en exergue le rôle des mastocytes au cours de la ScS. Chez les souris tight-skin 1 (tsk-1), reflétant les stades tardifs de la maladie, la densité des mastocytes cutanés est augmentée en comparaison à des souris contrôles et il existe une corrélation entre l'étendue de la sclérose cutanée et l'augmentation des mastocytes (191). Ces cellules libèrent de l'IL-4 et des protéases dont la chymase 4 dont la production est corrélée à la survenue des lésions de fibrose chez la souris tsk-1. Par ailleurs, l'inhibition de la chymase 4 permet une diminution des lésions de fibrose et de l'activation des fibroblastes dépendant du TGF- β dans ce modèle (192). Enfin, dans le modèle murin de fibrose induite par la bléomycine, un déficit en mastocytes retarde l'apparition de la fibrose cutanée (193).

ii. Rôle des polynucléaires neutrophiles

Un rôle des polynucléaires neutrophiles a été suggéré : ils sont en nombre augmenté dans la peau lésionnelle des patients en comparaison à des contrôles (194).

Des études anciennes ont suggéré qu'ils pourraient contribuer au stress oxydant, par la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène. Toutefois, les études récentes *in vitro* n'ont pas confirmé ces données (195,196). Par ailleurs, les études anciennes étaient limitées

par les procédures d'isolation des polynucléaires neutrophiles, qui pouvaient en elles-mêmes entraîner une activation des neutrophiles (197,198).

Toutefois, les études protéomiques plaident pour un rôle des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de la ScS avec l'expression de marqueurs d'activation des polynucléaires neutrophiles (196). Enfin, l'IL6 pourrait contribuer à l'activation et à l'apoptose des cellules endothéliales et cet effet dépendrait de la présence de polynucléaires neutrophiles (196).

iii. Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes et voie de l'interféron de type 1

Les lésions endothéliales entraînent la libération de DAMPs (danger-associated molecular patterns), responsables d'un recrutement et d'une activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes via les TLR. Cette activation va entraîner une sécrétion de cytokines et chémokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques telles que l'IL-4, l'IL-6, l'IL-13 et PF4 (CXCL4) (également synthétisé par les plaquettes activées) (184).

Dans une étude protéomique récente, l'analyse du surnageant de cellules dendritiques plasmacytoïdes, a mis en évidence une augmentation des taux de CXCL4 avec des taux plus élevés dans les formes cutanées diffuses de la maladie par rapport aux formes cutanées limitées et dans les formes précoces par rapport aux formes tardives (184). CXCL4 était aussi détecté dans la peau de patients ScS (et non dans celle de sujets contrôles sains) et son taux était corrélé à la fibrose dermique et pulmonaire ainsi qu'à la présence et à la sévérité d'une HTAP. *In vivo*, dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine, une perfusion de CXCL4 a entraîné une augmentation de l'infiltrat inflammatoire, de l'épaisseur dermique et de l'expression de CCL2 (MCP-1), qui est une chémokine pro-fibrotique.

Ces cellules dendritiques plasmacytoïdes recrutées vont également activer la voie de l'interféron de type 1, à l'instar d'autres maladies auto-immunes telles que le lupus (158,199). Le rôle de cette voie au cours de la ScS a été souligné par les analyses transcriptomiques montrant une expression différentielle de gènes de la voie de l'interféron de type 1 dans les cellules mononuclées du sang périphérique, dans les monocytes et les lymphocytes T CD4+ de patients ScS (199–201). L'auto-immunité partagée entre la ScS et le lupus érythémateux systémique avec des gènes de susceptibilité communs à ces 2 maladies, la plupart induits par l'interféron (comme nous l'avons vu précédemment) va également dans ce sens (202). La voie de l'interféron de type 1 reflète l'activation de la voie de signalisation des TLR.

Les TLR ont également été impliqués dans la persistance du phénotype activé des fibroblastes notamment TLR4 (203). Au cours des processus infectieux, les TLR peuvent reconnaître des motifs moléculaires uniquement présents chez ces microorganismes pathogènes dénommés PAMPs pour "pathogen-associated microbial patterns", tels que les lipopolysaccharides. Mais au cours des processus inflammatoires non infectieux, ils peuvent également reconnaître des DAMPs libérés au cours de dommages cellulaires, comme les lésions endothéliales. Le TLR4 est surexprimé dans la peau et les poumons de patients atteints de ScS ainsi que dans le modèle murin de fibrose dermique induite par la bléomycine (204). Par ailleurs, une surexpression constitutive de TLR4 dans les fibroblastes les rend sensibles à l'action du TGF- β avec activation des fibroblastes, différenciation en myofibroblastes et production de collagène. L'inactivation et l'inactivation de TLR4 empêchent l'activation des fibroblastes *in vitro* et préviennent le développement de la fibrose dans le modèle murin de fibrose dermique induite par la bléomycine. La voie de signalisation du TLR4 fait intervenir une voie dépendante de MyD88 avec pour résultante une activation de la voie NF κ B et des MAP kinases, entraînant une activation du facteur de transcription AP-1 dont le rôle pro-fibrotique a déjà été suggéré par plusieurs études (136,205). Le stimulus activant TLR4 n'est pas connu, mais un grand nombre de ligands ont été identifiés, tels que la protéine de choc heat shock protein (HSP), la fibronectine ou HMGB (high-mobility group box)-1 (203,206). Ces molécules dérivées de l'hôte pourraient être relarguées par la cellule dans un contexte de dommage cellulaire ou de stress oxydant.

Enfin, il a été suggéré que les auto-anticorps contre des antigènes ubiquitaires de la ScS (tels que les anti-topoisomérase de type 1) formeraient des complexes immuns avec leur antigène cible, ces complexes pourraient être capturés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes via le récepteur Fc γ , interagir avec les TLR endovésiculaires et induire la production d'interféron- α (IFN- α) (Figure 15). Ces données suggèrent donc un lien entre immunité innée et adaptative au cours de la ScS.

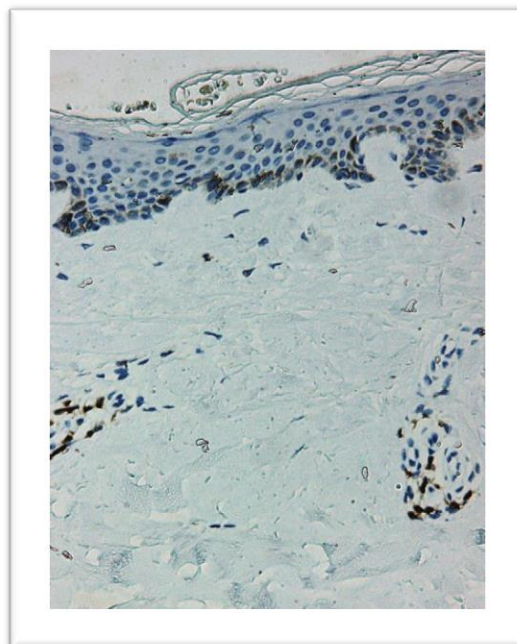
b) Rôle des lymphocytes T dans la physiopathologie de la maladie

Les lymphocytes T semblent jouer un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie et ce à 2 niveaux différents (158). D'une part, du fait de leur fonction auxiliaire qui permet aux lymphocytes B de générer des (auto)-anticorps de haute affinité et d'autre part du fait de leur rôle pro-fibrotique *in situ* avec infiltration de la peau et des organes fibrotiques par les

lymphocytes T et synthèse par ces lymphocytes T de cytokines et facteurs de croissance, capables d'activer les fibroblastes.

Le rôle important des lymphocytes T dans la physiopathologie de la ScS est souligné par (i) l'infiltrat lymphocytaire T précoce dans la peau lésionnelle et les organes touchés (207) (Figure 12) et (ii) par la corrélation entre l'activité/sévérité des formes cutanées diffuses et le taux sérique du CTLA-4 soluble (208). L'infiltrat lymphocytaire T est constitué majoritairement de lymphocytes T CD4+ (209).

Figure 12: Infiltrat lymphocytaire T dermique au cours de la ScS



Cette image représente une coupe histologique de peau fibrotique de patient ScS atteint d'une forme cutanée diffuse après marquage pour le CD3 en immunohistochimie (révélation par le 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)) et contre-coloration par l'hémalum. Les coupes sont observées en microscopie optique au grossissement x 200 et on note un infiltrat dermique de cellules mononuclées marquées par le CD3, en particulier au niveau périvasculaire (lymphocyte T).

Il existe une restriction d'hétérogénéité du répertoire TCR des lymphocytes T infiltrant la peau et les organes cibles de la ScS témoin d'une expansion oligoclonale T locale en réponse à un nombre restreint d'épitopes auto- ou allogéniques. L'hypothèse d'une réaction allogénique est celle du microchimérisme, suggérant qu'au cours de la grossesse, des lymphocytes T d'origine fœtale reconnaissant les antigènes non HLA compatibles de la mère traverseraient le placenta et constitueraient ainsi des allo-antigènes, reconnus par les

lymphocytes T maternels. Cette hypothèse est soutenue par la mise en évidence de lymphocytes T masculins dans la peau et le sang des patientes ScS. Cependant, son rôle pathogène n'est pas établi (210).

La synthèse de collagène évaluée par la localisation du pro-collagène I α est plus importante dans les fibroblastes adjacents à l'infiltrat inflammatoire (211,212). Cela suggère que les cellules inflammatoires, en particulier les lymphocytes T, jouent un rôle dans l'activation des fibroblastes. Dans ce contexte, certaines études ont mis en évidence le rôle d'un facteur déjà identifié dans la greffe d'organes, AIF-1 (allograft inflammatory factor-1). Ce facteur semble être capable d'activer la migration des lymphocytes T dans les tissus et de leur conférer un phénotype favorisant la fibrose.

Les lymphocytes T CD4⁺ se décomposent en sous-groupes, selon les cytokines secrétées : les lymphocytes Th1, lymphocytes Th2 (T-helper cell type 2) et les lymphocytes Th17.

i. Balance Th1-Th2

Les données transcriptomiques obtenues dans des modèles murins de fibroses dermique et hépatique ont mis en exergue le rôle de la voie Th2 dans la fibrogénèse et le remodelage de la matrice extra-cellulaire (213,214). Cette voie est caractérisée par la production de cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 ou l'IL-21, qui peuvent activer les fibroblastes et stimuler la synthèse de collagène (158,215–219).

Ainsi, l'IL-4 et l'IL-13 activent la transcription du gène du collagène de type 1A2 dans des fibroblastes dermiques (182). L'IL-4 peut par ailleurs activer la prolifération fibroblastique, la synthèse de composants de la matrice extracellulaire et stimuler la production de TGF- β et de cytokines pro-fibrotiques telles que l'IL-6. Il contribue à l'infiltrat inflammatoire périvasculaire mononucléé en augmentant l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales.

L'IL-13 pourrait contribuer à la fibrose par stimulation de la production de TGF- β par les macrophages, mais également par des mécanismes indépendants du TGF- β (220,221). Les souris invalidées pour l'IL-13 sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par le fluorescéine isothiocyanate (FITC), tandis que l'hyperexpression d'IL-13 est associée à une fibrose pulmonaire (222).

En outre, les lymphocytes Th2 inhibent les métalloprotéases matricielles, impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, déséquilibrant encore d'avantage la balance

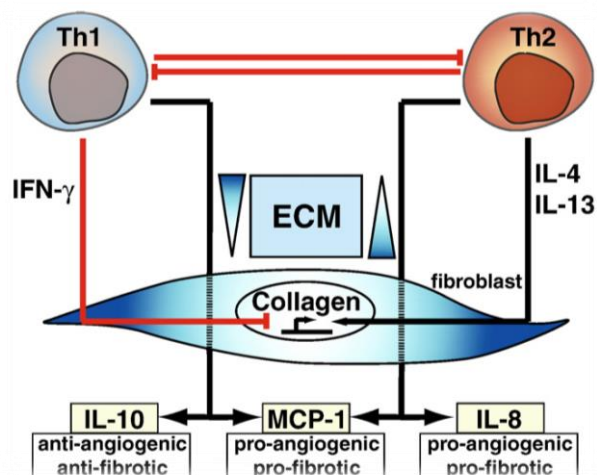
formation-résorption. Renforçant cette hypothèse, il a été montré que le switch d'une voie Th2 vers une voie Th1 était associé à une amélioration de la fibrose dermique (223). Toutefois, le facteur ou les facteurs responsables de la différenciation des lymphocytes vers une voie Th2 demeurent mal connus.

Les lymphocytes sécrètent également de façon moindre des cytokines de type Th1 (IFN-gamma, IL-1 et IL-2) qui ont un effet anti-fibrotique et stimulent la production de métalloprotéases matricielles (MMP), en relarguant de l'IFN-gamma ou par contact avec direct avec les fibroblastes. La polarisation Th1-Th2 des lymphocytes est représentée dans la Figure 13.

Il a été mis en évidence dans la peau de ScS précoces un infiltrat de lymphocytes T double positifs CD4+CD8+, alors que ces derniers sont habituellement mutuellement exclusifs. Ces lymphocytes T produisaient de grandes quantités d'IL-4 (158).

Figure 13 : Balance Th1-Th2 au cours de la ScS,

Extrait de Chizzolini C. et al. Autoimmun Rev 2011 (158)



Sur cette figure, sont représentés la polarisation Th1/Th2 des lymphocytes et l'effet de ces lymphocytes et des cytokines et chémokines synthétisées sur les fibroblastes et leur synthèse de matrice extracellulaire (flèche noire : activation ; flèche rouge : inhibition).

ii. Rôle des lymphocytes T Th17

Le rôle des lymphocytes T Th17 dans la ScS reste débattu (224). Ils synthétisent l'IL17-A et IL17-F, qui se lient toutes deux au même récepteur hétérodimérique IL-17RA et IL-17 RC,

qui est exprimé par les fibroblastes et les cellules endothéliales au cours de la ScS. Les lymphocytes T Th17 sont augmentés dans le sang périphérique de patients ScS (225).

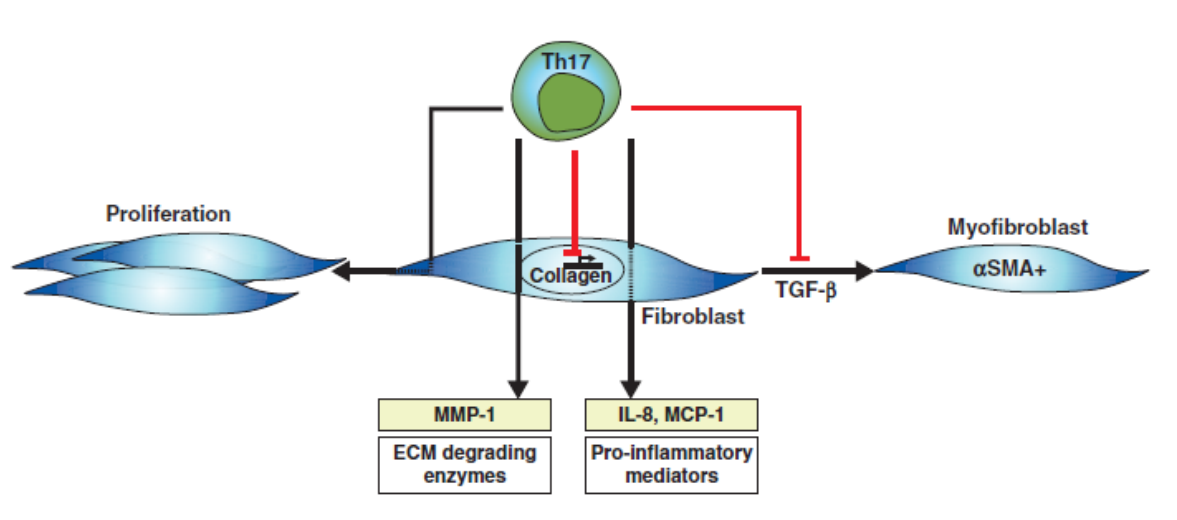
Par ailleurs, les taux sériques d'IL-6 et IL-23 qui sont des cytokines importantes pour la différenciation et l'expansion des lymphocytes T Th17 sont augmentés au cours de la ScS (226,227). Les taux d'IL17-A sont augmentés dans le sérum de patients ScS, d'après deux études (228,229) et l'ARNm de l'IL17A et la protéine sont augmentés dans la peau des patients ScS (224,228,230).

Les données obtenues dans les modèles murins plaident pour un rôle des lymphocytes T Th17 dans la physiopathologie de la ScS: le blocage de l'IL17-A prévient la fibrose dermique et pulmonaire liée à la bléomycine (231–233). L'inactivation de l'IL-17A prévient la fibrose non inflammatoire dans le modèle tsk-1 (232). Et l'IL-17 A a un effet pro-fibrotique *in vitro* favorisant la production de TGF- β , de CTGF et de collagène par les fibroblastes dermiques murins.

En revanche, les données obtenues chez l'homme plaident pour un effet anti-fibrotique des Th17. Ainsi, dans la peau, il existe une corrélation inverse entre le nombre de cellules IL-17 A positives et l'étendue de la fibrose (230). *In vitro*, l'IL17A stimule la production de cytokines pro-inflammatoires et d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire par les fibroblastes dermiques et cardiaques et inhibe la production de collagène de type I (234–236). L'IL17A inhibe l'induction d' α -SMA (alpha-smooth muscle actin) par le TGF- β , limitant ainsi la transformation des cellules mésenchymateuses en myofibroblastes (230,234). L'effet des cellules Th17 sur le fibroblaste est résumé dans la Figure 14.

FIGURE 14 : Effet des cellules Th17 sur le fibroblaste chez l'homme

Extrait de Brembilla N. C and Chizzolini C, Eur Cytokine Netw. 2012 (224)



Sur cette figure, est représenté l'effet des cellules Th17 sur les fibroblastes humains. L'effet semble majoritairement anti-fibrotique avec inhibition de la production de collagène, de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la production d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire. Mais l'effet pro-fibrotique pourrait être médié par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 et MCP-1. Flèche noire : activation ; Flèche rouge : inhibition. α -SMA : alpha-smooth muscle actin

iii. Rôle des lymphocytes T régulateurs

Il semblerait qu'il y ait au cours de la ScS une diminution des lymphocytes T CD4⁺ CD8⁺ régulateurs ainsi que de leur facteur de transcription Runx-1 et une altération de leur fonction, y compris aux stades précoces (237–243). Cela a été confirmé par les données tissulaires avec une diminution de l'infiltrat de lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺ dans la peau de sujets ScS en comparaison à des contrôles avec également une diminution au niveau de l'ARNm avec moins de transcrits FoxP3 identifiés (237,244). Dans une étude récente, les lymphocytes T régulateurs présents dans la peau fibrotique des patients produisaient des quantités significatives des cytokines pro-fibrotiques IL-4 et IL-13 (245).

iv. Données des modèles animaux

La contribution des lymphocytes T au développement de maladies fibrosantes a été étudiée dans des modèles animaux. Dans le modèle de GVHD sclérodermiforme, la maladie se développe quand des cellules hématopoïétiques des souris B10.D2 sont transplantées dans des souris BALB/c incompatibles pour des antigènes mineurs, après irradiation létale (246). Ces souris développent trois semaines après la transplantation une fibrose cutanée et pulmonaire

dépendant de la présence de lymphocytes T, de la production de TGF- β par les macrophages et de la production de chémokines, en particulier MCP-1 (247–249).

Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont les données transcriptomiques obtenues dans des modèles murins qui ont souligné le rôle des cytokines Th2. Renforçant le rôle des lymphocytes Th2, un traitement de souris Tsk-1 avec un anticorps monoclonal anti-IL4 a permis de prévenir le développement de la fibrose (250).

v. **Limites**

Toutefois, certaines observations dans des modèles murins nuancent ces données. Dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine, la fibrose dermique se développe même en l'absence de lymphocytes T (251,252). De même, dans le modèle génétique Tsk-1, la fibrose se développe même si les souris sont croisées avec des souris scid (severe combined immunodeficiency), dépourvues de système immunitaire adaptatif (253,254).

c) ***Rôle des lymphocytes B***

Le rôle du lymphocyte B semble important au cours de la ScS :

Les lymphocytes B infiltrent de manière précoce le derme et les poumons des patients ScS (mais en quantité moindre par rapport aux lymphocytes T) (161,162,255).

Les données de transcriptomique ont mis en évidence une expression différentielle de gènes du lymphocyte B dans la peau de patients ScS, en comparaison à des témoins sains (256).

Dans le sang périphérique, la densité en CD19 à la surface des lymphocytes B de patients est significativement plus élevée (d'environ 20%) comparativement à des sujets sains, tandis que l'expression des molécules CD20, CD22 et CD40 est normale (257).

Les taux du facteur de survie des lymphocytes B BAFF (B-cell-activating factor) sont augmentés dans le sérum et la peau de patients ScS (258).

Outre l'infiltrat lymphocytaire B et la production d'anticorps, les lymphocytes B peuvent produire de l'IL-6 capable de stimuler les fibroblastes. Le rôle pro-fibrotique de l'IL-6 est détaillé dans la partie II.3.

i. Données obtenues dans les modèles murins

Les données obtenues dans les modèles murins de ScS vont également dans le sens d'un rôle du lymphocyte B. Dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine, l'inactivation du CD19 prévient le développement de la fibrose. Dans ce travail, l'activation de la voie TLR4 stimulait la production d'auto-anticorps et de cytokines pro-fibrotiques par le lymphocyte B et l'inactivation du CD19 inhibait cette production, ce qui va dans le sens d'un rôle synergique du CD19 et du TLR4, favorisant la production de cytokines pro-fibrotiques par le lymphocyte B (259).

Dans le modèle murin de la souris *tsk-1*, les lymphocytes B ont un phénotype activé caractérisé par une expression accrue du CD19 à leur surface et il existe une corrélation entre cette expression et la survenue des lésions de fibrose. De plus, un défaut d'expression du CD19 diminue les lésions de fibrose (260). Dans ce modèle, la déplétion en lymphocytes B par un anti-CD20 murin diminue les taux d'auto-anticorps, la fibrose cutanée et restaure la balance Th1-Th2, lorsque le traitement est administré avant le développement de la fibrose (261). De même, l'inhibition de BAFF prévient le développement de la fibrose hypodermique (262).

Enfin, les voies de costimulation du lymphocyte B permettant l'activation du lymphocyte B semblent importantes dans les mécanismes de fibrose, dans le sens où un blocage de la voie CD40-CD40L par des injections répétées de CD40L à des souris *tsk-1* nouvellement nées réduit la fibrose hypodermique de 65% et la production d'anticorps (263).

ii. Rôle pathogène des auto-anticorps

Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle pathogène des auto-anticorps dirigés contre les antigènes ubiquitaires dans la ScS.

Les anticorps anti-topoisomérases 1 sont associés aux formes sévères de la maladie (forme cutanée diffuse, association à une fibrose pulmonaire) (264), ils sont présents avant le début des symptômes (265), leur titre est corrélé avec l'activité et la sévérité de la maladie (266) et certains patients chez qui ces anticorps ont disparu ont présenté une amélioration du score cutané, de la fonction pulmonaire et de la survie, en comparaison aux patients chez lesquels ces anticorps étaient toujours détectés. Par ailleurs, ces anticorps anti-topoisomérases de type 1 sont détectés dans le modèle murin de ScS induit par l'acide hypochloreux (267).

Ces données plaident de façon indirecte pour un rôle pathogène des anticorps anti-topoisomérase 1; certaines données récentes suggèrent un rôle pathogène direct des anti-topoisomérase 1. Tout d'abord, les anti-topoisomérase 1 purifiés à partir du sérum de patients ScS peuvent se lier à la surface des fibroblastes humains (268). De plus, la topoisomérase 1 (auto-antigène cible des anticorps anti-topoisomérase 1) peut également se lier à la surface des fibroblastes et cette liaison est nécessaire au recrutement des anticorps anti-topoisomérase 1 (269). Cependant, la topoisomérase 1 est une enzyme uniquement intranucléaire. Des travaux se sont intéressés aux mécanismes permettant à la topoisomérase 1 de se retrouver à la surface cellulaire et de se lier aux fibroblastes. Ils ont montré que la topoisomérase pouvait être relarguée suite à l'apoptose des cellules endothéliales après nécrose secondaire et se lier aux fibroblastes. Cette liaison s'effectue par interaction avec le CCR7, un récepteur de chémokine présent à la surface des fibroblastes et entraîne l'activation de voies de signalisation stimulant la migration des fibroblastes (270). Par ailleurs, la liaison de la topoisomérase 1 à la surface des fibroblastes entraîne l'adhésion et l'activation des monocytes (269). La topoisomérase 1 utilise les protéoglycanes à héparane sulfate comme corécepteurs et cette liaison topoisomérase 1- protéoglycanes à héparane sulfate est amplifiée en présence d'anticorps anti-topoisomérase 1 (271). Ainsi, ces données plaident en faveur d'un rôle pathogène des anticorps anti-topoisomérase 1 en présence de la topoisomérase 1 dans la ScS. Le complexe immun topoisomérase 1-anticorps anti-topoisomérase 1 à la surface des fibroblastes pourrait contribuer à l'initiation d'une cascade inflammatoire propice au développement d'une fibrose.

Les anticorps anti-centromères, anti-CENP-B, sont les auto-anticorps observés dans les formes cutanées limitées de la ScS, formes associées à un pronostic plus favorable, mais ces formes ont un risque vasculaire augmenté, notamment d'HTAP. Il a été montré que la protéine CENP-B pourrait être libérée dans le milieu extracellulaire suite à l'apoptose des cellules endothéliales et pourrait se lier spécifiquement aux cellules musculaires lisses vasculaires (et non aux fibroblastes ou aux cellules endothéliales), en particulier aux cellules musculaires lisses présentant un phénotype contractile (272). Cette liaison s'effectue via le récepteur de chémokines 3 CCR3 et entraîne l'activation du récepteur EGF, responsable d'une activation de la voie des MAP kinases, de la sécrétion d'IL-8 et de la migration des cellules musculaires lisses au niveau d'un site de lésion vasculaire où la CENP-B serait présente dans le milieu extracellulaire, suite à l'apoptose des cellules endothéliales (273). Il a ensuite été montré que les auto-anticorps anti-CENP-B pourraient abolir cette cascade de signalisation, empêchant ainsi l'effet de la CENP-B et donc le processus de réparation vasculaire normal.

Les auto-anticorps anti-RNA polymerases III sont rares. Récemment, une étude a suggéré que ces auto-anticorps pourraient dériver de cellules cancéreuses des sujets ScS (70). En effet, il existe une fréquence accrue de cancers chez les patients avec anticorps anti-ARN polymérase de type III et ces cancers surviennent en relation temporelle étroite avec la ScS (69). Cette équipe a pu étudier l'ADN tumoral de tissu de malades avec ScS et cancer et a mis en évidence des mutations somatiques du gène POLR3 alors que ce n'était jamais observé chez des malades avec ScS et cancer mais sans anticorps anti-ARN polymérase III. La caractérisation immunologique des cellules T CD4⁺ des patients avec ScS et cancer a montré la présence de cellules T réactives au peptide relatif aux mutations de POLR3 avec une réactivité patient, peptide et HLA spécifique. Ces lymphocytes T CD4⁺ entraînaient ensuite une activation des lymphocytes B produisant des anticorps anti-ARN polymérase III mutée mais reconnaissant également l'ARN polymérase III naïve (70). Ainsi, la ScS pourrait parfois être un syndrome paranéoplasique, déclenchée par l'exposition à un stimulus tumoral présentant un mimétisme moléculaire avec un antigène du soi (ARN polymérase III) par réaction croisée.

Des auto-anticorps dirigés contre des auto-antigènes non ubiquitaires ont été décrits au cours de la ScS. L'identification de leur rôle pathogène a permis de mettre en évidence des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la ScS.

Les anticorps anti-fibroblastes sont détectés chez 20 à 40% des patients ScS avec une prévalence plus importante dans les formes cutanées diffuses (158,274). *In vitro*, ils pourraient induire après liaison aux fibroblastes via le TLR4 un phénotype pro-inflammatoire et pro-adhérent avec augmentation de l'expression de l'IL-6 et d'ICAM-1, comme cela est observé au cours de la ScS (Figure 15). Cette activation entraîne la production par le fibroblaste de chémokines pro-fibrotiques et pro-angiogéniques comme MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) et IL-8 et l'activation des voies de signalisation ERK 1/2 (extracellular-signal-regulated kinases), c-Jun et NFκB (275). Toutefois, certains travaux ont mis en évidence une double spécificité des anticorps anti-fibroblastes, soulevant le problème d'une possible confusion avec d'autres anticorps, en l'occurrence les anticorps anti-cellules endothéliales et les anticorps anti-nucléaires (276,277).

Des anticorps anti-PDGF récepteurs ont été détectés au cours de la ScS et aussi de la GVHD (278,279). Ils pourraient induire la différenciation des fibroblastes résidents en myofibroblastes et la production de composants de la matrice extracellulaire notamment du collagène de type I par la voie de signalisation ERK1/2 avec synthèse de formes réactives de

l'oxygène. Toutefois, ces résultats n'ont pas été répliqués par d'autres équipes indépendantes (279–281).

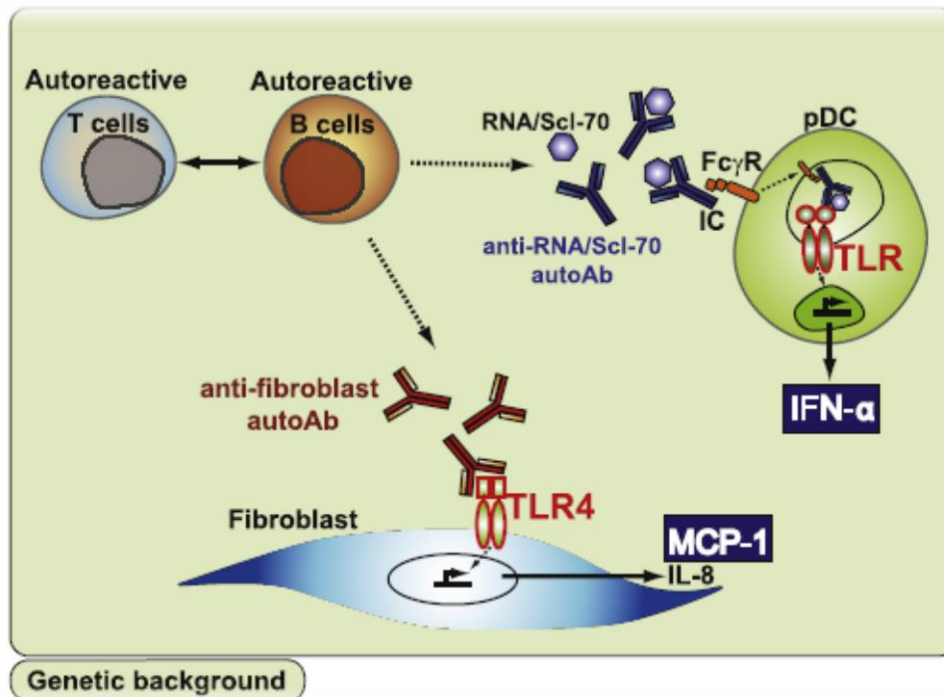
Des anticorps anti-fibrilline 1 ont été détectés chez des patients atteints de ScS, mais aussi dans d'autres maladies auto-immunes, ainsi que chez la souris *tsk-1* (282,283). Ils pourraient activer les fibroblastes et induire la synthèse de collagène, probablement par relargage du TGF- β lié à la fibrilline-1 (284).

Des anticorps anti-cellules endothéliales sont présents chez 25 à 85% des patients ScS, mais sont également observés dans d'autres maladies auto-immunes (285,286). Ils ont été associés à la survenue d'ulcères digitaux et d'une HTAP, ainsi qu'au stade tardif sévère de la capillaroscopie, caractérisé par la présence de plages avasculaires (287). Ils entraîneraient une apoptose des cellules endothéliales et le relargage de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques avec activation secondaire des fibroblastes (288).

Des anticorps anti-MMP1 et 3 inhibant l'activité enzymatique de ces enzymes ont également été décrits (289,290).

Plus récemment, des anticorps anti-récepteurs AT1 de l'angiotensine et anti-récepteur à l'endothéline ont été détectés chez des patients ScS et semblent intéressants comme biomarqueurs pour prédire le développement d'ulcères digitaux ou d'une HTAP (291,292). Ils étaient plus fréquemment observés au cours des HTAP associées à la ScS ou à d'autres connectivites, en comparaison aux HTAP liées à d'autres causes. Par ailleurs, ils semblent avoir un intérêt pronostique avec une survie moindre chez les patients avec des titres élevés d'auto-anticorps. Enfin, ces anticorps ont montré leur capacité à induire une réponse vasoconstrictrice et une vasculopathie dans des modèles murins, confirmant ainsi leur rôle pathogène. Toutefois, ces données devront être répliquées dans de larges cohortes prospectives avant de pouvoir conclure.

Figure 15: Rôles du lymphocyte B au cours de la ScS
 Extrait de Chizzolini C. et al. Autoimmun Rev 2011 (158)



Au cours de la ScS, le lymphocyte B synthétise des auto-anticorps contre des antigènes ubiquitaires tels que les anti-Scl70 qui forment des complexes immuns avec leur antigène cible et sont capables d'activer les cellules dendritiques plasmacytoïdes et la voie de l'IFN- α via les toll like receptors. Ils synthétisent d'autres anticorps, tels que les anti-fibroblastes capables d'activer les fibroblastes.

d) Relation dysimmunité-vasculopathie

Plusieurs études ont suggéré un rôle de la dysimmunité dans la vasculopathie. Il a été mis en évidence une régénération capillaire après chimiothérapie par cyclophosphamide suivie d'une autogreffe de cellules souches, suggérant que la raréfaction capillaire au cours de la ScS est réversible (293). Une des hypothèses émises par les auteurs est que la dysimmunité observée au cours de la ScS serait responsable de la vasculopathie et/ou du défaut des systèmes de réparation vasculaire. La chimiothérapie, en déplaçant les lymphocytes B et T, libérerait les processus d'angiogénèse et de vasculogénèse.

Dans une autre étude portant sur un modèle murin de ScS, la déplétion en lymphocytes T Th2 ou en IL-13 a amélioré la vasculopathie (294).

Par ailleurs, l'expression de lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) sur les lymphocytes T CD3 est plus élevée et celle de la L-selectine plus basse chez des patients ScS avec HTAP, en comparaison à des patients sains ou à des patients ScS sans HTAP (295). Ces

taux se normalisent après traitement par Bosentan, un antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline, utilisé comme traitement de l'HTAP. Ces résultats suggèrent que l'interaction lymphocyte T-endothélium joue un rôle dans la vasculopathie au cours de la ScS.

3. La fibrose

La fibrose est la caractéristique spécifique de la ScS ; elle correspond au remplacement d'un tissu normal par une matrice enrichie en collagènes, perturbant le fonctionnement normal du tissu touché et aboutissant à une défaillance d'organe au stade ultime. Elle semble résulter d'un défaut dans les processus normaux de cicatrisation (182).

La fibrose est la résultante d'une balance dérégulée entre augmentation de la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire, augmentation de l'assemblage et de la formation de ponts entre les fibres de collagène matures par la prolyl, la lysyl oxydase et la transglutaminase 2 et défaut de dégradation des constituants de la matrice extracellulaire (296). Au cours de la fibrose, il existe une accumulation de collagène et autres constituants de la matrice extracellulaire (acide hyaluronique, fibronectine, tenascine C et protéoglycanes).

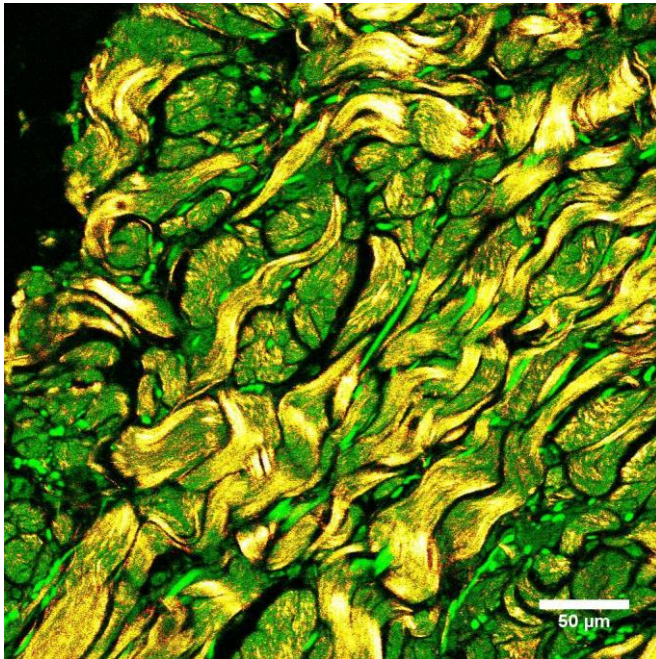
Une fois le processus de fibrose initié, il est auto-entretenu par multiples boucles d'amplification liées aux dommages tissulaires. Ainsi, l'hypoxie, l'augmentation de la rigidité de la matrice extracellulaire, le stress oxydant et l'accumulation de DAMPs résultant de la fibrose tissulaire, peuvent pour chacun d'entre eux activer les fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes.

a) La fibrose dermique

La fibrose dermique caractéristique au cours de la ScS correspond au remplacement du tissu cutané normal par un tissu acellulaire, riche en collagène et peu élastique. Le derme est épaissi avec disparition du tissu adipeux hypodermique. On note un dépôt de fibres collagènes denses et épaissies constituées de collagènes fibrillaires (type I et III), de collagène de type V et VII. La technique de microscopie optique par génération de seconde harmonique permet de mettre en évidence une désorganisation de l'architecture tridimensionnelle du collagène avec perte de la structure fibrillaire organisée dans la ScS en comparaison à des témoins (Figures 16 et 17) (297). Les taux des enzymes impliquées dans les modifications post-transcriptionnelles du collagène, comme la lysyl hydroxylase et la lysyl oxydase sont augmentés. Il existe une raréfaction en vaisseaux lymphatiques et capillaires du tissu

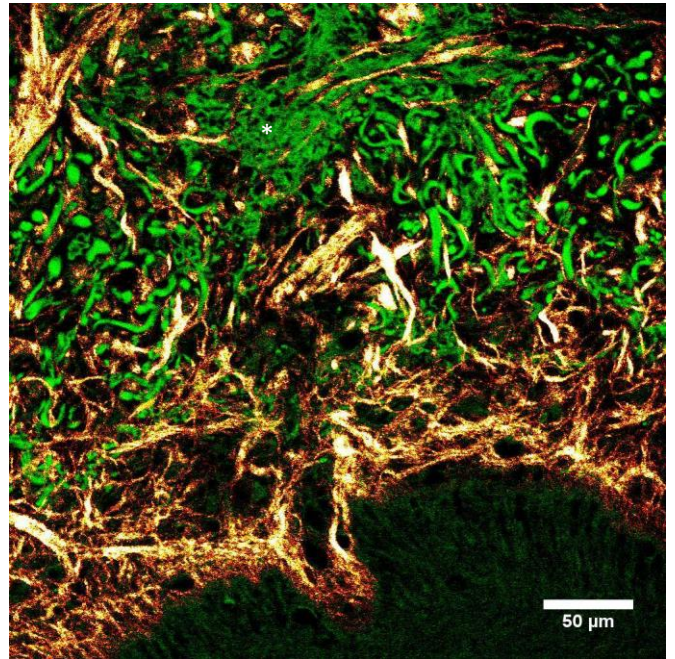
fibrotique, responsable d'une hypoxie chronique avec production de VEGF et facteurs angiogéniques (298).

Figure 16 : Coupe de derme d'un contrôle sain observée en microscopie optique par génération de seconde harmonique



Sur cette image, les fibres de collagène présentent une organisation régulière avec formation de ponts. La structure est fibrillaire.

Figure 17 : Coupe de derme d'un patient ScS observée en microscopie optique par génération de seconde harmonique



On observe une désorganisation et un épaissement des fibres de collagène (orangées) dans la ScS avec disposition anarchique et envahissement de l'interstitium par des fibres de collagène. En vert, est représentée l'autofluorescence du tissu. On note également la présence d'élastine (étoile)

b) Les données d'expression génique

Les analyses transcriptomiques ont mis en évidence une expression différentielle de gènes impliqués dans la production de matrice extracellulaire et dans les voies de signalisation du TGF- β , du CTGF et de la voie Wnt dans la peau lésionnelle (et saine) de patients ScS, en comparaison à des témoins sains (299).

c) *Les cellules mésenchymateuses*

i. *Anomalies intrinsèques des cellules mésenchymateuses*

Les cellules mésenchymateuses sont les principaux effecteurs du processus de fibrose: elles ont un état activé avec des capacités de synthèse, d'adhésion, de migration et contractiles augmentées (300). Elles peuvent synthétiser un certain nombre de chémokines et cytokines, expriment des molécules d'adhésion, ainsi que des récepteurs au TGF- β , au PDGF et au CGTF, qui sont des cytokines pro-fibrotiques.

Elles présentent une capacité accrue à se différencier en myofibroblastes dont les capacités de synthèse sont encore augmentées et dont le phénotype est proche de celui des cellules musculaires lisses avec notamment l'expression de l' α -SMA. Cette capacité accrue à se différencier en myofibroblastes serait en partie liée à une activation constitutive des FAK (focal adhesion kinase) (301). Ainsi, une inhibition de la phosphorylation des FAK diminue l'expression de l' α -SMA par les fibroblastes ScS (302). Les myofibroblastes constituent une source importante de TGF- β , cytokine majeure des processus de fibrose.

Contrairement au processus de cicatrisation normale, où les myofibroblastes permettant une contraction du tissu de granulation sont exprimés transitoirement et disparaissent par apoptose à la fin du processus; au cours de la fibrogénèse, les myofibroblastes persistent, résistent à l'apoptose et synthétisent de manière dérégulée de grandes quantités de matrice extracellulaire. Cette résistance à l'apoptose pourrait être liée à un défaut dans la voie de signalisation Fas/Fas ligand (300).

Différentes voies de signalisation et médiateurs sont impliqués dans la persistance d'un phénotype activé des cellules mésenchymateuses/fibroblastes.

a) *Mécanisme d'activation : le rôle de l'épigénétique*

Le phénotype activé des myofibroblastes persiste après plusieurs passages *in vitro*, ce qui peut s'expliquer par des modifications stables de leur profil d'expression génique, secondaires à des modifications épigénétiques.

Plusieurs modifications épigénétiques touchant les fibroblastes ont été rapportées au cours de la ScS : modification du profil de méthylation de l'ADN, altérations de méthylation ou d'acétylation ou de phosphorylation de protéines histones ou modifications d'expression (sur ou sous-expression) de certains micro-ARNs.

Parmi les modifications du profil de méthylation de l'ADN observées dans les fibroblastes ScS, il y a :

- un nombre important de sites CpG hypométhylés dans des fibroblastes de patients ScS, en comparaison à des fibroblastes contrôles dans une étude génome entier (303). La méthylation des îlots CpG, qui prédominent dans les régions régulatrices des gènes, est un mécanisme important dans l'inhibition de la transcription des gènes.
- une augmentation de la méthylation des îlots CpG dans la région du promoteur de Friend leukemia integration 1 (Fli1) and Krüppel-like factor 5 (KLF5), qui sont des suppresseurs de la transcription du collagène et qui sont sous-exprimés dans les fibroblastes ScS (304,305). Le rôle pathogénique de ces modifications a été mis en exergue par l'observation de souris transgéniques avec délétion d'une copie de ces deux gènes qui développent un phénotype proche de celui observé au cours de la ScS avec une fibrose dermique, une vasculopathie et une activation des lymphocytes B avec production d'auto-anticorps (305).
- une modification du profil de méthylation des îlots CpG du gène de l' α -SMA (306,307).
- une augmentation de la méthylation de la protéine SMAD 7, qui inhibe la voie du TGF- β , avec pour conséquence une répression de la transcription de SMAD7 entraînant une activation non contrôlée de gènes pro-fibrotiques (308).

Le rôle de l'ADN méthyltransférase 1 (Dnmt 1) a été souligné dans la fibrose rénale : la Dnmt 1 est responsable d'une augmentation de la méthylation de *RASAL1*, un gène codant pour un inhibiteur de l'oncoprotéine Ras, entraînant la persistance de l'activation des fibroblastes (309). La fibrose rénale est améliorée chez les souris hétérozygotes Dnmt1 (+/-).

Le rôle de la protéine MeCP2 (methylated DNA-binding protein) a également été mis en évidence. Cette protéine se lie au gène de l' α -SMA. La suppression de l'expression du gène MeCP2 par l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) ou son invalidation dans des fibroblastes pulmonaires a été associée à une réduction de l'expression de l' α -SMA (307). En accord avec ces résultats, l'induction de l'expression de MeCP2 dans les fibroblastes par un vecteur plasmidique augmente l'expression de l' α -SMA. De plus, *in vivo* les souris invalidées pour MeCP2 étaient protégées de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

Le rôle des modifications d'acétylation des histones au cours de la ScS a été souligné par deux études qui ont montré que l'inhibition pharmacologique d'histones déacétylases par la trichostatine A dans des fibroblastes inhibe la réponse pro-fibrotique *in vitro* en diminuant la synthèse de collagène et *in vivo* dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine (310,311). Le rôle de l'histone déacétylase 7 a notamment été suggéré, car son inhibition par

des SiRNA dans des fibroblastes *in vitro* diminue la synthèse de collagène, sans augmenter l'expression de molécules pro-fibrotiques (ICAM-1 et CTGF), contrairement à ce qui avait été observé avec la trichostatine (152).

Une phosphorylation augmentée des protéines Sp1 et Sp3 interagissant avec 3 régions du promoteur du gène COL1A2 a été détectée dans les fibroblastes ScS par rapport aux fibroblastes normaux(310,312).

Récemment, il a été mis en évidence une expression différentielle de nombreux micro-ARNs régulateurs dans les fibroblastes, la plupart intervenant dans la voie de signalisation du TGF- β (Tableau 3). Les micro-ARNs sont des petites séquences d'ARN hautement conservées qui régulent négativement l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel. Par exemple, une diminution de miR-29 qui est antifibrotique a été observée dans la peau de patients ScS et dans des fibroblastes explantés de patients Scs (313). Dans le poumon fibrotique, des niveaux bas de miR29 sont corrélés à une expression élevée de gènes pro-fibrotiques, notamment de gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire (314). L'inhibition de miR-29 par le TGF- β 1 ou l'inactivation de miR-29 dans des fibroblastes pulmonaires cultivés *in vitro* entraîne une hyperexpression de gènes pro-fibrotiques. De même, son inhibition avec des anti-miRs dans des fibroblastes cardiaques a un effet pro-fibrotique, tandis que son hyperexpression a un effet anti-fibrotique (315). Récemment, le rôle anti-fibrosant de miR-193b a été souligné (316). miR-193b est sous-exprimé dans les fibroblastes ScS et dans la peau des patients ScS, en comparaison à des contrôles. Cette étude suggère que cette sous-expression entraîne une augmentation de l'uPA dépendante du TGF- β avec pour conséquence une augmentation du nombre de cellules musculaires lisses au niveau des vaisseaux pulmonaires responsable de la vasculopathie proliférative.

Au contraire, d'autres micro-ARNs sont pro-fibrotiques et leur expression est augmentée au cours des processus de fibrose. miR-132 est impliqué dans l'inhibition de MeCP2, réduit l'expression de PPAR-gamma et augmente ainsi l'expression du gène de l' α -SMA dans les fibroblastes pulmonaires (317). De même, miR-21, dont le taux est augmenté dans les fibroblastes ScS, exerce son effet pro-fibrotique en inhibant Smad7, qui est anti-fibrotique (318,319). miR-92a a également été impliqué dans la physiopathologie de la ScS : il est surexprimé dans les fibroblastes ScS, où il diminue l'expression de la métalloprotéase MMP-1 (matrix metalloproteinase 1) qui est impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire (318).

b) Voies de signalisation impliquées

- Early growth response protein

Early-growth response protein 1 (Egr-1) est un facteur de transcription de la voie du TGF- β , indépendant de la voie SMAD. Il a été impliqué dans la réparation tissulaire et dans la fibrose (320). Son expression est augmentée dans des modèles animaux de fibrose et dans la peau lésionnelle et les poumons de patients atteints de ScS. Egr-1 régule l'expression de plusieurs facteurs pro-fibrotiques, tels que le TGF- β , le PDGF, le CTGF, le VEGF, la fibronectine et TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloprotease). Dans les cellules Hep-G2, Egr-1 induit la transition épithélio-mésenchymateuse qui participe au processus de fibrose. ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) régule l'expression d'Egr-1. Dans le modèle murin de fibrose dermique induite par la bléomycine, les souris invalidées pour Egr-1 sont protégées de la fibrose.

- ERK1/2

Il existe dans les fibroblastes ScS une activation permanente de la voie Erk1/2 accompagnée d'une production élevée de formes réactives de l'oxygène via la NADPH oxydase (321,322). Cette voie est impliquée dans la synthèse de collagène par les myofibroblastes et stimule la prolifération des fibroblastes en réponse aux facteurs de croissance.

- Notch

Cette voie est surexprimée dans les fibroblastes dermiques de patients ScS (323). La voie de signalisation Notch est importante dans la transition endothélio-mésenchymateuse et dans la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes (324,325). Cet effet semble médié par le facteur de transcription CSL qui peut interagir avec le promoteur du gène de l' α -SMA et entraîner l'activation de la transcription de ce gène.

La stimulation de fibroblastes dermiques *in vitro* par un ligand de Notch entraîne leur différenciation en myofibroblastes. Tandis que l'inhibition de cette voie diminue la synthèse de collagène par les fibroblastes *in vitro* et entraîne une prévention mais aussi une guérison de la fibrose dans des modèles murins de ScS (326).

- Wnt

Les données transcriptomiques ont mis en évidence une surexpression de la voie canonique Wnt au cours de la ScS (327). La stimulation de fibroblastes *in vitro* par des ligands de cette voie entraîne leur différenciation en myofibroblastes et l'activation de la voie *in vivo* dans un modèle murin entraîne une fibrose dermique (328,329).

- Les tyrosines kinases

Les tyrosines kinases ont pour fonction de transférer un phosphate d'un ATP sur certains acides aminés cibles. Les voies d'activation induites par la fixation de PDGF et de TGF- β sur leurs récepteurs respectifs peuvent être inhibées au moins partiellement par l'action des inhibiteurs de tyrosines kinases qui ont pour cible la tyrosine kinase c-Abl. La voie d'activation médiée par le TGF- β comporte également une voie tyrosine kinase-indépendante, mais Smad-dépendante, comme nous le verrons ensuite. Ces deux voies impliquant PDGF et TGF- β conduisent à la prolifération des fibroblastes et à la fibrose.

Dans des modèles murins de ScS, l'expression de la tyrosine kinase c-abl était augmentée et l'inhibition des tyrosines kinases par le Nilotinib ou l'Imatinib a permis de prévenir la fibrose dermique dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine et dans le modèle tsk-1 (330). De même, ce traitement a permis de prévenir la fibrose, mais aussi de la guérir dans le modèle GVHD (331). Toutefois, l'Imatinib, n'a pas montré d'efficacité sur l'atteinte cutanée dans un essai contrôlé randomisé en double aveugle (332) et son utilisation est limitée par une tolérance médiocre (333) . En revanche, une étude préliminaire sur 10 patients avec une forme cutanée diffuse a montré des résultats encourageants avec le Nilotinib avec une amélioration du score de Rodnan à 6 mois (76).

c) Rôle des régulateurs négatifs

Pour prévenir l'accumulation excessive de composants de la matrice extracellulaire et un excès de cicatrisation, différents médiateurs permettent d'inhiber l'activation des fibroblastes, tels que le facteur de transcription Fli-1, la voie de signalisation RAS et le récepteur nucléaire peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ . Au cours de la ScS, l'expression, la régulation ou la fonction de ces inhibiteurs est défaillante (298,299). En conditions physiologiques, PPAR- γ inhibe la réponse fibrotique induite par le TGF- β et empêche la différenciation épithélio-mésenchymateuse. Chez les patients ScS, il existe une diminution de l'expression de PPAR- γ dans la peau lésionnelle et les poumons (298). Sa délétion dans les

fibroblastes entraîne une augmentation de la fibrose et augmente la sensibilité des fibroblastes au TGF- β dans le modèle murin de fibrose dermique induite par la bléomycine (334). Tandis que son activation atténue la fibrose induite par la bléomycine. Cependant, différents médiateurs impliqués dans la fibrogénèse, tels que le TGF- β , les protéines Wnt, l'IL-13, l'hypoxie, l'acide lysophosphatidique (LPA), le CTGF, la leptine et miR27 peuvent inhiber l'expression ou l'activité de PPAR- γ . Ainsi, l'expression anormale de PPAR- γ observée dans la ScS ne pourrait être que le reflet de l'action d'un autre médiateur fibrotique et ne pas être causale.

Le rôle du récepteur NR4A1, qui régule l'expression du TGF- β a récemment été souligné (335). Ce point est développé en II.3.e.i

Par ailleurs, il a été montré que le facteur de transcription Nkx2.5 est un inhibiteur de la transcription du gène de l' α -SMA (336) et qu'une réduction de son expression est associée à une différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes (306). Les anomalies intrinsèques des fibroblastes figurent dans le Tableau 3.

ii. Origine des myofibroblastes

La source des myofibroblastes demeure sujette à controverses. : il existe d'une part un recrutement des fibroblastes résidents et une différenciation de ces fibroblastes en myofibroblastes, probablement sous l'effet de différents médiateurs relargués par l'endothélium lésé et l'infiltrat inflammatoire péri-vasculaire (TGF- β 1, Wnt, Notch, CTGF, lysophosphatidic acide, radicaux libres, sérotonine, ET-1 et PDGF), mais aussi en réponse à l'hypoxie et au stress mécanique induit par l'augmentation de la rigidité matricielle (337).

Il existe également, en réponse au stress initial (vasculaire et/ou dysimmunitaire avec synthèse de différentes cytokines et chémokines, comme l'ET-1, le CTGF, l'IL-6 ou l'IL-13) ou à l'hypoxie chronique, une activation et une transdifférenciation de cellules progénitrices (péricytes (cellules fusiformes entourant l'endothélium des capillaires), cellules endothéliales, cellules musculaires lisses vasculaires ou cellules épithéliales) en myofibroblastes, augmentant encore leur nombre (168,182) (Figure 18). L'hypoxie chronique favorise la différenciation épithélio-mésenchymateuse et endothélio-mésenchymateuse, sous l'action autocrine du TGF- β ou via l'hypoxie inducible factor 1 (338).

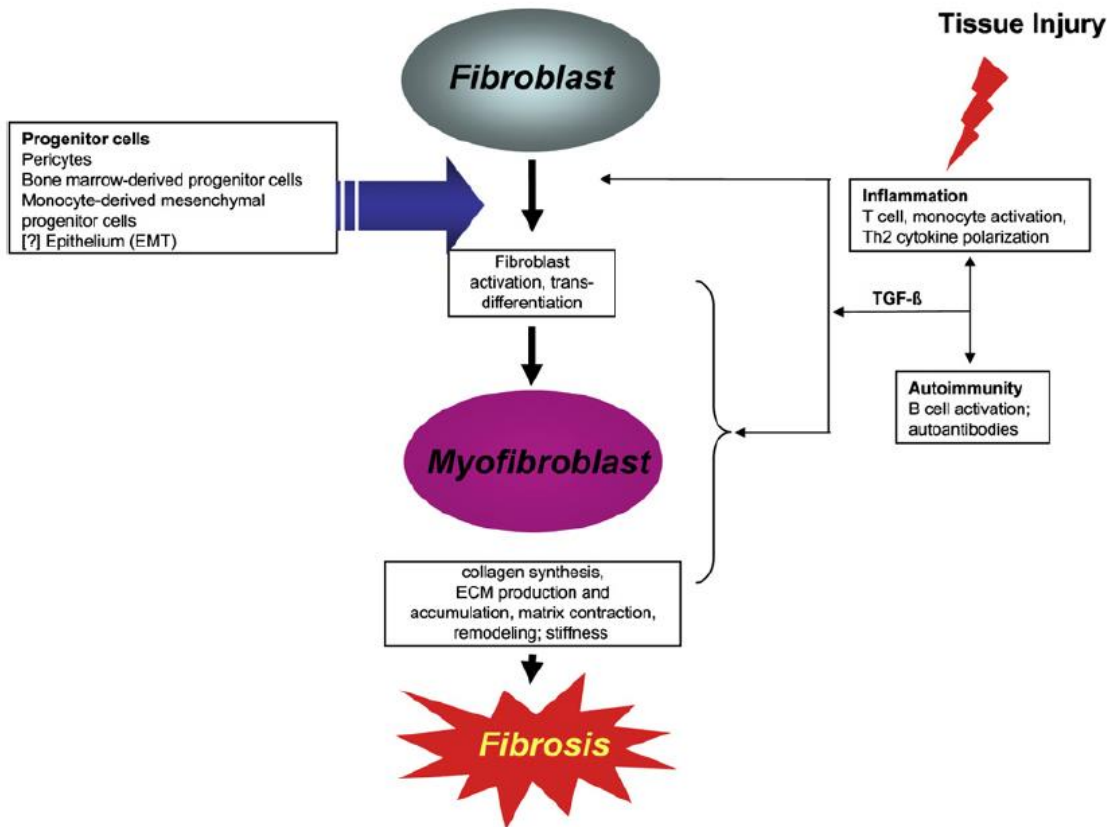
Toutefois, une étude récente suggère au contraire que la majorité des myofibroblastes présents dans les lésions fibrotiques auraient pour origine un précurseur adipocytaire, ce qui

expliquerait la disparition de la couche adipeuse concomitante au développement de la fibrose dermique (339).

Tableau 3 : Anomalies intrinsèques des fibroblastes au cours de la ScS
d'après Bhattacharyya S et al. Nat Rev Rheumatol 2012 (298) et Hinz et al. Am J Pathol. 2012 (306)

<i>Augmentation de l'expression ou de l'activité</i>	<i>Diminution de l'expression ou de l'activité</i>
Sécrétion cytokines et chimiokines (sécrétion autocrine de TGF- β)	Fli-1, Krüppel-like factor 5
Expression de protéines d'adhésion	SMAD7
Expression récepteurs au TGF- β , au PDGF et au CTGF	PPAR- γ
Synthèse de formes réactives de l'oxygène	miR-29, miR-193b, miR-200a
Résistance à l'apoptose	NR4A1
Early growth response protein (EGR) 1	Nkx2.5
Facteur de transcription Sp1 et Sp3	
Focal adhesion kinase 1 (FAK)	
SMAD3 et SMAD2	
Extracellular signal-regulated kinase (ERK-1 et 2)	
Tyrosine kinase ABL1 (c-ABL)	
Voie de signalisation Notch	
Voie Wnt	
miR192, miR132, miR21, miR129, miR200b/c, miR216a, miR92a	
HDAC7 (histone deacetylase)	

Figure 18 : Origine des myofibroblastes,
 Extrait de Varga J et al. J Clin Invest 2007(337)



Les myofibroblastes dérivent de différentes cellules : les fibroblastes résidents et par transdifférenciation des fibrocytes dérivés de la moëlle osseuse, des péricytes, des cellules progénitrices mésenchymateuses et des cellules épithéliales.

d) Rôle du stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie dans la fibrose

La majorité des protéines sécrétées et membranaires sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique où elles sont repliées et assemblées avant d'être transportées. Le stress du réticulum endoplasmique est lié à un déséquilibre entre la charge de protéines présentes dans le réticulum endoplasmique et sa capacité d'assemblage, responsable d'une accumulation de protéines de conformation anormale dans le réticulum endoplasmique. Ceci induit une réponse UPR (unfolded protein response) avec activation de la transcription de gènes cibles et une profonde inhibition de la traduction, ce qui augmente les capacités de repliement et de dégradation et limite l'arrivée de nouvelles protéines dans le réticulum endoplasmique. Lorsque cette réponse adaptative est insuffisante, une réponse apoptotique et une autophagie sont déclenchées. La persistance d'un signal de stress du réticulum endoplasmique augmente la mort cellulaire dans les tissus atteints, induit la transdifférenciation épithélio-

mésenchymateuse et a un effet pro-fibrotique (340,341). L'augmentation de l'autophagie pourrait participer à l'activation et à la survie des fibroblastes au cours de la ScS (342).

Le stress du réticulum endoplasmique fait intervenir des protéines chaperonnes, impliquées dans les processus de repliement des protéines. Parmi ces protéines, il a été suggéré un rôle de la protéine de choc thermique Hsp 90 dans la fibrose. Elle est surexprimée chez les patients atteints de ScS et dans des modèles murins de ScS et est impliquée dans la voie de signalisation du TGF- β (343). Elle rend les cellules plus sensibles à l'action du TGF- β par stabilisation de la conformation des récepteurs au TGF- β . Enfin, son inhibition prévient le développement de la fibrose dermique dans différents modèles murins de ScS (344).

e) Médiateurs extrinsèques de l'activation des fibroblastes dans la ScS

i. TGF- β (transforming growth factor- β)

Le TGF- β , cytokine clé du remodelage de la matrice extracellulaire à la fois en conditions physiologiques et pathologiques (processus de fibrose), est produit par les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Il est impliqué dans la maintenance du phénotype activé des fibroblastes au cours de la ScS, qui expriment de manière accrue le récepteur au TGF- β . Il conduit à l'augmentation de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire en particulier des gènes du collagène de type I et à l'inhibition de collagénases, telles que MMP1 capables de dégrader la matrice extracellulaire (Tableau 4).

Le rôle du TGF- β dans la ScS est également suggéré par les analyses transcriptomiques soulignant une expression différentielle de gènes de réponse au TGF- β au cours de la ScS cutanée diffuse (256,345). *In vivo*, les souris avec une mutation gain de fonction dans la voie du TGF- β développent une fibrose progressive touchant plusieurs organes (346).

Au cours de la ScS, les fibroblastes explants ont une expression nucléaire constitutive de SMAD2/3 phosphorylé, même en l'absence de TGF- β , ce qui suggère une expression autocrine du TGF- β (347). Cette expression autocrine du TGF- β serait impliquée dans le phénotype activé des fibroblastes en entraînant une phosphorylation constitutive des FAK (impliquée dans l'expression de l' α -SMA par les myofibroblastes) et une résistance à l'apoptose (306).

Le TGF- β est secrété dans la matrice sous une forme inactive, puis va être converti sous sa forme active par une voie de signalisation dépendante des intégrines. La signalisation du TGF- β dépend de 2 voies principales : une voie canonique dépendante des protéines SMAD 2 et 3 qui vont induire l'expression de gènes cibles (collagènes fibrillaires, protéines de la matrice extracellulaire ou TIMP-1) et une voie non canonique indépendante de SMAD (Figure 19).

Le processus de fibrose pourrait être lié à un défaut des systèmes de régulation du TGF- β : le rôle du récepteur NR4A1, qui régule l'expression du TGF- β a récemment été souligné (335,348). Ainsi, il a été montré qu'une activation du TGF- β , dans un processus physiologique telle que la cicatrisation, induit l'expression de NR4A1 qui exerce un retrocontrôle négatif, prévenant les conséquences délétères d'une exposition trop longue et incontrôlée au TGF- β . Dans les circonstances pathologiques de fibrose, l'activité persistante du TGF- β inhibe cette boucle régulatrice. Dans un travail récent, l'inactivation de ce récepteur nucléaire a exacerbé la fibrose dermique et pulmonaire, tandis que l'utilisation d'un agoniste de NR4A1 a prévenu et guéri la fibrose dermique et des organes internes dans des modèles murins (335).

Du fait de ce rôle clé du TGF- β dans la ScS, un traitement par un anticorps neutralisant anti-TGF- β semble une option intéressante. Dans une étude ouverte préliminaire, 15 patients avec une forme cutanée diffuse évoluant depuis moins de 2 ans sans défaillance d'organe ont été traités par Fresolimumab (anticorps anti-TGF- β) (1 dose de 5mg/kg ou 2 doses de 1 mg/kg) (349). Les résultats préliminaires sont intéressants avec une diminution du score modifié de Rodnan précoce (perte de 5 points pour une médiane à l'inclusion de 24) concomitante d'une diminution d'expression dermique de gènes cibles du TGF- β (thrombospondine-1 et cartilage oligomeric protein COMP) et d'une diminution du nombre de myofibroblastes dermiques. Toutefois, les biopsies cutanées n'ont pas révélé de différence d'épaisseur ou de dureté cutanées. La tolérance a été marquée par la survenue d'un décès par insuffisance cardiaque chez un patient avec une cardiopathie et des saignements d'origine digestive, incitant à la prudence chez les patients avec des estomacs pastèques connus. Ces résultats demandent donc à être confirmés dans de plus larges études prospectives et l'effet de cet anticorps sur les atteintes graves de la ScS (critère d'exclusion de cette étude), notamment la fibrose pulmonaire, devra être étudié, de même que sa tolérance. En effet, le TGF- β joue un rôle pléiotrope et est impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques normaux et pathologiques. Son blocage pourrait donc être associé à des risques potentiels, notamment d'induction d'auto-immunité.

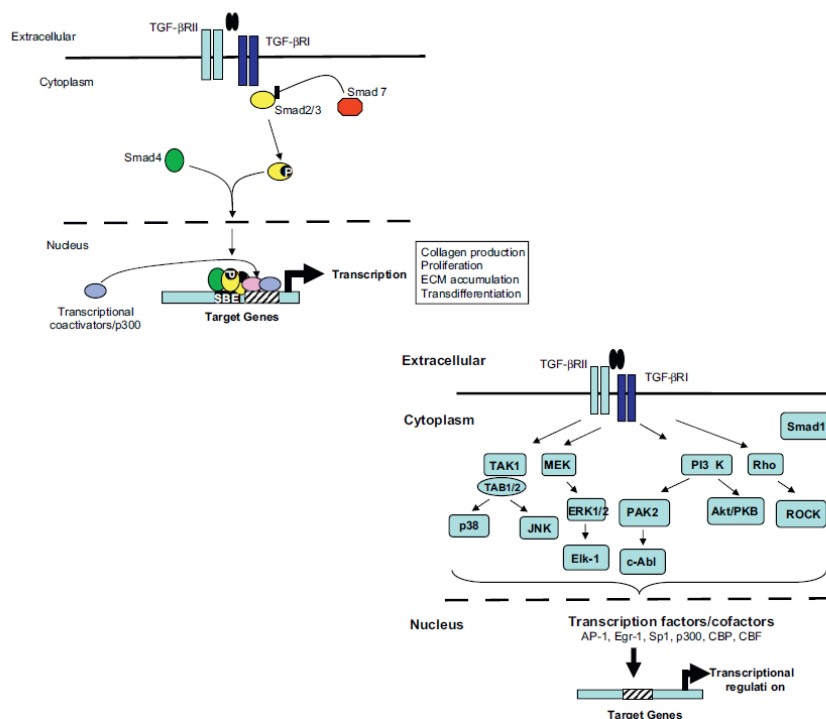
Tableau 4 : Rôles du TGF-β dans la fibrose

d'après Varga J et Trojanowska M. Rheum Dis Clin North Am. 2008 (299)

<ul style="list-style-type: none"> • Stimule la synthèse de collagènes, fibronectine, protéoglycanes, élastine et TIMPs (inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles)
<ul style="list-style-type: none"> • Stimule la prolifération des fibroblastes et leur chimiotactisme
<ul style="list-style-type: none"> • Entraîne la production de CTGF et de l'ET-1
<ul style="list-style-type: none"> • Stimule l'expression de marqueurs de surface pour le TGF-β et le PDGF
<ul style="list-style-type: none"> • Promeut la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, la transition épithélio-mésenchymateuse
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe l'apoptose des fibroblastes
<ul style="list-style-type: none"> • Augmente la rigidité matricielle

Figure 19 : Voies de signalisation du TGF-β

Extrait de Varga J and Pasche B, Nat Rev Rheumatol 2009(350)



Le TGF-β va se lier aux récepteurs membranaires TGF-βRI et TGF-βRII. Deux voies de signalisation existent : une voie dépendante des protéines SMAD avec phosphorylation des SMAD2 et 3 qui se complexent à SMAD4 puis vont activer/réprimer la transcription de gènes cibles ; cette voie est inhibée par SMAD7. Une voie indépendante des protéines SMAD existe avec activation de différentes kinases : Rho-kinases, PI3kinase, voie ERK1/2 et TAT-associated kinases.

ii. Connective tissue growth factor (CTGF)

Le CTGF ou CCN2 est une protéine matricellulaire de la famille CCN. Il est synthétisé par les cellules endothéliales et impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques, comme l'adhésion, la migration, la prolifération, l'angiogénèse, le développement squelettique et différents cancers. Au cours de la ScS, les fibroblastes activés synthétisent de grandes quantités de CTGF, le CTGF est la cible directe des protéines SMAD3 en réponse au TGF- β et agit comme un cofacteur du TGF- β , pour promouvoir la fibrose (351). Toutefois, les fibroblastes peuvent synthétiser du CTGF même en l'absence de stimulation par le TGF- β (312). Outre le TGF β , l'ET-1 et l'angiotensine II induisent le CTGF. Des corrélations entre taux sériques de CTGF et fibrose cutanée et pulmonaire ont été mises en évidence dans la ScS. Le CTGF entraîne une prolifération des fibroblastes, augmente leur chimiotactisme, leur capacité d'adhésion et leur production de collagène (299). L'expression constitutive du CTGF dans les fibroblastes chez des souris transgéniques est associée au développement d'un phénotype sclérodermique (352). Tandis que la délétion conditionnelle du CTGF dans les fibroblastes protège les souris du développement de la fibrose induite par la bléomycine (353).

iii. PDGF

Le PDGF peut être synthétisé par les plaquettes, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Il s'agit d'un facteur mitogène chémo-attracteur pour les cellules mésenchymateuses (186). Les patients ScS ont une expression du PDGF et des récepteurs alpha et beta au PDGF augmentée dans la peau (186). En outre, l'expression du PDGF est augmentée dans le lavage broncho-alvéolaire de patients ScS (186,354). Les récepteurs au PDGF sont exprimés par les péricytes au cours de la ScS, cellules qui peuvent se différencier en myofibroblastes (298).

Plusieurs arguments plaident pour un rôle pro-fibrotique du PDGF dans la ScS :

- les souris transgéniques exprimant une forme constitutionnellement active du récepteur alpha du PDGF développent une fibrose généralisée touchant plusieurs organes (355).
- Les fibroblastes dermiques ou pulmonaires de patients ScS répondent à la stimulation par le TGF- β par une hyperexpression du récepteur au PDGF : PDGFR α (354).

- des anticorps anti-PDGF récepteurs ont été détectés au cours de la ScS et aussi de la GVHD (278,279) et seraient impliqués dans le processus de fibrose (279). Toutefois, ces résultats n'ont pas été répliqués par des laboratoires indépendants (280,281).

iv. **IL-6**

L'IL-6 peut être synthétisée par les cellules endothéliales activées, les lymphocytes et les fibroblastes au cours de la ScS. Le rôle de l'IL-6 dans la ScS est souligné par plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. On sait que les taux sériques d'IL-6 sont augmentés chez les patients ScS en comparaison à des sujets contrôles, qu'ils sont corrélés à l'étendue de la fibrose dermique et associés à un pronostic péjoratif (356,357). *In vitro*, un anticorps anti-IL6, a réduit la production de collagène de type I dans les fibroblastes issus de patients ScS, tandis que *in vivo*, les souris invalidées pour l'IL-6, traitées par un anticorps anti-IL6 ou vaccinées contre l'IL-6 étaient protégées du développement de la fibrose dermique dans le modèle induit par la bléomycine ou par immunisation contre la topoisomérase de type 1 (358–360). En revanche, le blocage de l'IL-6 était inefficace dans le modèle non inflammatoire Tsk-1, ce qui suggère un possible rôle aux stades inflammatoires précoces de la maladie (360).

v. **ET-1**

Elle est synthétisée par les cellules endothéliales activées. Les taux d'ET-1 sont augmentés dans la peau et le plasma de ScS précoces actives (361). L'ET-1 favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes *in vitro* (362).

vi. **LPA**

Les taux sériques d'acide lysophosphatidique sont augmentés au cours de la ScS, il est impliqué dans l'activation et la migration des fibroblastes. Les souris invalidées pour LPA sont protégées de la fibrose dermique et pulmonaire dans le modèle induit par la bléomycine (363). Et un anticorps anti-récepteurs pour le LPA a montré son efficacité dans le modèle de fibrose dermique et pulmonaire induite par la bléomycine (364).

vii. Thrombine

Elle est produite par les plaquettes activées et induit l'expression du CTGF (365). Ses taux sont augmentés dans le lavage broncho-alvéolaire de patients ScS (366). Elle augmente la survie des fibroblastes pulmonaires (367) et stimule leur transformation en myofibroblastes (368). L'inhibition de la thrombine par le Dabigatran a un effet anti-fibrotique *in vitro* sur des fibroblastes pulmonaires (369).

viii. Sérotonine

La sérotonine (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) est relarguée par les granules des plaquettes après activation. Elle joue un rôle vaso-actif bien démontré, mais semble également pourvue d'actions profibrosantes. Les taux plasmatiques de sérotonine sont augmentés chez les patients ScS en comparaison à des contrôles (370). La sérotonine stimule la prolifération de fibroblastes isolés des artères pulmonaires des rats hypoxémiques (371). La sérotonine stimule la synthèse de matrice extracellulaire par les fibroblastes dermiques par activation des récepteurs 5-HT_{2B} (surexprimés dans la peau de patients ScS) selon un mécanisme dépendant du TGF- β (185). L'inactivation génétique de 5-HT_{2B} prévient la fibrose dermique dans les modèles murins de fibrose induite par la bléomycine et dans le modèle *tsk-1* (185). L'inhibition pharmacologique des récepteurs à la sérotonine prévient et guérit la fibrose dermique établie.

Un rôle de la sérotonine dans la fibrose pulmonaire est également suggéré. Chez l'homme, dans la fibrose pulmonaire idiopathique, l'expression des récepteurs à la sérotonine de type 5-HT_{2B} est augmentée (372). Dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, l'instillation intra-trachéale de bléomycine augmente l'expression pulmonaire des récepteurs 5-HT_{2A} et B, tandis que l'inhibition de ces récepteurs protège de la fibrose pulmonaire (372).

ix. MCP-1

L'expression de MCP-1 est augmentée dans le sérum des patients avec fibrose pulmonaire (373). Son expression est également augmentée dans la peau de patients ScS, avec une expression par les cellules mononuclées et les fibroblastes (373–375). MCP-1 participerait au recrutement des monocytes/macrophages dans la peau et les tissus fibrotiques et son effet pro-

fibrotique avec stimulation de la synthèse de collagène par les fibroblastes a été montré *in vitro* (376). *In vivo*, dans le modèle murin de fibrose induite par la bléomycine, il existe une expression précoce de MCP-1 dans les cellules mononuclées infiltrant le derme des souris, tandis que l'expression par les fibroblastes est plus tardive (376). Enfin, l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-MCP-1 a prévenu la fibrose dermique dans ce modèle.

x. **Rôle du stress oxydant**

Le rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de la ScS a été souligné par plusieurs études. Il est dû à la libération de radicaux libres et d'espèces réactives dérivées de l'oxygène. Des marqueurs indirects du stress oxydant ont été détectés dans le sérum de patients ScS, comme des modifications oxydatives des protéines et des peroxydes lipidiques (377,378). L'exposition de cellules endothéliales et de fibroblastes à des sérums de patients ScS a induit une production accrue d'H₂O₂ en comparaison à des sérums de sujets sains (379).

Les radicaux libres et espèces réactives dérivées de l'oxygène sont produits dans la ScS par les cellules endothéliales en réponse à l'hypoxie chronique avec phénomènes d'ischémie-reperfusion, mais aussi par les fibroblastes et les monocytes circulants (169,379,380).

Le stress oxydant semble contribuer aux dommages tissulaires observés au cours de la ScS (381). Les espèces réactives dérivées de l'oxygène peuvent activer les fibroblastes via le récepteur au PDGF, leur différenciation en myofibroblastes ainsi que leur synthèse de collagène et semblent nécessaires à l'expression de l'effet pro-fibrotique du TGF- β (169,267). Un effet direct des espèces réactives de l'oxygène sur l'ADN a également été suggéré dans la mesure où les taux urinaires de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, un marqueur de dommage oxydatif endogène de l'ADN, étaient augmentés chez les patients ScS, en comparaison à des contrôles (382).

Dans les fibroblastes, le TGF- β induit l'enzyme NADPH oxydase 4 qui catalyse la réduction de l'oxygène en formes réactives de l'oxygène. L'invalidation ou l'inactivation de la NADPH oxydase 4 protège les souris de la fibrose (383).

Les médiateurs extrinsèques de l'activation des fibroblastes figurent dans le Tableau 5. A noter que les effets de l'IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, VEGF et CXCL4 sur les fibroblastes ont été détaillés précédemment.

Tableau 5 : Médiateurs impliqués dans l'activation extrinsèque des fibroblastes
d'après Bhattacharyya S et al. Nat Rev Rheumatol 2011(298)

<p>MEDIATEURS</p> <p><u>CYTOKINES</u></p> <ul style="list-style-type: none">- TGF- β- IL-4, IL-10, IL-13- IL-17- IL-6 <p><u>FACTEURS DE CROISSANCE /PEPTIDES/LIPIDES</u> <u>BIOACTIFS/ENZYMES</u></p> <ul style="list-style-type: none">- CTGF- PDGF- VEGF- Endothéline-1- LPA (acide lysophosphatidique)- Thrombine <p><u>CHEMOKINES</u></p> <ul style="list-style-type: none">- MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)- CXCL4 <p><u>ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE</u></p> <p><u>SEROTONINE</u></p>
--

f) Rôle du stress biomécanique

i. La rigidité matricielle et méchanotransduction

Le rôle de la rigidité matricielle dans l'activation des fibroblastes est souligné par plusieurs études: (i) les myofibroblastes développent *in vitro* et *in vivo* leur phénotype contractile uniquement au-dessus d'un certain niveau de rigidité matricielle (384,385); (ii) dans un modèle de fibrose hépatique, l'augmentation de la rigidité matricielle précède l'activation des fibroblastes et l'accumulation de collagène, suggérant que ces changements mécaniques pourraient être suffisants pour entraîner la contraction des myofibroblastes (386); (iii) une

activation purement mécanique des facteurs de croissance pro-fibrotiques a été démontrée *in vitro* dans des systèmes acellulaires (387).

Le rôle de la rigidité matricielle dans l'initiation du processus fibrotique et le lien entre facteurs mécaniques et chimiques régulant l'activation et la différenciation des myofibroblastes ont été soulignés dans l'étude de Wipff PJ et al.(388). Dans cette étude, il a été montré que la contraction des myofibroblastes active directement le TGF- β de la matrice extracellulaire. Dans les blessures contenant des myofibroblastes, l'activation des cibles de signalisation du TGF- β SMAD2/3 est plus élevée dans les tissus tendus que non tendus pour des niveaux similaires de TGF- β et de son récepteur. Ainsi, le stress mécanique perçu par les fibroblastes entraîne une activation du TGF- β qui est libéré de son complexe latent.

Les fibroblastes perçoivent le stress biomécanique et répondent aux forces mécaniques via un processus de méchanotransduction, qui met en jeu les intégrines de surface et les changements de tension du cytosquelette détectés par les FAK et les Rho-associated kinases. Ces signaux activent les effecteurs en aval YAP (yes-associated protein) et TAZ (co-activateur transcriptionnel avec motif de liaison aux protéines PDZ) qui perpétuent l'activation des fibroblastes et exacerbent le processus de fibrose (182).

La perte d'élasticité en résultant entraîne un cercle vicieux avec augmentation de l'activation des fibroblastes et de la production de collagène, responsable d'une chronicisation du phénomène.

ii. Lysyl oxydase

Les déterminants de la rigidité accrue des fibroblastes et de la matrice ne sont pas complètement élucidés. Le rôle de la lysyl oxydase, enzyme impliquée dans la formation de ponts entre les fibres de collagène, a été suggéré. Il a notamment été mis en évidence une augmentation d'expression de l'ARN messenger et des protéines lysyl oxydases dans les fibroblastes dermiques ScS et dans la peau lésionnelle de patients ScS en comparaison à la peau saine ou à des sujets contrôles sains (389). En particulier, la lysyl oxydase 2 a été impliquée dans la fibrose pulmonaire et un anticorps monoclonal anti-lysyl oxydase 2 a montré son efficacité dans des modèles de fibroses pulmonaire et hépatique. Ce traitement a entraîné une diminution de l'activation des fibroblastes, de la synthèse de facteurs de croissance et cytokines pro-fibrotiques (notamment de la voie de signalisation du TGF- β) (390).

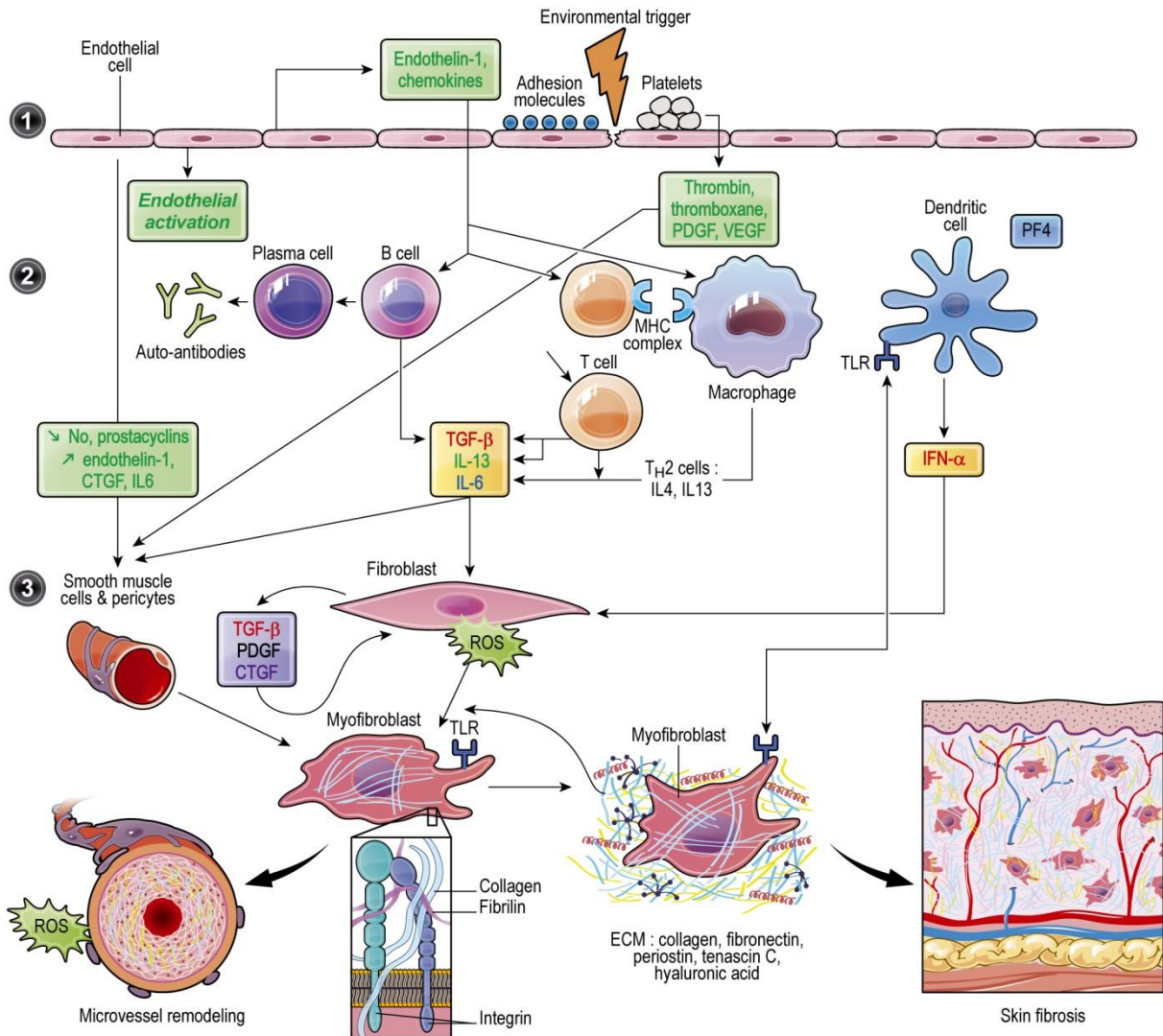
iii. Rôle des intégrines

Il existe une communication bidirectionnelle entre intégrines et TGF- β au cours de la ScS. Le TGF- β induit l'expression des intégrines, tandis que les intégrines modulent l'activation et les voies de signalisation du TGF- β (391). Dans une étude portant sur le syndrome de la peau cartonnée (« stiff skin syndrome »), qui est une maladie rare autosomique dominante mimant la ScS et liée à une mutation du gène de la fibrilline-1, il existe une altération de la fonction des intégrines et de la capacité des fibroblastes à interagir avec la matrice (392). Ces modifications sont associées à une augmentation de la concentration et de l'activité du TGF- β dans le derme. Dans cette étude, les souris mutées pour la fibrilline-1 ont développé spontanément une fibrose dermique avec une infiltration dermique de cellules inflammatoires dont des cellules dendritiques plasmacytoïdes, des cellules Th2 et Th17 et des plasmocytes et des auto-anticorps anti-topoisomérases de type 1 ont été détectés. Un traitement par anticorps neutralisant anti-TGF- β ou par anticorps activant les intégrines α -1 a induit la régression des lésions de fibrose et des anomalies immunes. Ces résultats suggèrent qu'un défaut d'interaction fibroblastes-matrice extracellulaire serait suffisant pour initier et faire perpétuer le processus de fibrose inflammatoire.

Pour conclure, la ScS est une maladie multifactorielle qui survient suite à un stimulus environnemental sur un fond génétique de susceptibilité. Ce stimulus va entraîner des lésions vasculaires avec activation secondaire ou initiale des cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, macrophages) et de l'immunité adaptative (lymphocytes T Th2 avec production de cytokines Th2 pro-fibrotiques, lymphocytes B avec production d'auto-anticorps potentiellement pathogènes et altération du nombre et de la fonction des lymphocytes T régulateurs). Les fibroblastes et précurseurs fibroblastiques vont être secondairement activés par les chémokines et cytokines pro-fibrotiques libérées par l'endothélium lésé, les lymphocytes T, B et les cellules de l'immunité innée avec différenciation en myofibroblastes et synthèse de grandes quantités de collagène et constituants de la matrice extracellulaire. Les radicaux libres produits en réponse à l'hypoxie chronique et par les cellules inflammatoires vont également activer les fibroblastes. La fibrose tissulaire résultante va altérer les propriétés biomécaniques du tissu, perpétuant encore le processus de fibrose.

La physiopathologie de la ScS est résumée dans la figure 20.

Figure 20 : Physiopathologie de la Sclérodémie systémique



Ainsi, un potentiel traitement de la ScS doit cibler les différents effecteurs impliqués dans la fibrose, mais doit être bien toléré en limitant les effets secondaires, notamment infectieux, dans cette population à risque.

Enfin, bien que les connaissances physiopathologiques aient progressé ces dernières années, il reste à déterminer quels sont les facteurs explicatifs et prédictifs de l'hétérogénéité de présentation de la maladie et de son devenir, le facteur environnemental impliqué ainsi que les mécanismes d'interaction facteurs environnementaux-bases génétiques.

CHAPITRE 3 : LES MODELES ANIMAUX DE SCLERODERMIE SYSTEMIQUE

Pour mieux étudier la physiopathologie de la maladie et développer des thérapeutiques, les modèles animaux sont nécessaires. Il existe différents modèles de ScS qui reproduisent un certain nombre de caractéristiques de la maladie. Cependant, aucun modèle ne reproduit tous les événements physiopathologiques observés dans la maladie. Il est donc important de bien connaître ces différents modèles pour choisir le ou les modèles les plus appropriés pour une étude *in vivo*.

Le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine est un modèle validé, bien défini, facile à utiliser et qui peut être réalisé sur des souris de différents fonds génétiques (187,251,252). Il est caractérisé par une fibrose cutanée et reproduit les stades inflammatoires précoces de la maladie. Cependant, il n'existe pas dans ce modèle de vasculopathie et la fibrose dermique est limitée au pourtour de la zone d'injection et non systémique comme au cours de la maladie. En outre, les résultats des traitements anti-inflammatoires sont souvent surestimés dans ce modèle, en comparaison à ce qui est observé au cours de la ScS (77). Les trois paramètres validés permettant d'évaluer la fibrose dermique dans ce modèle sont l'épaisseur dermique, le contenu en hydroxyproline et le nombre de myofibroblastes dans la peau lésionnelle (injectée). L'ensemble de la zone injectée est prélevée, la moitié est fixée au paraformaldéhyde pour analyse histologique: l'épaisseur dermique est mesurée sur des coupes colorées à l'hématoxyline-eosine par la mesure de la distance entre la jonction derme-épiderme et derme-graisse sous-cutanée en deux points par deux examinateurs en aveugle, après grossissement au x 100. Le contenu en collagène est reflété par le contenu en hydroxyproline de la peau lésionnelle, mesuré à partir de 2 biopsies cutanées de 3 mm faites en peau lésionnelle. Il s'agit d'une réaction colorimétrique: après hydrolyse acide des échantillons, les acides aminés sont libérés par rupture des liaisons peptidiques; l'oxydation douce de l'hydroxyproline par la chloramine T conduit à la production de dérivés pyrroliques qui donnent avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde, en milieu acide, une coloration rose évaluée spectrophotométriquement à 558 nanomètres. Le nombre de myofibroblastes est évalué par 2 examinateurs en aveugle après grossissement au x200. Les myofibroblastes sont détectés par le marquage de l'alpha-actine du muscle lisse (marquage par immunohistochimie et révélation par le 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)) associés à un paramètre morphologique (aspect fusiforme des fibroblastes).

Le modèle *tsk-1* est un modèle génétique lié à une duplication partielle de la fibrilline-1 (393,394). Il reflète les stades tardifs non inflammatoires de la maladie et est caractérisé par une fibrose hypodermique prédominante. Les souris *tsk-1* présentent un emphysème pulmonaire, mais pas de fibrose pulmonaire. Il n'y a pas dans ce modèle de vasculopathie. Les souris *tsk-1* sont évaluées à 10 semaines sur l'épaisseur hypodermique mesurée par deux examinateurs en aveugle en deux points au grossissement x 40 et le contenu en hydroxyproline, comme précédemment.

Le modèle induit par les injections d'acide hypochloreux est caractérisé par une fibrose dermique localisée au pourtour de la zone d'injection avec un infiltrat inflammatoire (267). Ce modèle présente deux intérêts principaux: il permet d'étudier une complication sévère de la maladie : la fibrose pulmonaire et reproduit l'auto-immunité présente au cours de la ScS avec détection dans ce modèle d'anticorps anti-topoisomérases de type 1.

Le modèle transgénique *Fra-2* est caractérisé par une fibrose généralisée touchant la peau et les poumons (395). La fibrose observée est inflammatoire avec présence d'infiltrats de cellules mononucléées. Elle débute à l'âge de 12 semaines et est caractérisée par une augmentation du contenu en collagène et du nombre de myofibroblastes. Outre l'inflammation et la fibrose, les souris *Fra-2* présentent un phénotype vasculaire touchant les poumons et la peau avec une apoptose des cellules endothéliales puis une raréfaction vasculaire débutant à l'âge de 12 semaines (177). Elles développent une vasculopathie proliférative au niveau des poumons mimant l'HTAP observée chez les patients ScS. L'HTAP et la fibrose pulmonaire entraînent une détresse respiratoire et un décès précoce des souris entre 16 et 20 semaines. Enfin, une étude récente a montré que les souris *Fra-2* présentaient une cardiomyopathie comparable à celle observée au cours de la ScS avec raréfaction vasculaire, augmentation du contenu en collagène et infiltrat inflammatoire (396). Les souris *Fra-2* sont donc caractérisées par une fibrose systémique, une microangiopathie, une cardiomyopathie et une HTAP, dont la survenue suit une séquence temporelle similaire à celle observée chez les patients atteints de ScS. Ce modèle permet d'étudier les relations entre fibrose et vasculopathie existantes au cours de la maladie. Toutefois, la faible accessibilité de ces souris en limite l'utilisation. Les différents modèles murins de ScS sont décrits dans la revue présentée dans les pages suivantes (149).

Depuis cette revue, deux autres modèles ont été décrits:

- Les souris transgéniques hétérozygotes *klf5^{+/-} fli1^{+/-}* (305). Fli1 et KLF5 sont des facteurs de transcription impliqués dans l'inhibition de la transcription du collagène, qui sont sous-exprimés dans les fibroblastes ScS. Ces souris double-hétérozygotes

sont caractérisées par une fibrose dermique et une vasculopathie touchant le derme avec raréfaction vasculaire et hypoxie tissulaire, une atteinte interstitielle de type pneumopathie interstitielle non spécifique et une HTAP. Ces souris expriment des signes d'activation du lymphocyte B avec augmentation de l'expression du CD19 à la surface des lymphocytes B et des signes d'auto-immunité avec production d'anticorps anti-nucléaires.

- Le modèle de souris invalidées pour le récepteur activateur plasminogène type urokinase (uPAR) (179,180). uPAR est impliqué dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans l'angiogénèse. Ces souris sont caractérisées par une fibrose dermique avec hyperexpression dans le derme de facteurs pro-fibrotiques (TGF- β , CTGF, ET-1), une fibrose pulmonaire avec un aspect de pneumopathie interstitielle non spécifique et une fibrose cardiaque. L'atteinte fibrosante survient en parallèle d'une apoptose endothéliale et d'une raréfaction capillaire, mimant l'atteinte vasculaire observée au cours de la ScS.



Available online at
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Review

Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis

Jérôme Avouac*, Muriel Elhai, Yannick Allanore

Paris-Descartes University, Cochin Hospital, Rheumatology A department, Inserm U1016, CNRS UMR8104, Cochin Institute, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 15 June 2012

Available online 28 July 2012

Keywords:

Systemic sclerosis
 Animal models
 Dermal fibrosis

ABSTRACT

Vasculopathy, immunological abnormalities, and fibrosis are the key features in the pathogenesis of systemic sclerosis (SSc). Expression of each of the three pathologic features varies among SSc patients leading to disease heterogeneity and variable organ manifestations. Although the etiology of SSc has not yet been fully elucidated, a growing body of evidence suggests that extracellular matrix overproduction by activated fibroblasts results from a complex interplay between endothelial cells, immune cells and fibroblasts through cell–cell and cell–matrix interactions and communications. Relevant animal models are essential tools to in-depth investigate pathogenesis of SSc. Several murine and avian models are available; however, some models display inflammation followed by fibrosis, whether some others primarily mimic autonomous fibroblast activation. In addition, typical microvascular changes of SSc are only observed in few models. Therefore, none of these animal models encompasses all features of the human disease and a critical selection is mandatory for successful *in vivo* studies. Hence, we will provide an overview of the most important experimental models of dermal fibrosis and SSc and discuss their respective contribution to the better understanding of SSc pathogenesis.

© 2012 Société française de rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Despite growing efforts in the field of systemic sclerosis (SSc) research, the possible pathogenesis of this incurable rare connective tissue disease remains weakly understood, although it has been shown to relate to the complex interplay of vasculopathy, immune system, and fibrosis [1]. In agreement with this insufficient knowledge, it must be advocated that so far no treatment allows full recovery from this severe disorder [2,3]. Animal models may be a major step forward to help clarify the mechanisms involved in the development or perpetuation of this condition and test new therapeutic strategies.

Several murine and avian models are available to study different and complementary aspects of the disease related to vasculopathy, inflammation, autoimmunity and fibrosis (Table 1). Since none of these models can encompass all features of human SSc, a critical selection of animal models is the basis for successful *in vivo* studies. Herein, we will present the most important animal models of SSc. We will classify these models (inducible versus genetic models) and discuss their characteristics, advantages, and limitations, with a special focus on SSc animal models with systemic disease manifestations.

* Corresponding author. Service de rhumatologie A, hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France. Tel.: +33 1 58 41 25 63; fax: +33 1 58 41 26 24.

E-mail address: jerome.avouac@ech.aphp.fr (J. Avouac).

2. Inducible animal models

2.1. Bleomycin-induced skin and pulmonary fibrosis

Bleomycin is a cancer chemotherapy that has established itself as a potent initiator of tissue injury and fibrosis in mice and other animal species. It has become associated with two models that have become a cornerstone of experimental biology that is highly relevant to studies of SSc. Bleomycin can be given intravenous, intraperitoneal, subcutaneous or intratracheal routes to initiate lung fibrosis bleomycin causes inflammatory and fibrotic reactions within a short period of time. The initial elevation of proinflammatory cytokines (interleukin-1 [IL-1], tumor necrosis factor- α [TNF- α], IL-6, interferon- γ [IFN- γ]) is followed by increased expression of growth factors (TGF- β 1) and extracellular components with a peak around day 14. The switch between inflammation and fibrosis appears to occur around day 9 after the start of bleomycin exposure. This model has the advantage that it is quite easy to perform, widely accessible and reproducible, and therefore fulfills important criteria expected from a good animal model.

Later, Yamamoto et al. established a murine model for skin fibrosis by daily subcutaneous injections of bleomycin over a 4-week period [4]. Repetitive bleomycin injections induce skin fibrosis localized to the area surrounding the injecting site. The induced sclerotic changes persist at least 6 weeks after the stoppage of bleomycin injections. The presence of antitopoisomerase-I, anti-U1-RNP, and antihistone antibodies, may also reflect systemic disease involvement in this model [5,6]. Bleomycin-induced

Table 1
Key pathophysiological processes in systemic sclerosis and their representation by different animal models.

Animal model	Vasculopathy	Inflammation	Autoimmunity	Fibrosis
<i>Inducible models</i>				
Bleomycin-induced fibrosis	–	+++	++	+++
Hypochlorous acid-induced fibrosis	–	++	++	+++
Topoisomerase-I and CFA induced fibrosis	–	++	+++	+++
Scl-GvHD	–	+++	++	+++
<i>Genetic models</i>				
Tsk-1	–	–	+	+++
Tsk-2	–	+++	+	+++
UCD-200	+++	+++	++	+++
Fra-2	+++	+++	–	+++
TBRI ^{Cre} ; Cre-ER	–	++	–	+++
TBRI Δ k	+	+	–	+++

dermal fibrosis was induced in various mice strains, although there were some variations among strains in the intensity of the symptoms and the period required to induce dermal sclerosis. The model of bleomycin-induced skin fibrosis mimics inflammatory changes in SSc that often occur early in the disease course.

Histopathological examination revealed definite dermal fibrosis characterized by thickened collagen bundles, and the deposition of homogeneous materials in the thickened dermis with cellular infiltrates, which mimics the histological features of human SSc (Fig. 1). Bleomycin treatment induces the production of reactive oxygen species, causes damage to endothelial cells and other cell types, and leads to the expression of adhesion molecules [7]. This attracts leukocytes, including T cells, monocytes/macrophages, and mast cells, which are supposed to play an important role in the induction of fibrosis (Fig. 2). These inflammatory cells infiltrate into lesional skin and activate resident fibroblasts [4]. Activated fibroblasts then produce and release large amounts of extracellular matrix, which results in skin fibrosis at the site of bleomycin injection (Fig. 2). In addition to tissue infiltration by leukocytes, the model of bleomycin-induced skin fibrosis exhibits an early and sustained activation of profibrotic TGF- β signaling [8–10]. Apart from TGF- β , a broad variety of other inflammatory and profibrotic mediators, including monocyte chemoattractant protein-1, PDGF, IL-4, IL-6, and IL-13, is overexpressed in skin challenged with bleomycin [7]. The inflammatory propensity of this model is supported by the effective prevention and treatment of bleomycin-induced fibrosis by an IL-6 receptor-blocking antibody (MR-16-1) [11,12].

The model of bleomycin-induced skin fibrosis is relatively easy to perform and applicable to most mouse strains. It is useful to evaluate anti-inflammatory and antifibrotic therapies in preclinical studies of SSc. This model can be used for the prevention or the treatment of fibrosis. Regarding the preventive approach, treatment with a candidate molecule starts prior or at the onset of bleomycin injections. To assess the treatment of established fibrosis, injections of the pharmacologic treatment start several weeks (in general 3 weeks) after the onset of bleomycin injections. In this modified protocol, novel therapeutics may not only stop progression, but also induce regression of established fibrosis.

Although bleomycin-induced skin fibrosis is widely used as a model of early inflammatory stages of SSc, there are some important limitations. At least with usual doses of bleomycin, fibrosis is limited to the site of injection whereas SSc is a systemic disease involving the skin and internal organs. Typical generalized microangiopathy that precedes fibrosis in human SSc is usually absent in the bleomycin model. Nevertheless, thickness of vascular wall in the deep dermis can be observed. The bleomycin model may respond to treatment with anti-inflammatory/immunosuppressive therapies that are not effective in the human disease. A major reason for this discrepancy might be that patients are usually seen at

the stage of established fibrosis, in which meaningful inflammatory infiltrates are often no longer detectable.

2.2. Hypochlorous acid-induced skin and lung fibrosis

The role of reactive oxygen species (ROS) in SSc pathogenesis has been stressed by several observations [13,14]. Skin fibroblasts from SSc patients spontaneously produce large amounts of ROS that trigger collagen synthesis [15]. Moreover, in SSc patients, autoantibodies to the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor expressed on fibroblasts also induce the production of ROS [16].

Recently, limited and diffuse cutaneous subsets of SSc have been reproduced in mice by repeated intradermal injections of agents, such as hypochlorous acid (HOCl), generating various types of ROS [17]. Although the role of HOCl in the development of SSc is not known, exposition to organic solvents has been identified as an environmental risk factor for SSc [18]. Daily subcutaneous injections of HOCl to BALB/c mice during 6 weeks induce localized cutaneous and lung fibrosis along with the production of antitopoisomerase-I antibodies in the serum, all features that characterize diffuse cutaneous SSc in humans [17]. HOCl injections increase B cell and CD4+ T cell numbers in the spleen and total serum IgG and IgM antibody levels, with the production of antitopoisomerase-I antibodies. In the lungs, ex vivo analyses with immunohistochemistry evidence inflammatory infiltrates that mostly comprise T cells.

HOCl injections lead to inflammatory changes, as observed in early stages of SSc. Subcutaneous HOCl stimulates fibroblasts to produce ROS, which confer an activated phenotype to fibroblasts through the phosphorylation of ERK1/2. ROS production also induces the differentiation into α -SMA-expressing myofibroblasts and stimulates the production of type-I collagen, leading to skin fibrosis [19]. The role of immune system has also been underlined in this model, which predominantly affects lung fibrosis.

The strength of this model is the systemic effects of HOCl injections, leading to extensive dermal and pulmonary fibrosis and the production of antitopoisomerase-I antibodies. Although this model is easy to perform, 6 weeks of daily injections are required for the development of fibrosis. In addition, this model has to be replicated and validated in further studies, since a single group has described this model in detail so far.

2.3. Topoisomerase-I and complete Freund's adjuvant-induced skin and lung fibrosis

Recently, a Japanese group described a new inducible mouse model of diffuse cutaneous SSc [20]. They showed that subcutaneous injections of topoisomerase-I and complete Freund's adjuvant (CFA) (four times subcutaneously into a single location

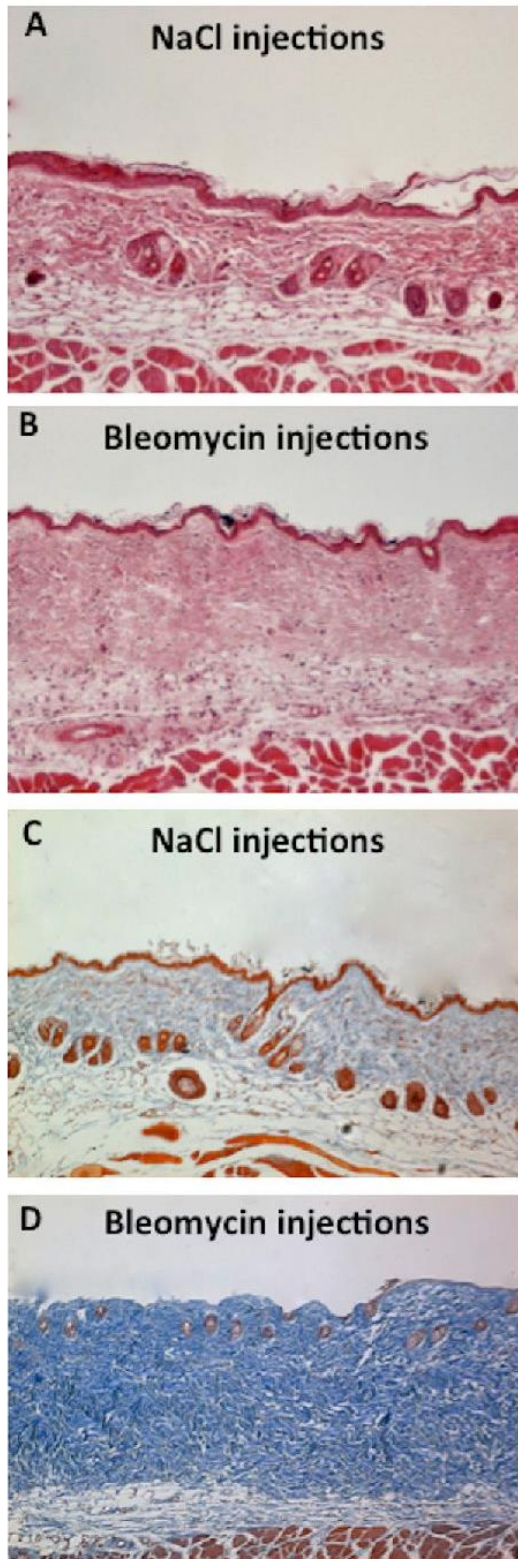


Fig. 1. Histological features of bleomycin-induced skin fibrosis compared to mice injected with sodium chloride. A and B: representative sections stained by hematoxylin/eosin at 100-fold magnification. Increased dermal thickness is observed in

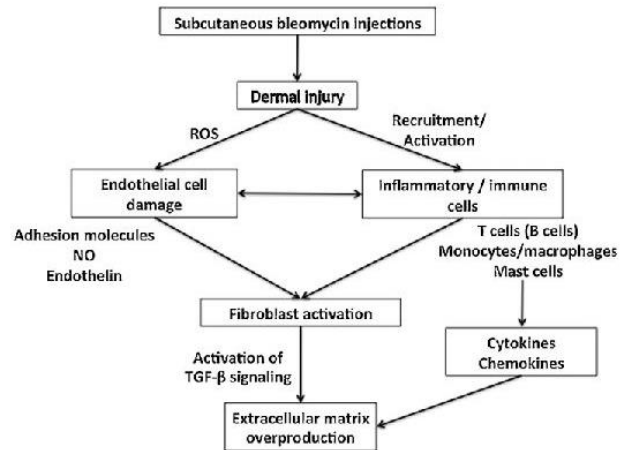


Fig. 2. Schematic design of the possible pathogenesis of bleomycin-induced systemic sclerosis. NO: nitric oxide; ROS: reactive oxygen species.

on the shaved back of the mice at an interval of 2 weeks) induced skin and lung fibrosis together with autoimmune abnormalities in C57BL/6 mice. Increased IL-6, TGF- β 1 and IL-17 production, such as decreased IL-10 production, was measured in this model, together with increased TH2 and TH17 cell frequencies in bronchoalveolar lavage fluid. In addition, loss of IL-6 production improved skin and lung fibrosis, decreased TH2 and TH17 frequencies, supporting that IL-6 plays important roles in the development of fibrosis and autoimmune abnormalities in this model. This model has the advantage to reproduce the characteristics of diffuse cutaneous SSc, especially with the production of antitopoisomerase antibodies. However, since a single group has reported the outcome of mice injected with topoisomerase-I and CFA, further studies are required to fully assess and validate the use of this model.

2.4. Sclerodermatous Chronic Graft-versus-Host Disease model

Chronic Graft-versus-Host Disease (GvHD) emerges from alloreactive processes between donor-derived immune cells and host cell populations. Cytotoxic GvHD and sclerodermatous GvHD (Scl-GvHD) are the two major forms of chronic GvHD. Scl-GvHD, the fibrosing variant, resembles SSc and makes up 10 to 15% of chronic GvHD [21]. The clinical similarity of Scl-GvHD and diffuse SSc led to the hypothesis that SSc might be a variant of chronic GvHD [22,23]. Based on clinical similarities of Scl-GvHD and SSc, transplantation of minor histocompatibility antigens from donor into recipient mice was established as another model to mimic SSc.

Scl-GvHD can be induced by transplanting B10.D2 bone marrow and spleen cells into BALB/mice after lethal γ -irradiation of recipients [24]. Approximately 2 weeks after bone marrow transplantation, T cells, monocytes, mast cells, and other leukocytes infiltrate affected tissues and stimulate resident fibroblasts to release large amounts of ECM proteins [25,26]. Similar to human SSc, TGF- β may transmit profibrotic signals from inflammatory cells to fibroblasts [27,28]. Scl-GvHD mice exhibit skin

mice injected subcutaneously with bleomycin for 3 weeks (B) compared to mice injected with sodium chloride within the same time period (A). In addition, thickened collagen bundles and cellular infiltrates are observed in mice treated with bleomycin (B). C and D: representative sections stained by trichrome staining at 100-fold magnification. Increased accumulation of collagen is observed in mice subjected to bleomycin injections (D) compared to mice injected with sodium chloride (C).

thickening and pulmonary fibrosis with loss of dermal fat and atrophy of appendages 3 weeks after bone marrow transplantation [24,25].

Fibrosis also affects the liver, kidneys, gastrointestinal tract, and parotid glands in transplanted mice [26,29]. A significant increase of type-I collagen mRNA expression and protein synthesis is induced in the dermis, such as monocytes/macrophages and CD3+ T cells of donor origin. In this context, donor-derived naïve CD4T cells are necessary and sufficient to generate Scl-GvHD, whereas transfer of CD8T cells or effector and memory CD4T cells does not cause Scl-GvHD [30,31]. Recently, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) has been shown to invoke type 17 differentiation, leading to an amplification of IL-17 production, which can control the infiltration of inflammatory cells, such as macrophages or T cells, in Scl-GvHD mice [32]. In addition, Allograft Inflammatory Factor (AIF)-1 has been shown to induce IL-6 secretion on mononuclear cells and fibroblast chemotaxis, supporting that AIF-1 is an important molecule promoting fibrosis in Scl-GvHD and could be an attractive new target for antifibrotic therapy in Scl-GvHD and SSC [33].

As early as 11 days after bone marrow transplantation, mast cell counts decrease in Scl-GvHD mice. Since mast cells can enhance the release of ECM proteins in fibroblasts in vitro, mast cell infiltration and degranulation might contribute to the development of fibrosis in vivo [34,35]. Nevertheless, the exact mechanisms linking mast cell degranulation and fibrosis are still unknown.

A modified model of Scl-GvHD was established by Ruzek et al., who transplanted spleen cells from B10.D2 donor mice into immunodeficient RAG-2 recipients on the BALB/c background [36]. This model is characterized by severe fibrosis of the skin and internal organs, except for lung, which displays only minimal involvement.

Similar to bleomycin-induced skin fibrosis in mice, inflammation and fibrosis are predominant features of both the standard and the modified Scl-GvHD mouse model. Despite autoantibody expression, it is unclear if autoimmunity plays an active role in fibrosis of murine Scl-GvHD. During and after hematopoietic transplantation, immunocompromised mice require special care and sterile conditions. Mice are sensitive to infections and sepsis. Furthermore, isolation and transplantation of hematopoietic cells require sufficient technical skills. When using the standard Scl-GvHD model, an irradiation unit is necessary. Studies with the modified model require sterile breeding facilities. Compared to the model of bleomycin-induced skin fibrosis, handling of Scl-GvHD mice is challenging. Scl-GvHD mice, however, display systemic inflammation and tissue fibrosis thereby closely resembling inflammatory stages of diffuse SSC.

3. Genetic models of SSC

3.1. Tight skin-1 and -2 mouse models

Tight skin-1 (Tsk-1) mice are heterozygous for a mutation (tandem duplication) of the *fibrillin-1* (*fn-1*) gene [37]. Fibrillin-1 is a large ECM structural protein and the major component of microfibrils [38]. Heterozygous Tsk-1 mice spontaneously develop SSC-like features with skin fibrosis and autoimmunity [39]. The most striking feature is the presence of thickened fibrotic hypodermis, in contrast to dermal fibrosis in human SSC. Hypodermal hyperplasia leads to tethering of the skin to the underlying muscle layers. Lung abnormalities of Tsk-1 mice are present at birth and differ from that in human SSC, with emphysema-like alterations contrasting with little fibrosis [40].

Fibrosis in Tsk-1 mice arises from excessive release of ECM proteins by activated fibroblasts. Dermal fibroblasts issued from Tsk-1

mice spontaneously display a profibrotic phenotype in vitro that persists for several passages [41]. Although the exact mechanisms causing fibrosis in Tsk-1 mice remain unclear, abnormal fibrillin might activate the TGF- β cascade [42]. Tsk-1 fibroblasts are more responsive to TGF- β stimulation than control fibroblasts. Moreover, Tsk-1 fibroblasts have elevated Smad2/3 transcriptional activity compared with normal fibroblasts.

The contribution of autoimmunity in this model is still a matter of debate. The prominent production of autoantibodies in Tsk-1 mice suggests that B cells might play an important role in disease development. Indeed, overexpression of CD19 in Tsk-1 mice leads to chronic B cell activation and increased production of IL-6, which might contribute to progression of fibrosis [43]. By contrast, deficiency in CD19 can prevent fibrosis in Tsk-1 mice [43]. Indeed, tissue B cell depletion with an anti-mouse CD20 monoclonal antibody in newborn Tsk-1 mice significantly suppressed the development of fibrosis [44]. CD4+ T cells have been shown to be required for the excessive accumulation of dermal collagen in Tsk-1 mice. By contrast, the fibrotic phenotype fully develops in SCID mice. Moreover, bone marrow transplantation experiments have challenged the role of immune cells in Tsk-1 mice. Transfer of enriched B or T cells increases autoantibody production but does not cause skin fibrosis [45]. In line with this finding, the *fbn-1* mutation can induce fibrosis in RAG-2 mice that lack mature B and T cells [46]. Thus, the exact role of immune phenomena in Tsk-1 mice remains obscure.

The autosomal-dominant Tsk-2 mutant is the result of administration of the mutagenic agent ethylnitrosourea (ENU) [47]. The mutation is located in chromosome 1 and is inherited as an autosomal-dominant trait. Tsk-2 mice develop a tight skin phenotype that is apparent at 3 to 4 weeks of age. Histological examination of the skin shows marked collagen accumulation similar to Tsk-1 mice. The molecular mechanisms, leading to fibrosis of the skin and internal organs are still unknown. In addition to fibrosis, Tsk-2 mice display inflammatory cell infiltrates in the affected tissue as well as a variety of autoantibodies, including antitopoisomerase-I, anticentromere and anti-dsDNA antibodies [48].

The Tsk-1 and -2 mouse models are easy to handle and do not require special treatment. The Tsk-1 model, commonly used to study less inflammatory stages of SSC, is better characterized than the Tsk-2 model. Both models develop thickening of the hypodermis and therefore do not fully recapitulate the histological changes of human SSC. In addition, Tsk mice lack typical features of vasculopathy such as endothelial cell apoptosis (Table 1), and prominent inflammatory infiltrates are absent in the skin of Tsk-1 mice. Therefore, anti-inflammatory agents may only show weak effects in treatment of fibrosis in Tsk mice.

3.2. UCD-200 chicken

UCD-200 chickens spontaneously develop vascular damage, mononuclear cell infiltrates, diffuse fibrosis and polyarthritis [49]. The disease starts 1 to 2 weeks after hatching with erythema and swelling of the comb, which subsequently proceeds to a chronic stage characterized by fibrosis. Histopathological analysis of UCD-200 chickens demonstrates key features of human SSC: intense perivascular mononuclear cell infiltrates, obliterative vasculopathy with loss of functional capillaries and prominent ECM deposition by fibroblasts [50]. Isolated fibroblasts of UCD-200 chickens display an activated phenotype in vitro that persists for several passages [50]. Antinuclear antibodies, autoantibodies against endothelial cells (AECA), antiphospholipid antibodies and rheumatoid factors are usually detected in this model, which may relate to the polyautoimmunity commonly observed in many connective tissue diseases [51]. Vasculopathy is well represented in UCD-200 chickens. Similar to SSC patients, endothelium damage leads to activation and apoptosis of endothelial cells [52,53]. Endothelial cell apoptosis

may be induced by AECA, leading to a progressive loss of capillaries. Capillary rarefaction in turn reduces blood flow and causes lack of nutrients and oxygen, which results in tissue necrosis affecting combs and digits in UCD-200 chickens. A recent study in patients with SSc, however, challenges the role of endothelial cell death in SSc vasculopathy and the specificity of AECA is largely disputed necessitating further investigations [54].

Because of breeding difficulties and size of animals, research with UCD 200 and 206 chickens is very expensive compared to that with mice. Variable expression of disease manifestations between different litters might also hamper research with UCD chickens. Most importantly, tools to study signaling in an avian background are limited.

3.3. *Fra-2* transgenic mice

Fos-related antigen-2 (*Fra-2*) belongs to the activator protein-1 (AP-1) family of transcription factors, which are implicated in stress responses, including cell proliferation, apoptosis, inflammation, wound healing, fibrosis and tumorigenesis [55]. The *Fra-2* transgenic mouse demonstrates a major pulmonary phenotype that includes fibrosis and vasculopathy with a marked proliferative pattern. Neointimal hyperplasia induced by proliferation of vascular smooth muscle cells and obliteration of pulmonary arteries accompanied with perivascular inflammation appears first [56]. This is followed by interstitial inflammation collagen deposition, thus replicating many key aspects of human SSc in a very dramatic way over a relatively short-time course. In addition, the mice develop a similar process in the skin, also showing vascular loss and fibrosis [57].

Further studies need to replicate and validate this promising findings obtained with this model, which shed light on the potential importance of AP-1 family members in the pathogenesis of human SSc and enable testing of antifibrotic agents and drugs targeting vasculopathy simultaneously.

3.4. *TBRI^{CA}; Cre-ER* and *TBR11Δk* mice

3.4.1. *TBRI^{CA}; Cre-ER* mice

In this mouse model, the *TBRI^{CA}* is conditionally expressed in fibroblasts by insertion after a floxed STOP cassette. These mice are bred to estrogen Cre-recombinase mice, providing for estrogen inducible *TBRI^{CA}* expression. Upon activation of TGF-β signaling, progressive and generalized dermal fibrosis occur. However, there is no spontaneous development of pulmonary fibrosis, autoimmune and inflammatory phenomena are absent and the thickening of vessel walls of the small arteries is histologically different from that of human SSc.

This model is an elegant approach to mimic fibrosis in SSc and to study the role of TGF-β signaling for fibroblast activation. However, technical and economic hurdles may limit the use of this model. In this context, injections with attenuated adenoviruses overexpressing a constitutively active TGF-β receptor I may be an alternative approach [55]. Adenoviral activation of TGF-β signaling, however, is not restricted to fibroblasts but may also affect other cell types.

3.4.2. *TBR11Δk* mice

Denton et al. generated another mouse model with fibroblast-specific activation of TGF-β signaling. The *TBR11Δk* model uses the same transcriptional enhancer of *proα2(1) collagen* gene as the *TBRI^{CA}; Cre-ER* model to direct the expression of a kinase-deficient TGF-β receptor II (*TBR11Δk*) to fibroblasts [58,59].

The *TBR11Δk* construct encodes the extracellular and transmembrane domains of the human TGF-β receptor II. It may therefore engage free TGF-β ligand but it cannot directly phosphorylate the TGF-β receptor I and initiate downstream signaling. These mice develop dermal fibrosis, patchy areas of pulmonary fibrosis,

fibrotic cardiomyopathy as well as generalized vascular remodeling, especially in the lungs and large elastic arteries [60]. Fibrotic changes of the pulmonary arteries in *TBR11Δk* mice recapitulate the histological phenotype of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *TBR11Δk* mice also represent a valuable model to study fibrosis in SSc. The mechanisms of disease, however, are less clear than in *TBRICA; Cre-ER* mice. Along with other genetic models, breeding, crossing, and genotyping of *TBR11Δk* mice, require sufficient technical skills and economic resources.

4. Conclusion

Several well-designed models of SSc are available to study different aspects of the disease. The pathogenic mechanism discovered in animal models may provide novel information, and assist in helping us to better understand the underlying human SSc. Animal models of SSc may also serve as promising tools for the development of new therapies. Nevertheless, there is no doubt that none of these models can fully encompass all the features of SSc. Therefore, careful selection of appropriate models is essential before starting in vivo projects. When focusing on overall disease pathogenesis, models that mimic a broad spectrum of SSc pathologies may be favorable. Most of the established SSc animal models show several key pathologic features and all of them display severe tissue fibrosis. By contrast, only few models are suitable to study small vessel vasculopathy.

For the evaluation of novel antifibrotic strategies, it is recommended to start with well-characterized models such as the bleomycin model for inflammation-driven fibrosis and the *Tsk-1* mouse for non-inflammatory stages of SSc. This combination of models has the advantage to reflect both inflammatory (bleomycin model) and non-inflammatory (*Tsk-1* model) stages of SSc, which may minimize discrepancies between therapeutic responses in animal models and patients with SSc.

Taken together, an ideal animal model for SSc does not exist, but several well-designed models are available to study different aspects of the disease. Further characterization of underlying disease mechanisms will help to better understand and use these models in SSc research.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

References

- [1] Botzoris V, Drosos AA. Management of Raynaud's phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2011;78:341–6.
- [2] Allano Y, Avouac J, Wipff J, et al. New therapeutic strategies in the management of systemic sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:607–15.
- [3] Allano Y, Avouac J, Kahan A. Systemic sclerosis: an update in 2008. *Joint Bone Spine* 2008;75:650–5.
- [4] Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, et al. Animal model of sclerotic skin. I: local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112:456–62.
- [5] Ishikawa H, Takeda K, Okamoto A, et al. Induction of autoimmunity in a bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4+ T cells. *J Invest Dermatol* 2009;129:1688–95.
- [6] Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, et al. CD19 regulates skin and lung fibrosis via toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol* 2008;172:1650–63.
- [7] Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol* 2005;14:81–95.
- [8] Oi M, Yamamoto T, Nishioka K. Increased expression of TGF-beta1 in the sclerotic skin in bleomycin-'susceptible' mouse strains. *J Med Dent Sci* 2004;51:7–17.
- [9] Takagawa S, Lakos G, Mori Y, et al. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol* 2003;121:41–50.

- [10] Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. V: increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol* 2002;102:77–83.
- [11] Kitaba S, Murota H, Terao M, et al. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol* 2012;180:165–76.
- [12] Assier E, Boissier MC, Dayer JM. Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine* 2010;77:532–6.
- [13] Allanore Y, Borderie D, Lemarchal H, et al. Acute and sustained effects of dihydropyridine-type calcium channel antagonists on oxidative stress in systemic sclerosis. *Am J Med* 2004;116:595–600.
- [14] Avouac J, Borderie D, Ekinjian OG, et al. High DNA oxidative damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2010;37:2540–7.
- [15] Sambo P, Jannino L, Candela M, et al. Monocytes of patients with systemic sclerosis scleroderma spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. *J Invest Dermatol* 1999;112:78–84.
- [16] Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354:2667–76.
- [17] Servettaz A, Gouvestre C, Kavian N, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol* 2009;182:5855–64.
- [18] Mora GF. Systemic sclerosis: environmental factors. *J Rheumatol* 2009;36:2383–96.
- [19] Batteux F, Kavian N, Servettaz A. New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:511–8.
- [20] Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, et al. Immunization with DNA topoisomerase-1 and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis Rheum* 2011;63:3575–85.
- [21] Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 2003;54:29–52.
- [22] Lawley TJ, Peck GL, Moutsopoulos HM, et al. Scleroderma, Sjogren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 1977;87:707–9.
- [23] Lambert NC, Lo YM, Erickson TD, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood* 2002;100:2845–51.
- [24] Jaffee BD, Claman HN. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell Immunol* 1983;77:1–12.
- [25] Claman HN, Jaffee BD, Huff JC, et al. Chronic graft-versus-host disease as a model for scleroderma. II. Mast cell depletion with deposition of immunoglobulins in the skin and fibrosis. *Cell Immunol* 1985;94:73–84.
- [26] Howell CD, Yoder T, Claman HN, et al. Hepatic homing of mononuclear inflammatory cells isolated during murine chronic graft-versus-host disease. *J Immunol* 1989;143:476–83.
- [27] Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, et al. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J Immunol* 2002;168:3088–98.
- [28] McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, et al. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol* 1999;163:5693–9.
- [29] Levy S, Nagler A, Okon S, et al. Parotid salivary gland dysfunction in chronic graft-versus-host disease (cGVHD): a longitudinal study in a mouse model. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:1073–8.
- [30] Anderson BE, McNiff J, Yan JD, et al. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2003;112:101–8.
- [31] Hamilton BL. L3T4-positive T cells participate in the induction of graft-versus-host disease in response to minor histocompatibility antigens. *J Immunol* 1987;139:2511–5.
- [32] Hill GR, Oliver SD, Kuns RD, et al. Stem cell mobilization with G-CSF induces type 17 differentiation and promotes scleroderma. *Blood* 2010;116:819–28.
- [33] Yamamoto A, Ashihara E, Nakagawa Y, et al. Allograft inflammatory factor-1 is overexpressed and induces fibroblast chemotaxis in the skin of sclerodermatous GVHD in a murine model. *Immunol Lett* 2011;135:144–50.
- [34] Choi KL, Giorno R, Claman HN. Cutaneous mast cell depletion and recovery in murine graft-versus-host disease. *J Immunol* 1987;138:4093–101.
- [35] Claman HN. Mast cell depletion in murine chronic graft-versus-host disease. *J Invest Dermatol* 1985;84:246–8.
- [36] Ruzek MC, Jha S, Ledbetter S, et al. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. *Arthritis Rheum* 2004;50:1319–31.
- [37] Siracusa LD, McGrath R, Ma Q, et al. A tandem duplication within the *fib-1* gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res* 1996;6:300–13.
- [38] Wipff J, Avouac J, Le Charpentier M, et al. Dermal tissue and cellular expression of fibrillin-1 in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:657–61.
- [39] Menton DN, Hess RA. The ultrastructure of collagen in the dermis of tight skin (Tsk) mutant mice. *J Invest Dermatol* 1980;74:139–47.
- [40] Baxter RM, Crowell TP, McCrann ME, et al. Analysis of the tight skin (Tsk1/+) mouse as a model for testing antifibrotic agents. *Lab Invest* 2005;85:1199–209.
- [41] Bocchieri MH, Jimenez SA. Animal models of fibrosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16:153–67.
- [42] Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, et al. Latent transforming growth factor-beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem* 2003;278:2750–7.
- [43] Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight skin mouse. *J Clin Invest* 2002;109:1453–62.
- [44] Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, et al. B lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight skin mouse model for systemic sclerosis. *Am J Pathol* 2006;169:954–66.
- [45] Phelps RG, Daian C, Shibata S, et al. Induction of skin fibrosis and autoantibodies by infusion of immunocompetent cells from tight skin mice into C57BL/6Pa mice. *J Autoimmun* 1993;6:701–18.
- [46] Siracusa LD, McGrath R, Fisher JK, et al. The mouse tight skin (Tsk) phenotype is not dependent on the presence of mature T and B lymphocytes. *Mamm Genome* 1998;9:907–9.
- [47] Christner PJ, Peters J, Hawkins D, et al. The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum* 1995;38:1791–8.
- [48] Gentiletti J, McCloskey LJ, Artlett CM, et al. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J Immunol* 2005;175:2418–26.
- [49] van de Water J, Gershwin ME. Animal model of human disease. Avian scleroderma. An inherited fibrotic disease of white Leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis. *Am J Pathol* 1985;120:478–82.
- [50] Gershwin ME, Abplanalp H, Castles JJ, et al. Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Exp Med* 1981;153:1640–59.
- [51] Avouac J, Airo P, Dieude P, et al. Associated autoimmune diseases in systemic sclerosis define a subset of patients with milder disease: results from 2 large cohorts of European Caucasian patients. *J Rheumatol* 2010;37:608–14.
- [52] Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, et al. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996;98:785–92.
- [53] Wick G, Andersson L, Hala K, et al. Avian models with spontaneous autoimmune diseases. *Adv Immunol* 2006;92:71–117.
- [54] Fleming JN, Nash RA, McLeod DO, et al. Capillary regeneration in scleroderma: stem cell therapy reverses phenotype? *PLoS ONE* 2008;3:e1452.
- [55] Avouac J, Palumbo K, Tomcik M, et al. Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor beta-mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum* 2012;64:1642–52.
- [56] Maurer B, Busch N, Jungel A, et al. Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation* 2009;120:2367–76.
- [57] Reich N, Maurer B, Akhmetshina A, et al. The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010;62:280–90.
- [58] Denton CP, Zheng B, Evans LA, et al. Fibroblast-specific expression of a kinase-deficient type II transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor leads to paradoxical activation of TGF-beta signaling pathways with fibrosis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2003;278:25109–19.
- [59] Denton CP, Zheng B, Shiwen X, et al. Activation of a fibroblast-specific enhancer of the *proalpha2(I) collagen* gene in tight skin mice. *Arthritis Rheum* 2001;44:712–22.
- [60] Derrett-Smith E, Dooley A, Khan K, et al. Aortic smooth muscle cells show a profibrotic phenotype in a TGF-beta dependent mouse model of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1061.

CHAPITRE 4 : THERAPIE CIBLEE ANTI-OX40 LIGAND AU COURS DE LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE

I. OX40 Ligand : Présentation et fonctions biologiques

1. Introduction

Les signaux de co-stimulation délivrés par les cellules présentatrices de l'antigène sont nécessaires à l'activation optimale des lymphocytes T, après la liaison CMH-TCR. Il existe tout d'abord des signaux de co-stimulation précoces (CD40/CD40L, CD80/CD86-CD28).

Les signaux de co-stimulation tardifs, membres de la superfamille des récepteurs au Tumor Necrosis Factor (TNF), comme OX40 (CD134), CD27 et 4-1BB présentent comme intérêt majeur une expression transitoire dans les suites de l'activation du lymphocyte T (397–399). Parmi ceux-ci, le couple OX40-OX40L (OX40 ligand) a retenu notre attention. OX40L (CD252), initialement nommé glycoprotéine 34, a été identifié comme une protéine exprimée sur les cellules leucémiques HTLV1 (human T cell leukemia). Ce n'est qu'ensuite que son appartenance à la superfamille du TNF et sa liaison à OX40 ont été découvertes. OX40L est codé par le gène *TNFSF4*, membre de la superfamille du TNF, situé sur le bras long du chromosome 1 au locus 1q25.

2. Induction de l'expression d'OX40-OX40L et mécanismes régulateurs

OX40-OX40L est impliqué dans les signaux de co-stimulation tardifs du lymphocyte T. L'expression d'OX40 sur les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ est induite 48 à 72 heures après la stimulation antigénique et disparaît 4 à 5 jours après. De même, l'expression d'OX40L sur les cellules présentatrices d'antigène est observée 48 à 72 heures après le signal de co-stimulation précoce, tel que la liaison CD40-CD40L. Ainsi, l'interaction OX40-OX40L est tardive, observée 2 à 3 jours après la reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T. Un modèle en 2 étapes a été suggéré. La figure 21 présente ce modèle ainsi que les différentes cellules exprimant OX40L (397,400–405).

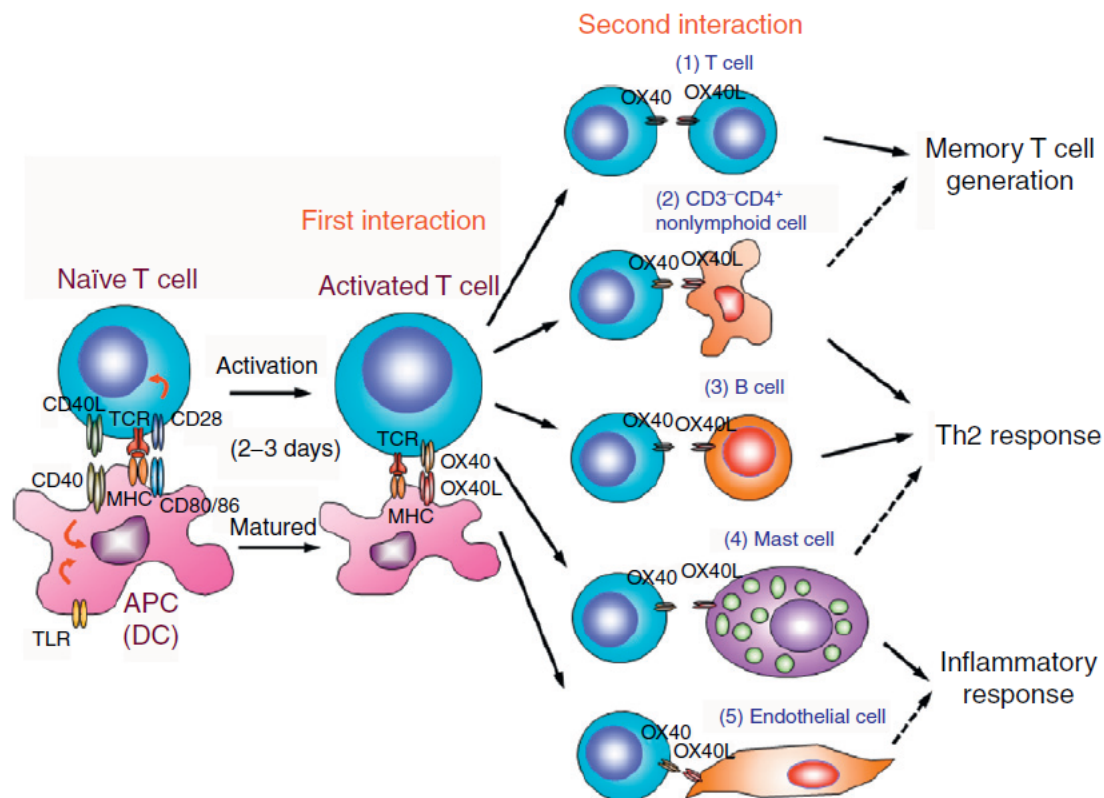
L'expression d'OX40L sur les lymphocytes T CD4+ favorise l'interaction lymphocyte T-lymphocyte T et contribue ainsi à l'amplification de la réponse lymphocytaire T. OX40 est exprimé sur les lymphocytes T régulateurs (406), les lymphocytes T NK activés et les

lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés. Les cellules présentatrices d'antigène sont souvent localisées aux sites de l'inflammation et il est suggéré que cela empêche l'activation généralisée d'OX40 sur les lymphocytes T *in vivo* puisque uniquement les lymphocytes T capables de migrer sur les sites de l'inflammation pourront recevoir la co-stimulation spécifique d'OX40L.

a) Régulation de l'expression d'OX40-OX40L

L'intensité de l'expression d'OX40 dépend de l'intensité du signal TCR et d'autres signaux de co-stimulation comme CD28, IL-2/IL-2 récepteur (407–409). Ainsi, en présence d'une stimulation du TCR suboptimale, l'addition d'IL-2 exogène augmente l'expression d'OX40 sur les lymphocytes T CD8 (410). De même, l'adjonction d'anticorps monoclonaux anti-IL-2 et anti-récepteur de l'IL-2 peut diminuer l'étendue de la réponse OX40 sur les lymphocytes T régulateurs et inhiber l'induction d'OX40 sur les lymphocytes T CD8 activés (409). Or, la stimulation CD28 va entraîner une augmentation de la production d'IL-2 et de l'expression de récepteurs à l'IL-2 sur les lymphocytes T activés. Ainsi la voie de signalisation du CD28 peut être directe ou indirecte médiée par un mécanisme dépendant de l'IL-2.

Figure 21 : Modèle de co-stimulation OX40-OX40L en 2 temps
 Extrait de Ishii et al. Adv Immunol 2010 (397)



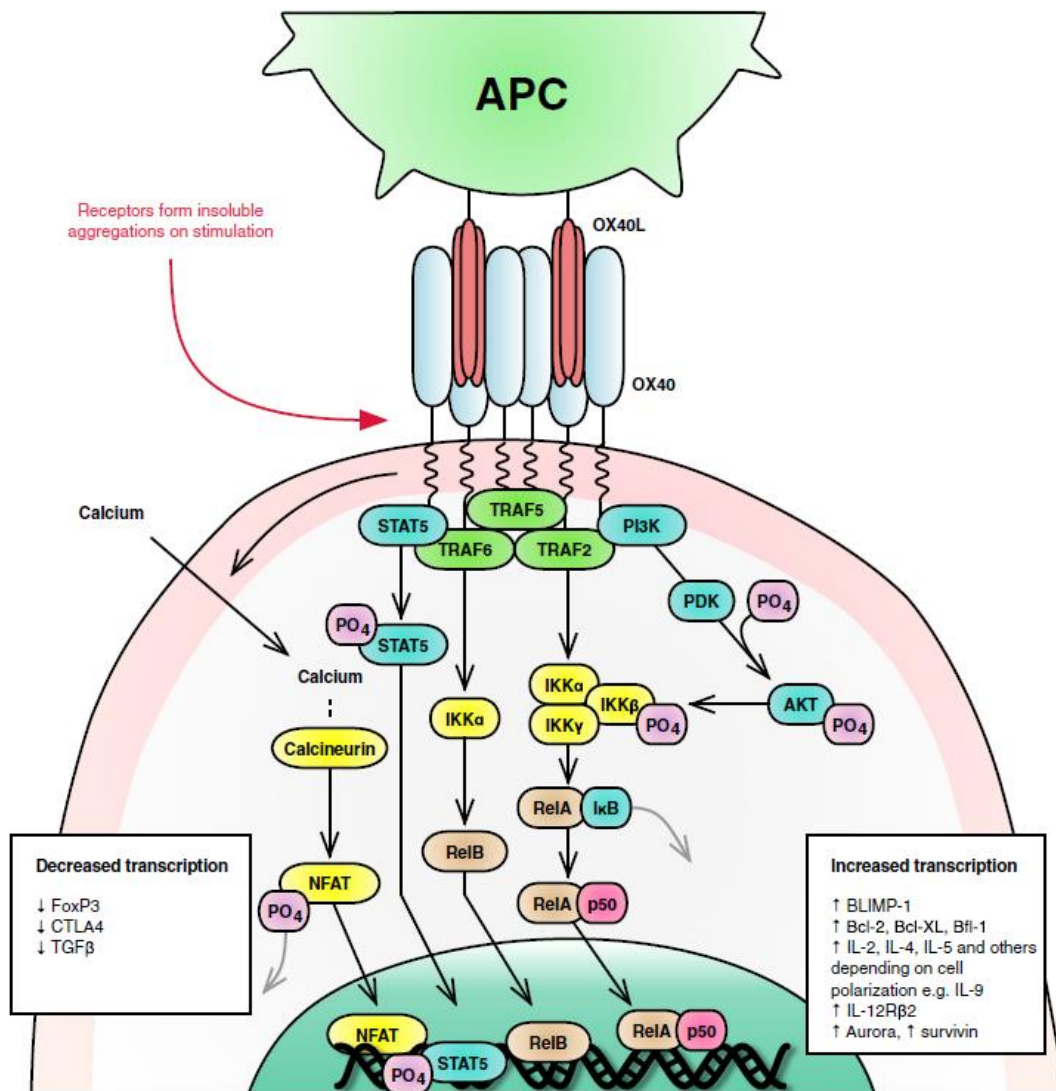
Le signal de co-stimulation OX40-OX40L est un signal tardif observé sur les lymphocytes T préalablement activés par des signaux de co-stimulation précoces (CD40/CD40L, CD28/CD80/86). Il est observé 2 à 3 jours après la reconnaissance de l'antigène et va permettre l'activation des lymphocytes T. Dans un second temps, l'interaction OX40-OX40L sur les lymphocytes T CD4 va permettre leur différenciation en lymphocytes T CD4 mémoires. L'expression d'OX40L sur les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes B et les cellules mastocytaires va induire une réponse de type Th2 après liaison à OX40 exprimé sur les lymphocytes T et l'expression d'OX40L sur les cellules endothéliales et les cellules mastocytaires contribue à la réponse inflammatoire.

3. Voies de signalisation d'OX40-OX40L

Les voies de signalisation d'OX40-OX40L sont représentées Figure 22 (407,411–413).

Par ailleurs, une étude a mis en évidence une hyperexpression des ARNm de c-jun et c-fos dans les cellules endothéliales, après liaison de OX40L, ce qui suggère une implication de la voie de signalisation AP-1(405).

Figure 22 : Voies de signalisation d'Ox40L
 Extrait de Webb et al. Clin Rev Allerg Immunol (414)



Ox40L est trimérique et chaque trimère se lie à 3 molécules OX40. OX40-OX40L active différentes voies de signalisation : PI3K/AKT (=PKB), NFκB1, STAT5 et NFAT. Après liaison d'Ox40 et OX40L, un complexe est formé impliquant TNF receptor associated factor 2 et 6 et possiblement TRAF5. Ce complexe active la voie canonique de NFκB avec formation du complexe IKKα, IKKβ et IKKgamma. IKKβ est phosphorylé et dégradé. La sous-unité RelA de NFκB et p50 peuvent entrer dans le noyau. TRAF6 active la voie non canonique de NFκB avec translocation de RelB dans le noyau. L'interaction OX40-OX40L entraîne également la phosphorylation de STAT5 qui est transloqué dans le noyau. OX40 permet l'entrée intracellulaire de calcium qui active les calcineurines entraînant une déphosphorylation de NFAT et son entrée dans le noyau. PI3K se complexe à OX40 activé, entraînant la phosphorylation d'AKT selon un mécanisme dépendant de PDK, ce qui amplifie la voie IKK. Les voies de signalisation NFAT et PI3K amplifient le signal dépendant de l'antigène. Ces voies de signalisation induisent l'expression de gènes impliqués dans la division cellulaire et la survie des lymphocytes T ainsi que de gènes de cytokines et de récepteurs cytokiniques. Elles promeuvent un phénotype effecteur des lymphocytes avec suppression de la transcription de FoxP3 et augmentation de la transcription de BLIMP-1 (PR domain zinc finger protein). La transcription cytokinique dépend de la polarisation du lymphocyte T.

4. Rôle d'Ox40-Ox40L dans l'accumulation et la différenciation des lymphocytes T

a) Ox40-Ox40L favorise l'expansion clonale des lymphocytes T

Les signaux de co-stimulation Ox40-Ox40L favorisent l'expansion et la différenciation d'un clone lymphocytaire T effecteur en réponse à l'antigène. L'expansion des lymphocytes T CD4 et CD8 est liée en particulier à une augmentation de la survie des lymphocytes T activés, comme l'attestent les voies de signalisation d'Ox40-Ox40L avec induction de l'expression de gènes anti-apoptotiques (407,415) (Figure 22). Les souris invalidées pour Ox40L ou traitées par anticorps anti-Ox40L présentent une diminution de l'expansion et de la survie des lymphocytes T CD4+ *in vivo* (398).

Ox40-Ox40L pourrait également contribuer à la migration et à l'infiltration des lymphocytes T dans les tissus du fait de l'expression d'Ox40L sur les cellules endothéliales (404).

Enfin, la voie Ox40-Ox40L favorise la production de cytokines par les lymphocytes T, dont le type dépend de la polarisation du lymphocyte T. Comme les cytokines dérivées des lymphocytes T infiltrant les tissus peuvent recruter et activer d'autres cellules inflammatoires, cibler la voie Ox40-Ox40L peut également avoir un effet anti-inflammatoire en empêchant la constitution de l'infiltrat inflammatoire (399).

b) Effet sur la différenciation des lymphocytes T

La voie Ox40-Ox40L promeut la co-stimulation des lymphocytes T vers une voie Th2 (416,417). Cette co-stimulation serait liée à une production précoce autocrine d'IL-4. Cela a été suggéré par plusieurs études dans des modèles murins et primates d'asthme où le blocage d'Ox40L était associé à une diminution de la réponse inflammatoire Th2 (418). Toutefois, la polarisation vers une voie Th1 ou Th17 voire Th9 est possible dépendant du milieu cytokinique, de la force de la stimulation par le TCR et de la dose d'antigène (414,419–421).

La voie de signalisation Ox40-Ox40L augmente la différenciation des lymphocytes T CD8 effecteurs contre les antigènes tumoraux, augmente leur activité cytolytique et leur accumulation sur le site de la tumeur (409). Cet effet a été associé à une diminution des macrophages tumoraux et à une diminution du TGF- β .

L'interaction Ox40-Ox40L pourrait inhiber la production d'IL-17 ; toutefois cet effet est réversé par l'adjonction d'IFN-gamma (422).

5. Rôle d'OX40-OX40L dans la fonction et le développement des lymphocytes T régulateurs

La tolérance immune dépend des lymphocytes T régulateurs naïfs Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ et des lymphocytes T régulateurs induits en réponse à l'antigène.

Alors que l'expression d'OX40 sur les lymphocytes T activés est transitoire, l'expression sur les lymphocytes T régulateurs est constitutive chez la souris. Les lymphocytes T régulateurs expriment des niveaux élevés d'OX40 et plusieurs études *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles murins d'inflammation, ont montré un défaut de la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs naïfs lorsqu'il existe une activation de la voie OX40-OX40L, mais cela n'influence pas leur développement. Cet effet permet d'amplifier encore l'effet d'OX40 sur la prolifération et la survie des lymphocytes T effecteurs.

OX40 a également un effet sur les lymphocytes T régulateurs inductibles: l'activation de la voie de signalisation OX40-OX40L *in vitro* et *in vivo*, en présence du TGF- β et d'une stimulation TCR/CD28, inhibe la différenciation des lymphocytes T CD25-CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs inductibles Foxp3⁺, en partie en diminuant l'expression de Foxp3 (423–426). Ainsi, un traitement préventif des lymphocytes T régulateurs avec un anti-OX40 *in vitro* a inhibé la capacité des lymphocytes T régulateurs à supprimer les lymphocytes T CD4 effecteurs dans un modèle de GVHD (427). Toutefois, une autre équipe a suggéré que cet effet serait dépendant de l'environnement et qu'au contraire, la stimulation de la voie pourrait promouvoir l'expansion des lymphocytes T régulateurs inductibles, si l'IL-4 et l'IFN- γ étaient absents du milieu (428).

Ainsi, un excès d'OX40L inhibe la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs naïfs et la différenciation des lymphocytes T régulateurs inductibles Foxp3⁺ responsable d'une rupture dans la tolérance immune des lymphocytes T.

6. Rôle dans la maintenance et la réactivation des LT mémoires

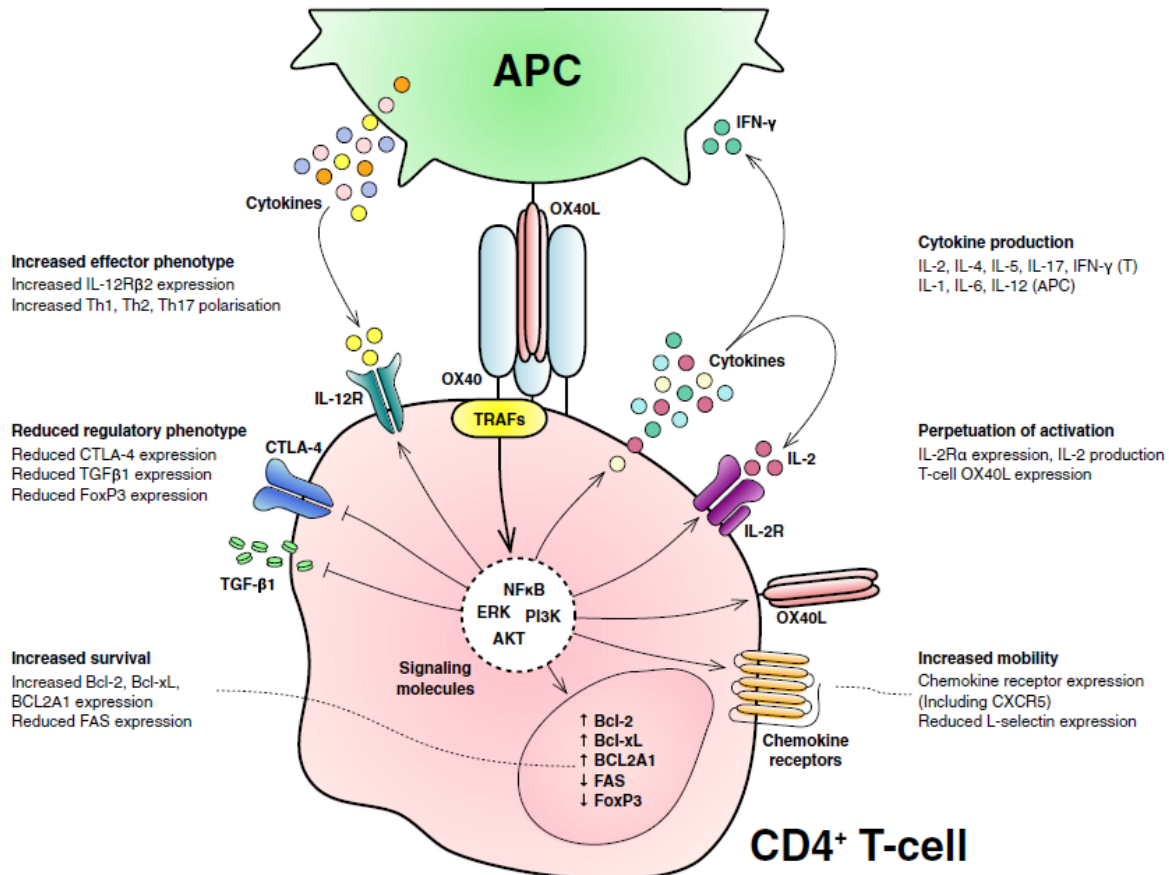
OX40-OX40L promeut la génération de lymphocytes T CD4⁺ mémoires (ainsi que de lymphocytes T CD8⁺ mémoires mais dans une moindre mesure) et semble également impliqué dans la réactivation des lymphocytes T CD4⁺ mémoires sensibilisés à l'antigène (398). Ainsi, l'interaction OX40-OX40L contrôlerait l'accumulation des lymphocytes T effecteurs au pic de la réponse immune avec ensuite une conversion d'un certain nombre de ces lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T mémoires. Ces conclusions ont été renforcées

par l'analyse de souris transgéniques exprimant OX40L sur les cellules dendritiques ou les lymphocytes T CD4 dans lesquelles un signal constitutif OX40 entraîne une augmentation du pool de lymphocytes T mémoires CD4+ (429).

Les effets de l'interaction OX40-OX40L sur les lymphocytes T sont résumés dans la Figure 23.

Figure 23 : Effet de l'interaction OX40-OX40L sur le lymphocyte T

Extrait de Webb et al. Clin Rev Allerg Immunol (414)



Les effets de l'interaction OX40-OX40L sont présentés sur cette figure avec les effets majeurs en gras. Les flèches correspondent aux effets positifs, tandis que les lignes barrées montrent un effet négatif. Les lignes en pointillées montrent les relations. Cette interaction augmente la survie des lymphocytes T, leur différenciation en lymphocytes T effecteurs, la production de cytokines et inhibe les lymphocytes T régulateurs.

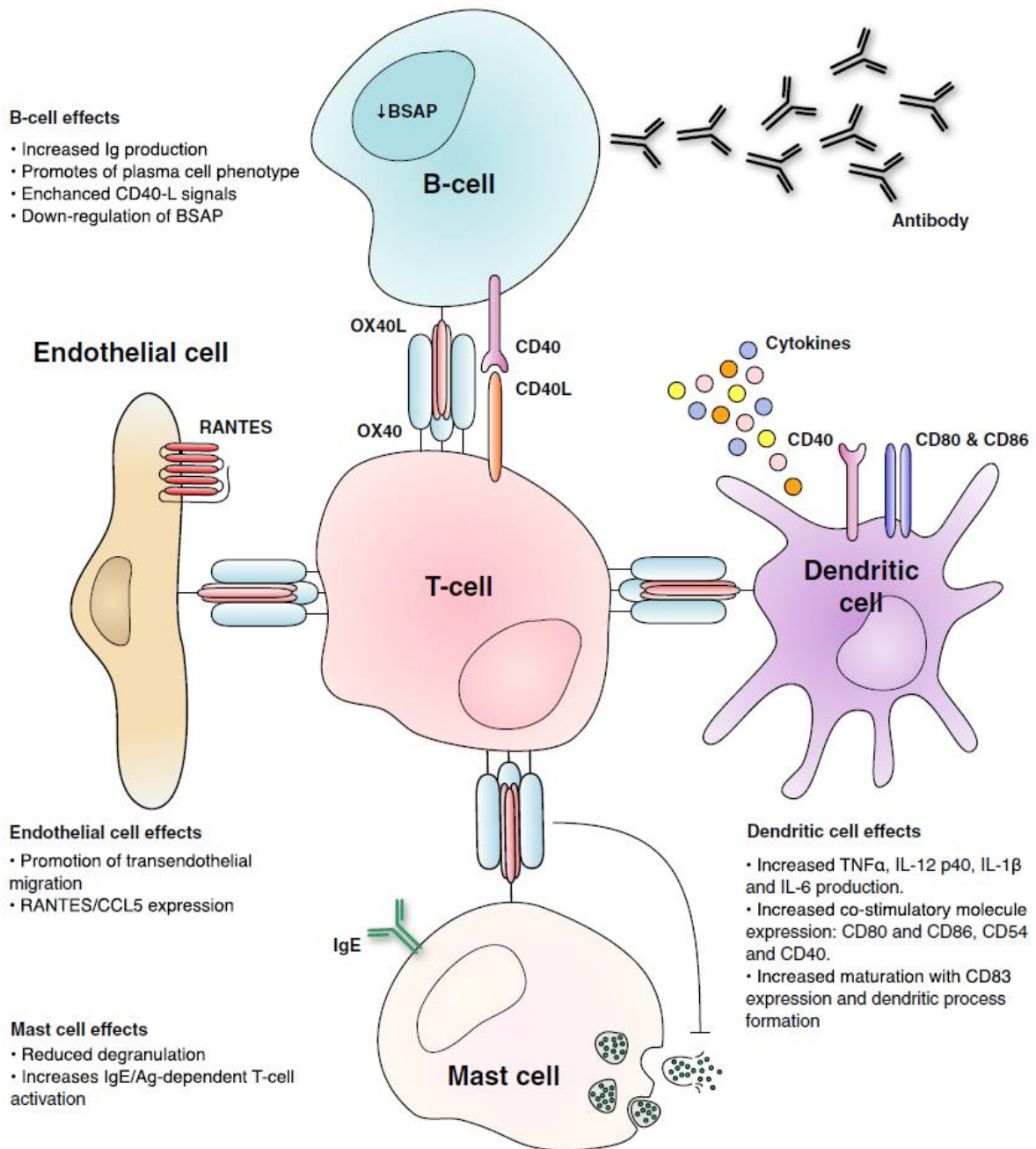
APC : cellule présentatrice d'antigène, IL : interleukine, IL2Rα : récepteur alpha de l'interleukine-2, IL12-R : récepteur de l'IL-12, IFN-γ : interféron gamma, CXCR5 : C-X-C chemokine receptor type 5, Th1 : T-helper cell type 1, Th2 : T-helper cell type 2, Th17 : T-helper cell type 17, CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, TGF-β : transforming growth factor beta, FoxP3 : forkhead box p3, Bcl-2 : B cell lymphoma 2, Bcl-xl : B cell lymphoma-extra large, Bcl2A1 : Bcl-2-related protein A1, FAS : Fas cell surface death receptor, TRAF : TNF receptor-associated factor, ERK : extracellular-signal-regulated kinases, PI3K : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonate 3-kinase, AKT : protein kinase B, NFκB : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell

7. Effets de l'interaction OX40-OX40L sur les cellules non T

L'interaction OX40-OX40L a des effets sur le lymphocyte B, les cellules endothéliales, les cellules dendritiques et les cellules mastocytaires. L'interaction OX40-OX40L participe à l'activation des plasmocytes et à la production d'anticorps. Son expression par les cellules endothéliales est impliquée dans le recrutement des leucocytes sur le site inflammatoire par l'expression de CCL5. L'interaction OX40-OX40L augmente encore la co-stimulation des lymphocytes T par augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation par les cellules dendritiques. Elle est également impliquée dans la production de TNF- α et IL-6 par les cellules dendritiques (414). Les effets de l'interaction OX40-OX40L sur les cellules non T sont résumés dans la Figure 24.

Figure 24 : Effet de l'interaction OX40-OX40L sur les cellules non lymphocytes T

Extrait de Webb et al. Clin Rev Allerg Immunol (414)



L'interaction OX40-OX40L agit sur différentes cellules non lymphocyte T. Ig : immunoglobuline, BSAP : B cell specific activator protein, RANTES/CCL5= regulated on activation, normal T cell expressed and secreted/chemokine (C-C motif)ligand 5, IL= interleukine, TNF- α : tumor necrosis factor alpha

II. Rôles d'OX40-OX40L dans les maladies inflammatoires et l'auto-immunité

Le rôle d'OX40-OX40L dans l'auto-immunité a été étudié dans plusieurs modèles animaux. La première étude a porté sur un modèle d'encéphalomyélite auto-immune chez le rat (430). Les lymphocytes T CD4 isolés du site inflammatoire exprimaient des niveaux élevés d'OX40 au début de la maladie, tandis que les lymphocytes T isolés du sang périphérique et de la rate du même animal exprimaient des niveaux faibles d'OX40. A la suite de ce travail, la même équipe a montré que l'inhibition de la voie OX40-OX40L, permettait de réduire les symptômes de la maladie (431). Les souris invalidées pour OX40L ou traitées par une protéine de fusion OX40.Ig étaient protégées du développement de la maladie, tandis que les souris transgéniques pour OX40L présentaient des signes plus marqués d'encéphalomyélite auto-immune (432).

Le blocage de l'interaction OX40–OX40L a été bénéfique et a eu un effet anti-inflammatoire dans plusieurs modèles de maladies inflammatoires dans lesquelles les lymphocytes T CD4 ou CD8 activés orchestrent la réponse immune *in vivo* par un agent se liant spécifiquement à OX40L, soit un anticorps soit une protéine de fusion OX40-Ig comme la colite inflammatoire, la GVHD, la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme ou le diabète auto-immun (398,433). Dans le modèle de GVHD, l'utilisation précoce d'anticorps anti-OX40L ou de souris OX40L^{-/-} a permis de diminuer les signes de la maladie et la mortalité de 70% (434,435). Dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde, l'administration d'un anticorps neutralisant anti-OX40L à des souris déjà immunisées a diminué de manière significative la sévérité de l'arthrite induite par le collagène ainsi que le taux d'anticorps spécifiques (402,436). Dans des modèles d'asthme allergique, les souris invalidées pour OX40 et OX40L étaient caractérisées par une diminution de l'infiltrat pulmonaire Th2 (437,438) et le blocage d'OX40L par invalidation ou par inactivation génique a empêché l'accumulation de lymphocytes T effecteurs et a prévenu le développement de la réponse asthmatique (439). Dans un modèle murin de maladie de Crohn, l'administration d'un anticorps monoclonal neutralisant anti-OX40L a non seulement permis la prévention de la colite mais aussi la guérison d'une colite établie (440). Dans tous ces modèles, l'amélioration de la symptomatologie a été associée à une diminution des réponses lymphocytaires T CD4 ou CD8.

De manière intéressante, l'expression d'OX40 sur les lymphocytes T a précédé l'apparition des signes cliniques dans des modèles animaux d'arthrite induite par injection d'adjuvant et d'encéphalomyélite auto-immune (441,442). Ces données suggèrent que l'expression d'OX40 par les lymphocytes T serait un élément précoce voire initiateur du développement du

phénotype clinique auto-immun. Les autres données obtenues *in vivo* dans des modèles animaux sont résumées dans le tableau 6.

Des variants de *TNFSF4* ont été associés au développement du lupus érythémateux systémique (444–446). La modification génétique avait des conséquences fonctionnelles avec une augmentation de l'expression à la fois au niveau ARN et au niveau protéique d'OX40L (443). OX40-OX40L semble impliqué dans la physiopathologie du lupus en contribuant à la formation de lymphocytes T auxiliaires folliculaires (446). Mais, le rôle d'OX40-OX40L dans le lupus n'a pas été conforté *in vivo* dans des modèles murins pour le moment.

Des polymorphismes génétiques d'OX40L ont été associés au risque de développer une athérosclérose et la contribution fonctionnelle d'OX40L à cette maladie a été confortée dans des modèles murins (447,448)

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le développement de ces maladies et le rôle bénéfique de l'inactivation de la voie OX40-OX40L dans ce contexte: (i) une réponse inflammatoire soutenue liée à la survie persistante des lymphocytes T effecteurs du fait d'un signal médié par OX40, (ii) une rupture dans la tolérance immune liée à une inhibition de la fonction des lymphocytes T régulateurs, (iii) OX40L présent sur les cellules endothéliales activées pourrait interagir avec OX40 exprimé sur les lymphocytes T activés et jouer un rôle dans l'infiltration du tissu lésé par des cellules inflammatoires (449) et (iv) les cytokines produites par les lymphocytes T activés pourraient avoir un effet sur les lymphocytes B en stimulant la production d'auto-anticorps à des taux anormaux. Cette hypothèse est confortée par le fait que les souris transgéniques pour OX40L ont des taux sériques élevés d'auto-anticorps anti-nucléaires associés à une augmentation de la réponse Th2. Ainsi, une expression d'OX40L ectopique ou augmentée peut être responsable de maladies inflammatoires ou auto-immunes.

OX40L apparaît également comme un candidat intéressant pour le traitement des tumeurs. Les lymphocytes T infiltrant les tumeurs expriment OX40 et le blocage de la voie par inactivation génétique ou inhibition pharmacologique a permis de stopper la croissance tumorale dans plusieurs modèles murins (398). Plusieurs modes d'action ont été suggérés : effet sur les lymphocytes T pathogènes CD8 et CD4, augmentation de l'activité des cellules NK ou inhibition des lymphocytes T régulateurs.

Enfin, cibler la voie OX40-OX40L semble avoir également des effets bénéfiques sur le plan infectieux en stimulant la réponse vaccinale ou en diminuant la réplication virale dans un modèle murin d'infection par le CMV (450,451).

Tableau 6 : Effet de la modulation de l'interaction OX40-OX40L *in vivo* dans des modèles murins de maladies auto-immunes

d'après Webb G et al. Clin Rev Allerg Immunol 2015 (414)

Maladie	Modèle animal	Intervention	Effet
Colite inflammatoire	Colite aigüe induite par le dextran-sodium- sulfate	Protéine de fusion OX40-Ig	Réduction des signes cliniques et de la migration des lymphocytes T dans la lamina propria (452)
	Colite par transfert de cellules activées	Anticorps neutralisant anti-OX40L	Réduction de la perte de poids, des signes histologiques et de l'infiltrat lymphocytaire T (440,453)
	Souris invalidées pour l'IL-2	Transfert de lymphocytes T régulateurs déficients en OX40	Impossibilité de contrôler la colite contrairement aux lymphocytes T régulateurs intacts (454)
	Colite par instillation intra-rectale de TNBS (trinitrobenzene sulfonic acid)	Protéine de fusion OX40-Ig	Amélioration de l'histologie, réduction de l'infiltrat lymphocytaire T et de la production de cytokines pathogènes comme IL-12, IFN gamma et TNF- α (455)
Polyarthrite rhumatoïde	Arthrite induite par le collagène	Anticorps monoclonal bloquant OX40L	Amélioration du score clinique, diminution des anticorps anti-collagène et de l'IFN gamma quand administré à J-1(436)
		Protéine de fusion OX40-Ig	Pas de signe de la maladie (402)
		Fragment Fab pégylé bloquant OX40	Diminution du score d'inflammation et des érosions ostéo-cartilagineuses (402)
Uvéite	Uvéite auto-immune expérimentale chez le rat	Anticorps agoniste d'OX40	Inflammation prolongée, augmentation des cellules Th1 et Th17, augmentation de l'IFN gamma dans les cultures cellulaires exposées (456)
	Injection intravitréenne d'ovalbumine chez des souris OT-I (<i>ovalbumin-specific CD8+ T cell receptor transgenic T cells</i>)	Anticorps bloquant anti-OX40L Agoniste d'OX40	Amélioration des signes cliniques (420) Aggravation des signes cliniques, de l'infiltrat lymphocytaire et de la production de cytokines Th17 (420)
Diabète de type I	Souris NOD	Souris invalidées pour OX40L	Prévention du diabète (457)
		Anticorps bloquant anti-OX40L administré à l'âge de 12 semaines	Réduction de l'incidence du diabète (433)

Maladie	Modèle animal	Intervention	Effet
Sclérose en plaques	Encéphalomyélite auto-immune chez le rat	Récepteur soluble pour OX40	Augmentation de la survie et amélioration du score clinique (401)
	Encéphalomyélite auto-immune chez la souris	Souris invalidées pour OX40L	Réduction des signes cliniques et de la synthèse d'IL-2 et IL-6 (432)
		Anticorps bloquant OX40L	Réduction des signes cliniques et de l'infiltrat lymphocytaire T médullaire (458)
IPEX	Souris invalidées pour FoxP3	Co-invalidation pour OX40 ou anticorps anti-OX40L (effets identiques)	Augmentation de la survie, diminution de l'infiltrat lymphocytaire T, diminution des titres d'auto-anticorps, diminution des signes cliniques (459)

IPEX : Dérèglement Immunitaire, Polyendocrinopathie, Entéropathie, liés à l'X

III. Pourquoi cibler la voie OX40-OX40L ?

Les immunosuppresseurs utilisés jusqu'à présent dans les pathologies auto-immunes, comme le cyclophosphamide, l'azathioprine ou le méthotrexate ciblent non seulement les lymphocytes T pathogènes responsables de la maladie, mais aussi les lymphocytes T non pathogènes. L'utilisation d'une thérapie ne ciblant pas uniquement les cellules responsables de la maladie expose à un risque non négligeable d'effets indésirables déjà observés en pratique courante, notamment infectieux. Bien que des thérapies plus ciblées telles que les anti-cytokiniques aient été développées avec des résultats prometteurs, le risque infectieux lié à une immunosuppression demeure. Cibler la voie de signalisation OX40-OX40L permettrait d'inhiber uniquement les lymphocytes T récemment activés et pathogènes, dans la mesure où OX40 n'est exprimé que sur les lymphocytes T activés spécifiques d'un antigène et non sur les lymphocytes T naïfs. Cet effet ciblé permettant d'éviter une immunosuppression globale a déjà été démontré dans des modèles animaux de pathologies auto-immunes, inflammatoires, allergiques et même infectieuses (398,399,460).

Outre son effet ciblé sur les lymphocytes T effecteurs pathogènes, bloquer la voie OX40-OX40L peut avoir un effet bénéfique sur la pathologie en améliorant la fonction des lymphocytes T régulateurs. Dans la mesure où à la fois les lymphocytes T effecteurs pathogéniques et les lymphocytes T régulateurs inductibles sont considérés comme étant spécifiques de l'antigène, cibler OX40L permettrait de moduler uniquement la réponse immune spécifique de l'antigène (ou de l'auto-antigène dans les maladies auto-immunes),

sans atteindre la fonction des autres lymphocytes T. Ceci permettrait de diminuer les effets secondaires habituellement observés avec les immunosuppresseurs non ciblés.

Du fait de son double effet sur les lymphocytes T effecteurs et les lymphocytes T régulateurs, on peut imaginer que le blocage d'Ox40L permettrait d'une part la suppression de l'inflammation en supprimant les lymphocytes T pathogènes et les cytokines dérivées de cette réponse lymphocytaire T, mais aussi de restaurer la tolérance immune en favorisant les lymphocytes T régulateurs Foxp3+ avec des effets secondaires liés à l'immunosuppression minimales (435).

IV. Premières expériences en thérapie humaine

Les premières expériences en thérapie humaine ont été obtenues dans l'asthme. Bien que les études pré-cliniques aient montré un effet bénéfique du traitement (418,461), les résultats d'un essai clinique de phase II sont décevants (462). Dans cet essai portant sur 28 patients avec un asthme modéré d'origine allergique, il n'y a pas eu de différence clinique à 4 mois entre le groupe traitement et le groupe placebo, ni de différence concernant le taux d'éosinophiles sanguins. En revanche, il y avait une réponse biologique à la 16^{ème} semaine avec une diminution du taux d'IgE de 17% et du taux d'éosinophiles dans les expectorations de 78%. Le test respiratoire Pc20 à la métacholine n'a pas mis de différence entre les 2 groupes. La tolérance était similaire dans les 2 groupes avec 8 patients (57,1%) qui ont présenté au-moins un événement indésirable dans le groupe anti-Ox40L et 13 (92,9%) dans le groupe placebo. Les effets secondaires les plus fréquents dans le groupe anticorps étaient des rhinopharyngites, gripes, douleurs oropharyngées, céphalées et crises d'asthme avec une fréquence similaire à celle observée dans le groupe placebo. Il n'y a pas eu d'évènement indésirable grave et aucun sujet n'a développé d'anticorps anti-produit.

V. OX40-OX40L dans la Sclérodémie systémique

Du fait de la mise en évidence d'une association génétique entre des variants de *TNFSF4* et le lupus érythémateux systémique et du concept d'auto-immunité partagée entre la ScS et le lupus, différents SNPs de *TNFSF4* ont été testés dans une étude cas-témoins nord américaine (463). Au total, 1059 patients ScS et 698 contrôles caucasiens ont été testés pour 9 SNPs préalablement identifiés dans le lupus érythémateux systémique. La ScS a été associée aux

SNPs rs1234314 (odds ratio (OR) : 1,20 ; intervalle de confiance à 95% (IC95%) : 1,04-1,4, p=0,019), rs2205960 (OR 1,24, IC95% : 1,10-1,50, p=0,019) et rs844648 (OR 1,16, IC95% : 1,01-1,30, p=0,032).

Ces résultats ont été répliqués dans deux autres études (464,465). La première portant sur 3014 ScS et 3125 sujets contrôles sains issus de 8 cohortes européennes a révélé une association avec les SNPs rs1234314 et rs12039904 (avec des OR respectifs égaux à 1,15, IC95% :1,02-1,31 et OR :1,18, IC95% : 1,08- 1,29) (464). L'association la plus forte concernait les formes cutanées limitées et avec anticorps anti-centromères. A la suite de ces études, notre équipe a testé une cohorte de réplication française de 1031 patients ScS et 1014 contrôles sains et a montré une association entre la ScS et les 5 SNPs testés (rs2205960, rs1234317, rs12039904, rs10912580 et rs844648) (465).

Les données disponibles ont ensuite été regroupées dans une méta-analyse avec une population totale de 4989 patients ScS et 4661 contrôles sains, tous d'origine européenne. Les 3 « top –SNPs » ont été testés (rs2205960, rs844648 et rs12039904). Cette méta-analyse a confirmé l'association avec la significativité la plus forte obtenue pour le SNP rs2205960 (OR: 1,19, IC95% : 1,06–1,32, p = 0,0021) (465).

Ces résultats ont été confirmés dans une méta-analyse de 4 tours du génôme avec association avec la forme cutanée limitée, mais aussi pour la première fois avec la forme avec anticorps anti-topoisomérases de type 1, très spécifiques des formes cutanées diffuses (p= 9,05x10⁻³ ; OR : 1,23, IC95% : 1,05-1,45) (101).

Toutefois, ces variants sont localisés dans des régions introniques, non codantes et on ne connaît pas le variant causal. L'existence ou non de conséquences fonctionnelles liées à ces variations génétiques et leur type demeurent inconnues.

Il a été émis l'hypothèse que le variant rs2205960 localisé dans la région 5' affectait l'expression de *TNFSF4* (466) . Dans l'étude portant sur le lupus, les cellules homozygotes pour l'haplotype à risque avaient une expression augmentée de l'ARN messager et de la protéine OX40L. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés dans la ScS.

Les odds-ratio observés semblent faibles, mais sont compatibles avec les précédentes études génétiques. Ils mettent en exergue le fait que la ScS est une maladie multigénique, faisant intervenir une combinaison de plusieurs facteurs génétiques de susceptibilité, ayant pour chacun d'entre-eux un poids faible.

Le rôle d'OX40-OX40L dans la ScS est également suggéré par l'augmentation des taux sériques d'OX40 chez des patients ScS (n=53) par rapport à des sujets lupiques (n= 15) ou à

des sujets contrôles sains (n=32) (467). De manière intéressante, les taux sériques d'OX40 étaient plus élevés dans les formes précoces, évoluant depuis moins de 2 ans.

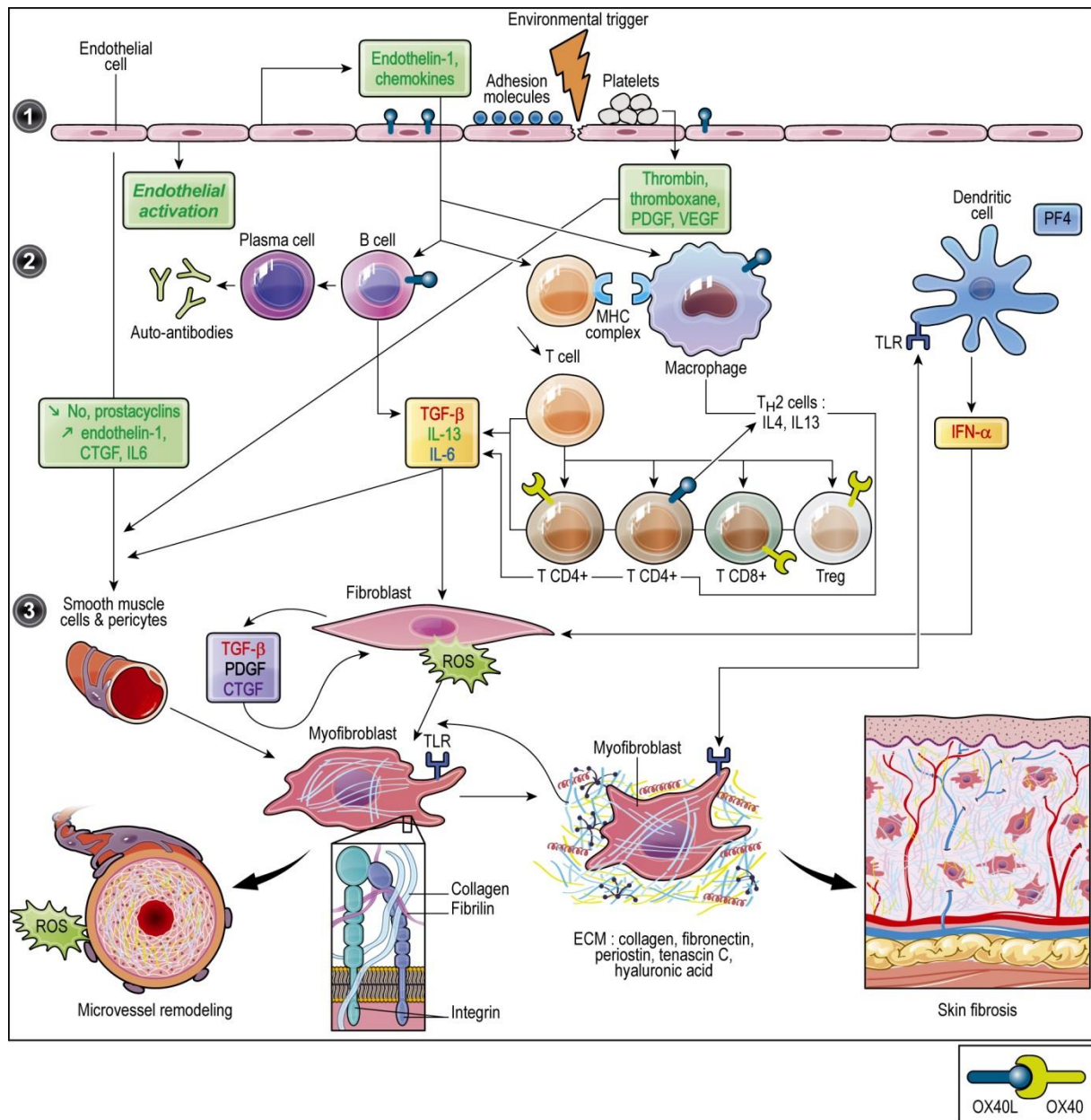
Cibler la voie OX40-OX40L dans la ScS semble pertinent et permettrait d'agir sur les différentes cellules effectrices dans la maladie : les lymphocytes T CD4+ et CD8+ activés, les lymphocytes T de type Th2 dont on a précédemment vu l'effet pro-fibrotique, les lymphocytes T régulateurs dont le nombre et la fonction sont altérés au cours de la ScS, les lymphocytes B producteurs d'auto-anticorps pathogènes, les cellules endothéliales activées et les macrophages M2 inflammatoires. Cibler cette voie permettrait donc d'agir sur la vasculopathie, l'immunité innée et adaptative qui concourent toutes au processus de fibrose. Les expressions connues d'OX40-OX40L sur les acteurs impliqués dans la physiopathologie de la ScS sont résumées dans la Figure 25.

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, du fait de l'expression inductible, retardée et brève d'OX40-OX40L sur les cellules effectrices pathogènes présentes sur le site de l'inflammation, l'effet serait ciblé sur les cellules pathogènes, évitant ainsi les effets délétères infectieux observés avec les immunosuppresseurs/immunomodulateurs utilisés en pratique courante en rhumatologie. Ce point est crucial au cours de la ScS car les patients sont à haut risque infectieux du fait notamment de la fibrose pulmonaire et nous avons vu que les infections étaient une des causes principales de mortalité au cours de la ScS.

Figure 25: Expression connue d'OX40-OX40L sur les acteurs de la physiopathologie de

la

ScS



OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier l'efficacité d'une thérapie ciblée anti-OX40L dans la ScS, par l'utilisation de modèles murins complémentaires de la maladie, afin de (i) mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et notamment la relation inflammation-fibrose et (ii) d'ouvrir des pistes thérapeutiques pour cette maladie sévère.

Le premier modèle utilisé a été le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine, car il s'agit d'un modèle validé, bien défini, utilisé en routine par notre équipe et pertinent lorsqu'on étudie une cible inflammatoire (136,142,149,187,251,252).

La première étape préalable au ciblage d'OX40L a été d'optimiser l'induction du modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine. La première question que nous nous sommes posée a donc été : quels fond génétique et sexe utiliser dans ce modèle, car il peut être réalisé sur des souris de différents fonds génétiques. Différentes souris mâles et femelles des fonds génétiques les plus couramment utilisés avec ce modèle ont donc été évaluées sur le plan histologique. Nous avons montré que les souris mâles développaient la fibrose la plus marquée, en particulier les souris de fond génétique C57/BL6 et BALB/c. Les souris mâles C57/BL6 présentaient l'infiltrat inflammatoire le plus important, soulignant l'intérêt de ce fond génétique pour étudier une cible inflammatoire. Nous disposions de souris invalidées pour OX40L sur un fond génétique C57/BL6. Nous avons donc décidé d'utiliser des souris mâles C57/BL6. Dans ce modèle, différents protocoles d'injection ont été testés afin de déterminer la posologie et la fréquence d'injection optimales de bléomycine, puisque ces dernières varient selon les équipes (149,187,251).

La deuxième question soulevée a été : quels nouveaux moyens d'évaluation utiliser ? Nous avons voulu déterminer si une méthode d'évaluation non-invasive de la fibrose : l'échographie dermique haute fréquence pouvait apporter une aide à l'évaluation cutanée dans le modèle murin de fibrose dermique induite par la bléomycine et également dans le modèle génétique *tsk-1*. Il s'agit d'un modèle complémentaire qui permet d'étudier les stades tardifs non inflammatoires de la maladie et auquel nous avons accès.

Notre dernier travail de recherche a eu pour objectif d'évaluer l'effet de l'invalidation et/ou de l'inhibition d'OX40L dans différents modèles murins complémentaires de ScS avec à la fois une stratégie préventive et curative. Etant donné le rôle clé en clinique de l'atteinte d'organe, notre approche a été enrichie par l'utilisation de souris transgéniques *Fra2* qui sont un

nouveau modèle de ScS, caractérisées par une fibrose pulmonaire inflammatoire et une HTAP. L'intérêt du biomarqueur sérique OX40L soluble a également été évalué.

CHAPITRE 5 : TRAVAUX ORIGINAUX

I. Article 1 : Effet combiné du fond génétique et du sexe dans le modèle murin de fibrose dermique induite par la bléomycine.

COMBINED EFFECT OF GENETIC BACKGROUND AND GENDER IN A MOUSE MODEL OF BLEOMYCIN-INDUCED SKIN FIBROSIS

Nadira Ruzehaji , Jerome Avouac, **Muriel Elhai**, Maxime Frechet, Camelia Frantz, Barbara Ruiz, Joerg H. Distler and Yannick Allanore

Arthritis Res Ther. 2015 May 30;17(1):145.

Le premier modèle, utilisé en routine par notre équipe et particulièrement intéressant dans le cadre de l'évaluation d'une cible inflammatoire a été le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine. La première question que nous nous sommes posée a été sur quels fond génétique et sexe induire notre modèle et quel protocole utiliser. En effet, bien que ce modèle ait été décrit originellement par Yamamoto, différents protocoles ont été utilisés par les équipes pour induire la fibrose dermique et ce sur des fonds génétiques et sexes différents (136,142,193,193,468). Toutefois, aucune étude n'avait jusqu'à présent comparé ces différents protocoles. Nous avons donc voulu comparer l'intensité de la fibrose dermique obtenue après injections de bléomycine chez des souris mâles et femelles, appartenant aux 3 fonds génétiques les plus couramment utilisés. L'objectif de cette étude était d'optimiser le protocole d'induction de la fibrose dermique, suite aux injections de bléomycine. Dans une première partie, la fibrose a été induite chez des souris mâles et femelles âgées de 6 semaines de fond génétique BALB/c, C57/BL6 et DBA/2 (6 souris par groupe) par des injections locales de bléomycine (100 μ L d'une solution de bléomycine à la concentration de 0,5mg/mL) tous les 2 jours pendant 3 semaines. Des injections de NaCl étaient utilisées comme contrôles.

Après 3 semaines, ont été évalués l'épaisseur dermique, le contenu en collagène de la peau lésionnelle et le nombre de myofibroblastes lésionnels. La fibrose était plus marquée chez les souris mâles que les souris femelles quel que soit le fond génétique étudié. Les souris mâles BALB/c et C57/BL6 étaient celles qui répondaient le mieux aux injections de bléomycine, en comparaison aux souris contrôles traitées par NaCl. Toutefois, le recrutement de

myofibroblastes était plus important chez les souris mâles BALB/c. Les souris mâles C57/BL6 avaient l'infiltrat inflammatoire le plus important, soulignant ainsi l'intérêt de ce fond génétique pour une cible inflammatoire.

Par ailleurs, dans deux études, des souris transgéniques pour OX40L (caractérisées par une hyperexpression d'OX40L) ont développé respectivement une pneumopathie interstitielle associée à un colite inflammatoire et à une auto-immunité avec présence d'auto-anticorps anti-ADN sériques (429) et une HTAP (469). Ces atteintes inflammatoires n'étaient observées que sur le fond génétique C57/BL6 et non sur le fond BALB/c.

Ainsi, comme notre cible est impliquée dans l'inflammation, que nous disposions de souris invalidées pour OX40L sur un fond C57/BL6, qu'il a été mis en évidence un effet d'OX40L dépendant du fond génétique C57/BL6 dans des modèles de pneumopathie interstitielle et d'HTAP, atteintes sévères de la ScS, ce sont des souris mâles C57/BL6 âgées de 6 semaines qui ont été utilisées dans ce travail.

Afin d'améliorer le protocole, nous avons également cherché à déterminer quels étaient les paramètres optimaux en terme de fréquence d'injection et de dosage de bléomycine. Deux groupes de 6 souris mâles C57/BL6 âgées de 6 semaines, ont été soumis aux injections de bléomycine 0,5mg/ml respectivement tous les jours ou tous les 2 jours pendant 3 semaines, puis évalués sur le plan histologique. Les résultats ont montré l'absence de différence en terme d'épaisseur dermique, une augmentation significative de la concentration en hydroxyproline et une tendance à une augmentation du nombre de myofibroblastes chez les souris injectées un jour sur deux en comparaison à celles recevant des injections quotidiennes. Concernant le dosage, deux groupes de 6 souris mâles C57/BL6 ont reçu respectivement des injections intra-dermiques de 100µL de bléomycine tous les deux jours pendant 3 semaines à la concentration de 0,5 mg/ml ou de 1 mg/ml. Il n'a pas été mis en évidence de différence entre les deux groupes pour tous les paramètres d'évaluation de la fibrose dermique.

Donc dans notre travail, ont été réalisées des injections intra-dermiques de bléomycine à la concentration de 0,5mg/mL tous les 2 jours pendant 3 semaines chez des souris mâles C57/BL6 âgées de 6 semaines.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Combined effect of genetic background and gender in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis

Nadira Ruzehaji^{1,4*}, Jerome Avouac^{1,2}, Muriel Elhai^{1,2}, Maxime Frechet¹, Camelia Frantz¹, Barbara Ruiz¹, Joerg H. Distler³ and Yannick Allanore^{1,2}

Abstract

Introduction: Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disorder characterised by the development of skin fibrosis. Our current understanding of the disease pathogenesis is incomplete and the study of SSc is hindered, at least partially, by a lack of animal models that fully replicate the complex state of human disease. Murine model of bleomycin-induced dermal fibrosis encapsulates important events that take place early in the disease course.

Methods: To characterise the optimum *in vivo* parameters required for the successful induction of dermal fibrosis we subjected three commonly used mouse strains to repeated subcutaneous bleomycin injections. We aimed to identify the effects of genetic background and gender on the severity of skin fibrosis. We used male and female Balb/C, C57BL/6, and DBA/2 strains and assessed their susceptibility to bleomycin-induced fibrosis by measuring dermal thickness, hydroxyproline/collagen content and number of resident myofibroblasts, all of which are important indicators of the severity of skin fibrosis. All data are expressed as mean values \pm SEM. The Mann–Whitney *U* test was used for statistical analysis with GraphPad Prism 6.04 software.

Results: Dermal fibrosis was most severe in Balb/C mice compared to C57BL/6 and DBA/2 suggesting that Balb/C mice are more susceptible to bleomycin-induced fibrosis. Analysis of the effect of gender on the severity of fibrosis showed that male Balb/C, C57BL/6, DBA/2 mice had a tendency to develop more pronounced fibrosis phenotype than female mice. Of potential importance, male Balb/C mice developed the most severe fibrosis phenotype compared to male C57BL/6 and male DBA/2 as indicated by significantly increased number of dermal myofibroblasts.

Conclusion: Our study highlights the importance of genetic background and gender in the induction of murine dermal fibrosis. Robust and reproducible animal models of fibrosis are important research tools used in pharmacological studies which may lead to better understanding of the pathogenesis of fibrotic diseases and assist in identification of new drugs.

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disorder characterised by progressive connective tissue fibrosis and life-threatening complications with high mortality and morbidity [1]. It has long been known that the level of available transforming growth factor- β (TGF- β), connective tissue growth factor and other profibrotic molecules in the dermis are critical for the development and sustaining of

fibrosis in SSc [2]. Furthermore, dermal fibrosis in SSc is thought to be the result of activation and differentiation of fibroblasts into apoptosis-resistant and α -smooth muscle actin (α -SMA)-positive myofibroblasts. Increased expression of myofibroblasts further stimulates the formation of extracellular matrix (ECM) leading to aberrant skin architecture and pathological tissue remodelling [3]. There are no mechanistic-based therapies, such as pharmaceutical drugs, on the market that prevent and control the progression of excessive ECM formation in SSc. Thus, there is an urgent need to better understand fibrosis, devise processes for manipulating ECM formation and reduce excessive collagen deposition. The ability to develop novel anti-fibrotic

* Correspondence: nadira.ruzehaji@inserm.fr

¹INSERM U1016/UMR 8104, Cochin Institute, Paris, France

⁴Institut Cochin, INSERM U1016, Bâtiment Gustave Roussy, 27 rue du Faubourg Saint Jacques 75014, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Ruzehaji et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

therapies and analyse their efficacy in proof-of-concept (POC) studies is partly impeded by limitations in currently available animal models used to study this disorder in vivo. The pathophysiology of SSc is complex and believed to be caused by multiple factors including vasculopathy, inflammation, and autoimmunity [4, 5]. Not surprisingly, there is currently no animal model that perfectly mimics all the steps associated with the development of dermal fibrosis. Although there are several inducible and genetic models [4, 5], not a single one of these models recapitulates all of the clinical features consistent with human SSc [3]. The murine model of bleomycin-induced dermal fibrosis is widely used to study the changes that take place in the early phase of the disease [6]. Bleomycin is a glycopeptide-derived anti-tumor antibiotic, which was first isolated from a culture broth of *Streptomyces verticillus* [7]. Bleomycin induces the release of reactive oxygen species, recruitment of inflammatory cells, which activate resident fibroblasts and stimulate ECM formation. Due to its profibrotic properties, subcutaneous bleomycin is used to induce local skin fibrosis, which is known to persist for up to six weeks [8]. Apart from its local effect, high-dose subcutaneous bleomycin injections are thought to induce lung fibrosis [7] and systemic autoimmune responses characterised by the presence of antinuclear autoantibodies, such as anti-Scl-70, anti-U1 RNP [9].

The model of bleomycin-induced skin fibrosis, originally described by Yamamoto [10], has been used widely in preclinical [11] and pharmacological studies [12]. There are several modifications of this protocol, raising the issue of study-to-study variance of the resulting dermal fibrosis. Given that the bleomycin-induced model of SSc is an important tool in understanding the pathogenesis of fibrotic skin changes, we investigated the susceptibility and intensity of dermal fibrosis observed in mouse skin of three widely utilised mouse strains of both genders. We therefore hypothesised that different strains of mice will have various degrees of sensitivity in response to bleomycin-induced dermal fibrosis. The aim of this study was to suggest an optimised protocol and describe the methods necessary for the induction of a standardised model of fibrosis in adult mouse skin. The observations of this study are to be used as a guide to finding a suitable animal model, which is morphologically and histologically consistent with the early stages of SSc-associated skin fibrosis.

Methods

Murine model of bleomycin-induced dermal fibrosis

Three mouse strains, namely Balb/C, C57BL/6, DBA/2 (Janvier, Genest-St-Isle, France), were used in the studies. The Balb/C strain, originally created from a stock of outbred albino mice, was systematically inbred and has

the following related genotype: Tyr^c/ Tyr^c, Tyrp1^b/ Tyrp1^b, A /A - MHC: Haplotype H2^d. The inbred strain of C57BL/6 mice (related genotype: a (a/a) non agouti - MHC: Haplotype H2^b) is a widely used strain, which is frequently used as the genetic background in transgenic models. The DBA is the oldest of all inbred strains of mice, with the DBA/2 substrain having the following genotype: a/a, Tyrp1^b/Tyrp1^b, Myo5a^d/Myo5a^d - MHC: Haplotype H2^d.

To determine whether gender and mouse strain have an influence on the severity of dermal fibrosis we subjected one group of male Balb/C (n = 6), C57BL/6 (n = 6), and DBA/2 (n = 6) mice of 6 weeks of age, weighing 20–25 g, to bleomycin injections at a concentration of 0.5 mg/ml. The upper dorsa of mice were shaved and one square measuring 1 cm² was drawn on the midline using a marker. We administered 100 µl of bleomycin (Laboratoire Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine, France) at 0.5 mg/ml dissolved in PBS every other day for 21 days. As part of the protocol, bleomycin injection sites were rotated. The first four injections were administered into four different corners of the square followed by the fifth injection given in the middle of the square. This protocol was continued until the day of post-mortem examination, at which point the marked square created on the dorsal surface of mice was harvested, with one half of the biopsy specimen fixed in 4 % wt/vol. paraformaldehyde for histology and the other half snap frozen for molecular biology.

Another group of female Balb/C (n = 6), C57BL/6 (n = 6) and DBA/2 (n = 6) was subjected to bleomycin injections (100 µl of bleomycin at 0.5 mg/ml, every other day for 21 days). Age-matched control animals were treated with an equivalent dose of vehicle. Each experimental group consisted of 6 mice.

In a separated experiment, we aimed to assess whether the frequency of bleomycin injections had the capacity to alter the severity of dermal fibrosis. We subjected one group of male C57BL/6 mice (n = 6) of 6 weeks of age, weighing 20–25 g to bleomycin injections (0.5 mg/ml) given every day and another group (n = 6) to bleomycin injections (0.5 mg/ml) given every other day for 21 days. In a different experiment, we endeavoured to determine the effect of bleomycin dosage (C57BL/6 mice, bleomycin at 0.5 mg/ml vs 1 mg/ml administered every other day for 21 days) on the severity of dermal fibrosis. Mice were killed at 21 days after the first bleomycin experiment: 5 mm of lesional skin was harvested and fixed in 4 % wt/vol. buffered formalin and processed for histological analysis. Four lesional skin biopsies (3 mm each) were snap frozen in liquid nitrogen and used for colorimetric assessment of collagen content (hydroxyproline assay). All animal experiments were approved by the local Animal Ethics Committee (Comité National de Réflexion

Ethique sur l'Expérimentation Animale-34) and principles of laboratory animal care were followed.

Histology, immunohistochemistry and image analysis

Histological sections (4 μ m) were cut from paraffin-embedded formalin-fixed lesional skin tissue. Sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) and images were captured at $\times 100$ microscopic magnification. Histological dermal thickness was determined by manually drawing a straight line between the epidermis and adipose layer. Image analysis was performed using Image J software (a freely available Java image processing programme). Two independent assessors performed blinded measurements of histological slides.

We subjected 4 μ m paraffin-embedded formalin-fixed samples of lesional skin to immunohistochemical analysis according to the manufacturer's protocol (Dako, Carpinteria, CA, USA). Skin sections were deparaffinised, followed by antigen retrieval blocked in Super Block IDetect Super Stain System horseradish peroxidase (HRP) (ID Labs, London ON N4A 5 K2, Canada) for 10 minutes followed by incubation with 3 % H₂O₂ for 10 minutes to block endogenous peroxidase activity. Primary antibodies against α -SMA (1:500, Abcam, Cambridge, UK), CD3 (1:50, Abcam), CD22 (1:100, Abcam) and CD68 (1:100, Abcam) was applied overnight. Species-specific, biotinylated secondary antibodies (1:200) were used and detection was by Dako Liquid DAB Chromagen System (Dako). Myofibroblasts were identified by staining for α -SMA, as previously described [12]. The number of α -SMA-, CD3-, CD22- and CD68-positive cells was determined at high magnification in four different sections obtained from each mouse and determined by two blinded examiners. The number of α -SMA-, CD3-, CD22- and CD68-positive cells was counted and expressed as a number of total cells within each microscopic field normalised against NaCl control as previously described [12]. Negative controls included replacing primary antibodies with normal species-specific IgG.

Assessment of inflammatory infiltrate

Assessment of the number of infiltrating mononuclear/inflammatory cells in bleomycin and NaCl-treated mouse skin was determined using H&E stained sections and immunohistochemical images of CD3-, CD22- and CD68-stained skin as described previously [12]. Eight different high-power fields from each mouse skin section were evaluated for inflammatory infiltrate by two independent examiners blinded to the treatment.

Multiphoton microscopy

A multiphoton inverted stand Leica SP5 microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) was used for tissue imaging as previously described [13]. A

Ti:Sapphire Chameleon Ultra (Coherent, Saclay, France) with a centre wavelength at 810 nm was used as the laser source for generating second harmonic generation (SHG) and two-photon excited fluorescence signals (TPEF). The laser beam was circularly polarized and we used a Leica Microsystems HCX IRAPO 25 \times /0.95 W objective. SHG and TPEF signals were detected in episcollection through a 405/15-nm and a 525/50 bandpass filter, respectively, by NDD PMT detectors (Leica Microsystems) with a constant voltage supply, at constant laser excitation power, allowing direct comparison of SHG intensity values. LAS software (Leica, Germany) was used for laser scanning control and image acquisition.

Masson's trichrome staining

For direct visualisation of collagen fibres and histological assessment of collagen deposition, trichrome staining was performed using the Masson Trichrome Staining Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Skin sections stained with Masson Trichrome were visualised at $\times 200$ microscopic magnification. All images were captured with Olympus BX63F microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a digital signal processor CoolSNAP scientific CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA).

Collagen measurements

The collagen content in lesional skin samples was explored by hydroxyproline assay. After digestion of punch biopsies (3 mm) in 6 M HCl for 3 hours at 120 °C, the pH of the samples was adjusted to 7 with 6 M NaOH. Samples were then mixed with 0.06 M chloramine T and incubated for 20 min at room temperature. Next, 3.15 M perchloric acid and 20 % p-dimethylaminobenzaldehyde were added and samples were incubated for additional 20 minutes at 60 °C. The absorbance was determined at 557 nm with a Spectra MAX 190 micro plate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Statistics

All data are expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM). The Mann-Whitney *U* test for non-related samples was used for statistical analysis with GraphPad Prism 6.04 software (San Diego, CA, USA). A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Pro-fibrotic effects of subcutaneous bleomycin injections in the dermis of male Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice

To determine whether bleomycin had the same capacity to induce dermal fibrosis in three inbred mouse strains (Balb/C, C57BL/6 and DBA/2) that are frequently used for studies in dermal fibrosis research, we administered bleomycin at a concentration of 0.5 mg/ml, which was

injected every other day for the period of 3 weeks. Assessment of dermal thickness, hydroxyproline content and myofibroblast count showed that bleomycin successfully induced dermal fibrosis in all of the three strains assessed (Fig. 1a-f). Bleomycin treatment in Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice was associated with an increase in dermal thickness by 19.89 %, 21.31 % and 18.7 % respectively when compared to NaCl-treated counterparts (Fig. 1b). No significant difference in dermal thickness was found

between bleomycin-treated male Balb/C, C57BL/6 and male DBA/2 mice (Fig. 1b). To confirm that the observed increase in dermal thickness in bleomycin-treated skin was due to increased collagen content, type I fibrillary collagen was imaged by SHG (Fig. 1c) and a hydroxyproline assay (Fig. 1d) was performed. Note similar baseline distribution of collagen fibre alignment in NaCl-treated Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice (Fig. 1c, d). Consistent with increased dermal thickness in bleomycin treated groups,

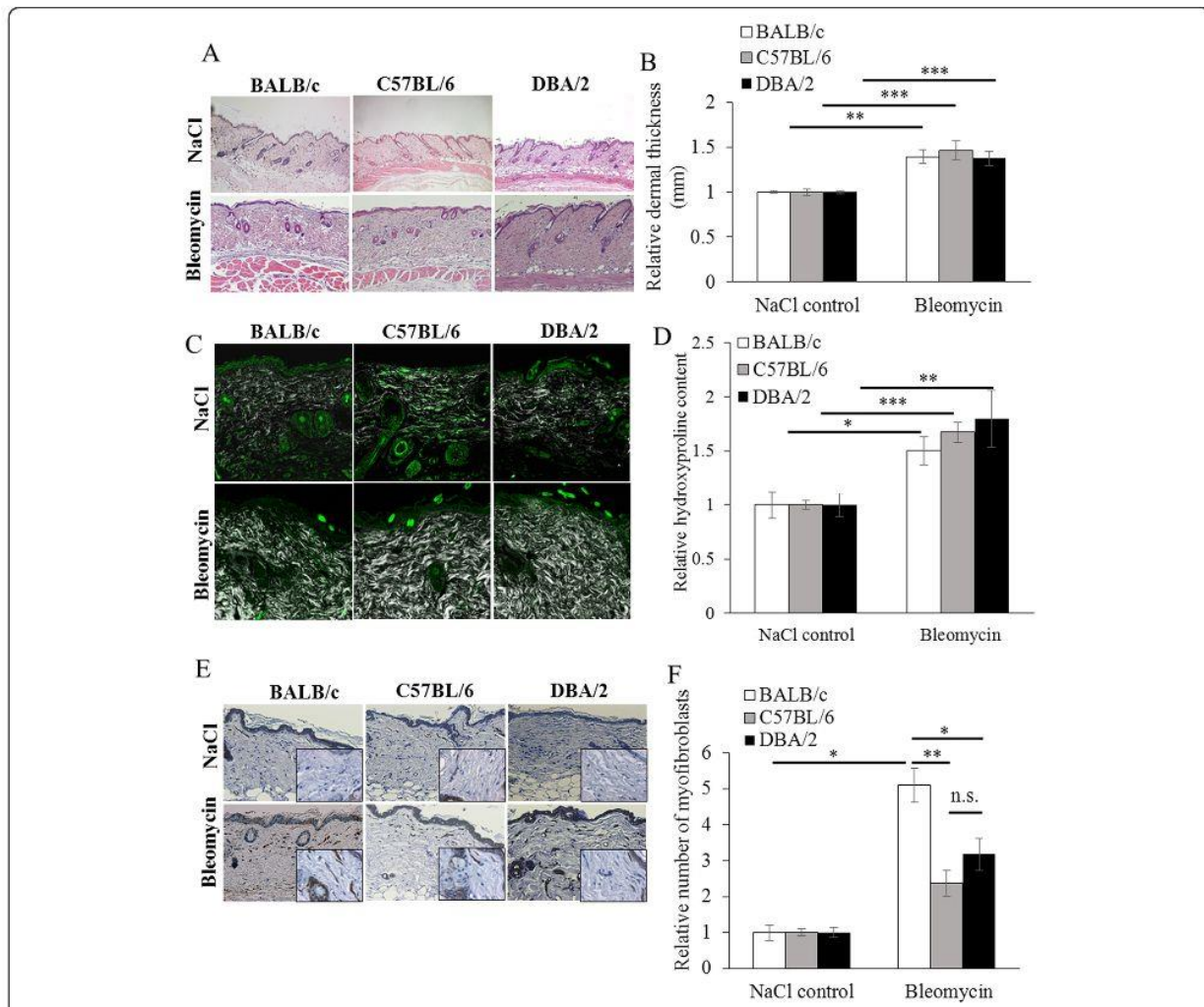


Fig. 1 Histological and histochemical analysis of dermal fibrosis in male bleomycin-treated Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice. **a** Representative images of H&E-stained sections of male mouse skin treated with subcutaneous NaCl or bleomycin given every other day over a period of 3 weeks. Original magnification $\times 100$. **b** Dermal thickness of skin harvested from mice treated with NaCl or bleomycin after 3 weeks. Four high-power field images were taken (two measurements per image). Results represent the relative fold-change compared to NaCl-treated control mice. All values represent means \pm standard error of the mean (SEM); $n = 6$ in each group. **c** Representative images of second harmonic generation imaging of type I fibrillary collagen in mouse skin harvested after 3 weeks of treatment with NaCl or bleomycin injected every other day. Note different distribution of fibre alignment and intensity in NaCl- and bleomycin-treated samples. Note that all images were acquired with the same excitation power. Original magnification $\times 250$. **d** Hydroxyproline assay: results are represented as means \pm SEM of triplicate measurements obtained from six mice (two biopsies per mouse) and shown as relative fold-change compared to NaCl-treated control samples. **e** Representative images of alpha smooth muscle actin (α -SMA) immunohistochemical analysis. Original magnification $\times 200$, inset $\times 630$. **f** Relative number of α -SMA-positive cells in the dermis of NaCl- or bleomycin-treated mice. Results represent the relative fold-change compared to NaCl-treated control mice. All values represent means \pm SEM; $n = 6$ each group. *n.s.* not significant

increased accumulation of collagen was observed in Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 skin when compared to NaCl-treated controls (Fig. 1c; $p = 0.0290$ in Balb/C; $p = 0.0001$ in C57BL/6; $p = 0.0103$ in DBA/2).

Increased levels of collagen content in bleomycin-treated skin may result from increased recruitment of myofibroblasts. In order to determine whether myofibroblasts contributed to increased levels of collagen in the dermis of male Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mouse skin, we analysed the number of myofibroblasts (Fig 1e-f). Under fibrotic conditions myofibroblast count increased five-fold in male Balb/C compared to NaCl control mice, two-fold in male C57BL/6 mice and three-fold in male DBA/2 mice. Male Balb/C mice treated with bleomycin had significantly increased dermal myofibroblast counts compared to bleomycin-treated male C57BL/6 mice ($p = 0.0041$) and DBA/2 mice ($p = 0.05$) (Fig 1f).

Female Balb/C mice are more susceptible to bleomycin-induced dermal fibrosis than female C57BL/6 and DBA/2 counterparts

Dermal fibrosis was induced in female Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice by subcutaneous bleomycin injections given for 3 weeks at a final concentration of 0.5 mg/kg and given every other day. Histological changes were determined by measuring dermal thickness in bleomycin-treated and NaCl control female Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice. Dermal thickness was determined by measuring the average thickness between the epidermal-dermal and dermal-subcutaneous fat junctions.

Bleomycin treatment resulted in increased dermal thickness in female Balb/C mice compared to NaCl-treated female Balb/C mice (Fig. 2b; $p = 0.0001$). No significant difference was observed in dermal thickness in bleomycin-treated female C57BL/6 mice compared to NaCl-treated female controls (Fig. 2b), however, there was a 43.7 % increase ($p = 0.0036$) in collagen content and a 33.8 % increase ($p = 0.0136$) in myofibroblast count in female C57BL/6 mice compared to NaCl-treated female controls (Fig. 2c-d). There was no significant change in dermal thickness, hydroxyproline content or myofibroblast count in female DBA/2 mice treated with bleomycin compared to female DBA/2 mice treated with NaCl (Fig. 2a-f).

Effect of gender on the induction of experimental dermal fibrosis

To study the effect of gender on the induction of dermal fibrosis we compared fibrotic phenotype as determined by three parameters: dermal thickness, hydroxyproline content and myofibroblast count. Although male Balb/C and male C57BL/6 mice have scored higher in histological and immunohistochemical analysis of bleomycin-treated skin, there was no significant difference in dermal thickness, hydroxyproline and myofibroblast count between

male and female Balb/C and C57BL/6 mice (Fig. 3a-c). The number of myofibroblasts in male DBA/2 mice was significantly higher than in female DBA/2 mice (Fig. 3c; $p = 0.0355$).

Male DBA/2 mice have the lowest number of infiltrating leukocytes

In addition to fibrotic skin changes, repetitive bleomycin injections are known to cause skin inflammation as defined by increased number of leukocytes recruited to the lesional area [7]. To determine whether the type of mouse strain had an effect on the number of inflammatory cells and the rate of inflammation in bleomycin-treated skin (0.5 mg/ml, alternate days, 3 weeks), skin from male and female Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice was stained with H&E and the number of leukocytes was counted (Fig. 3d, e). The number of leukocytes in skin from bleomycin-treated male Balb/C and C57BL/6 mice was 2.1 and 2.5-fold higher respectively than in bleomycin-treated male DBA/2 mice (Fig. 3d, e; $p = 0.0142$ and $p = 0.0018$, respectively). The type of mouse strain did not have an effect on the rate of inflammation in female mice as there was no significant difference in the number of leukocytes between female Balb/C, female C57BL/6 or female DBA/2 mice (Fig. 3e, g).

To identify the nature of infiltrating leukocytes and determine the influence of mouse strain on leukocyte infiltration, we next quantified the number of CD3-, CD22- and CD68-positive cells skin from male and female Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice. The number of CD3-, CD22- and CD68-positive cells were significantly reduced in male DBA/2 bleomycin-treated skin compared to bleomycin-treated skin in male Balb/C and C57BL/6 mice (Fig. 4a-f). There appeared to be no difference between the number of CD3-, CD22- and CD68-positive cells in skin from bleomycin-challenged female Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice (Fig. 4g-l).

Effect of frequency of bleomycin administration on the severity of mouse skin fibrosis

To establish whether the frequency of bleomycin injections had an effect on the severity of skin fibrosis, male C57BL/6 mice were given daily subcutaneous injections of bleomycin (at 0.5 mg/ml, 3 weeks) and compared to male C57BL/6 mice which were given bleomycin injections on alternate days (at 0.5 mg/ml, 3 weeks). In response to bleomycin, which was given either daily or on alternate days, dermal thickness increased in bleomycin-treated mice compared to NaCl-treated controls (Fig. 5a, b). Although there was no difference in dermal thickness between mice treated with bleomycin daily or on alternate days (Fig. 5b), collagen accumulation as determined by hydroxyproline content (Fig. 5d, $p = 0.0173$) was significantly elevated in mice treated with bleomycin on alternate days compared

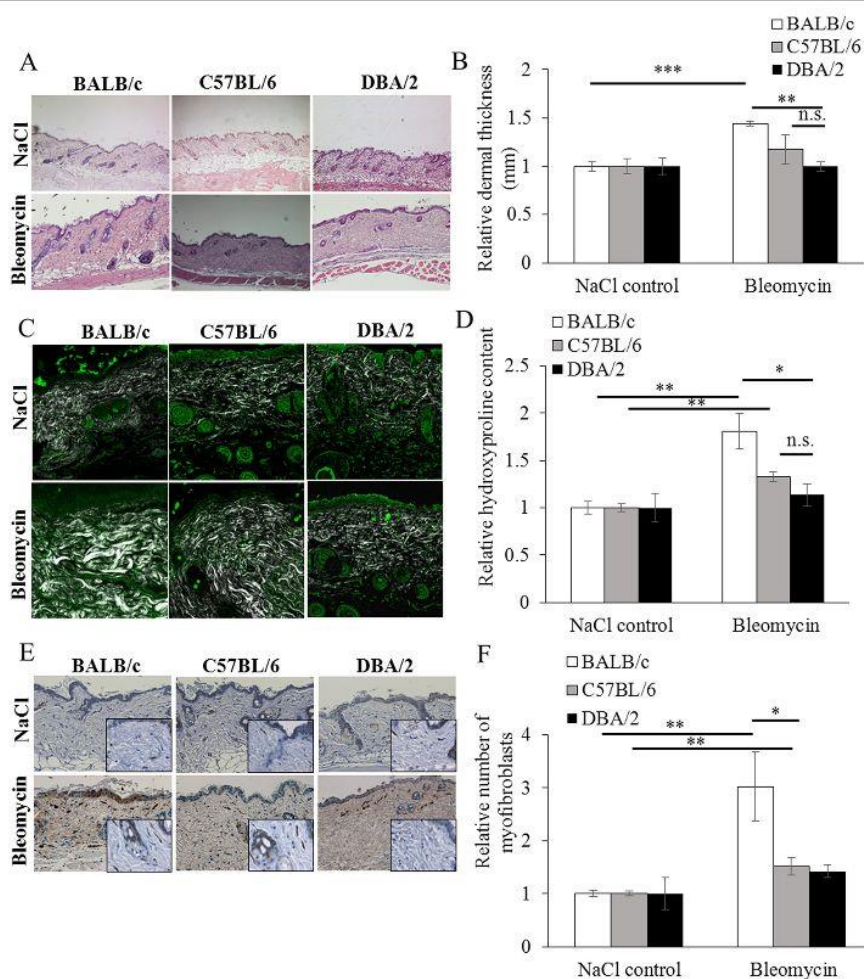


Fig. 2 Female Balb/C mice are more susceptible to bleomycin-induced dermal fibrosis than female C57BL/6 and DBA/2 mice. **a** Representative images of H&E-stained sections of female mouse skin treated with subcutaneous NaCl or bleomycin injections given every other day over a period of 3 weeks. Original magnification $\times 100$. **b** Dermal thickness of skin harvested from female mice treated with NaCl or bleomycin after 3 weeks. Four high-power field images were taken (two measurements per image). Results represent the relative fold-change compared to NaCl-treated control mice. **c** Representative images of second harmonic generation imaging of type I fibrillary collagen in mouse skin harvested after 3 weeks of treatment with NaCl or bleomycin injected every other day. Original magnification $\times 250$. **d** Hydroxyproline assay: results are represented as means \pm standard error of the mean (SEM) of triplicate measurements obtained from six mice (two biopsies per mouse) and shown as relative fold-change compared to NaCl-treated control samples. **e** Representative images of α -SMA immunohistochemistry. Original magnification $\times 200$, inset $\times 630$. **f** Relative number of alpha smooth muscle actin (α -SMA)-positive cells in the dermis of NaCl- or bleomycin-treated mice. Results represent the relative fold-change compared to NaCl-treated control mice. All values represent means \pm SEM; $n = 6$ in each group. *n.s.* not significant

to those treated every day. While myfibroblast count was slightly higher in mice treated with bleomycin on alternate days compared to those treated every day, this was not statistically significant (Fig. 5f).

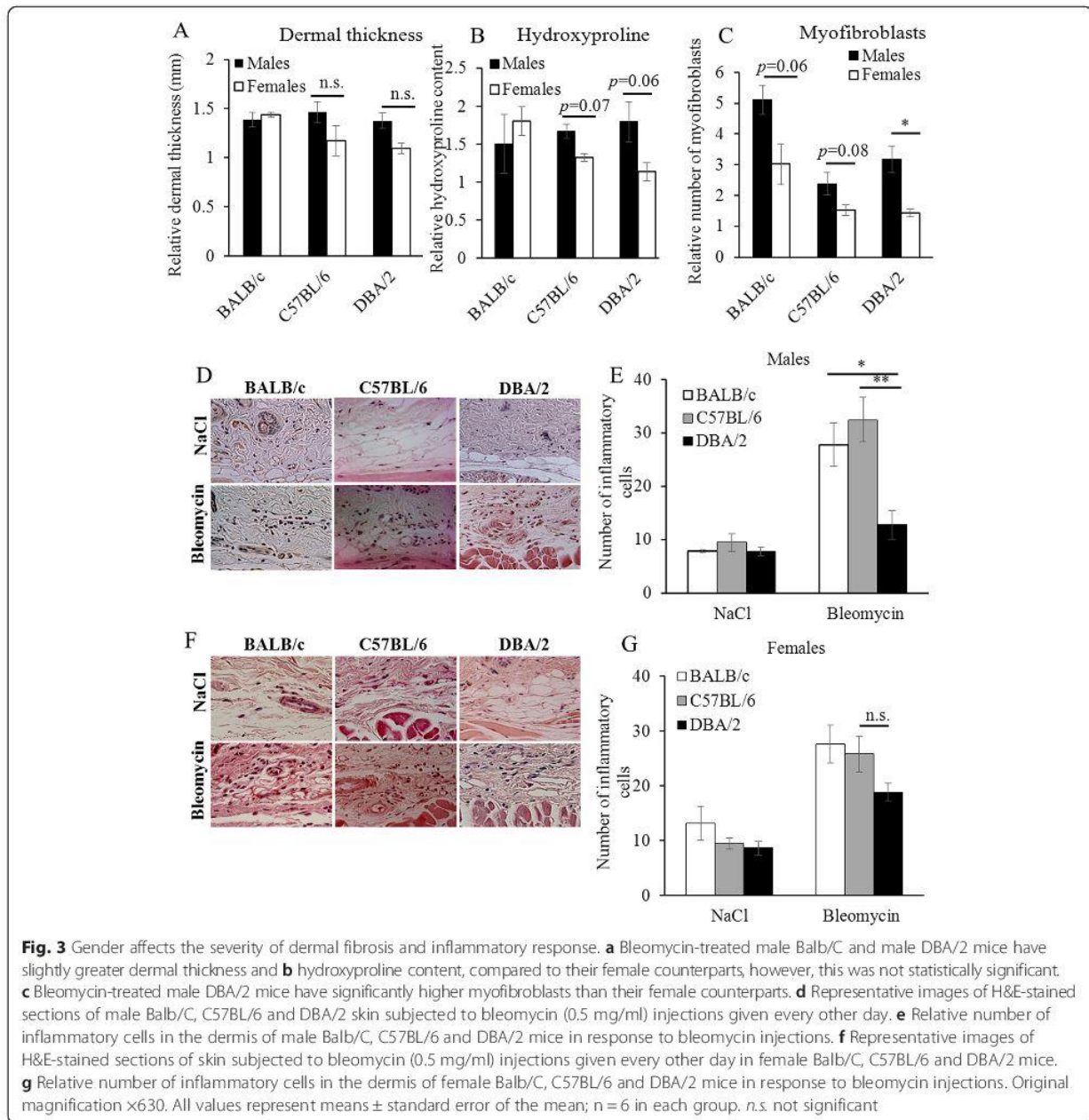
Increasing bleomycin concentration from 0.5 mg/ml to 1 mg/ml does not increase collagen deposition and myfibroblast accumulation in dermal fibrosis

Male C57BL/6 mice were given subcutaneous injections of bleomycin at a final concentration of 0.5 mg/ml or 1 mg/ml (alternate days, 3 weeks). Increasing bleomycin

concentration from 0.5 mg/ml or 1 mg/ml did not have an effect on the severity of dermal fibrosis. There was no difference in dermal thickness (Fig. 6a, b), hydroxyproline content (Fig. 6c, d) or myfibroblast count (Fig. 6e, f) in skin from mice injected with bleomycin at 0.5 mg/ml compared to mice injected with 1 mg/ml bleomycin.

Discussion

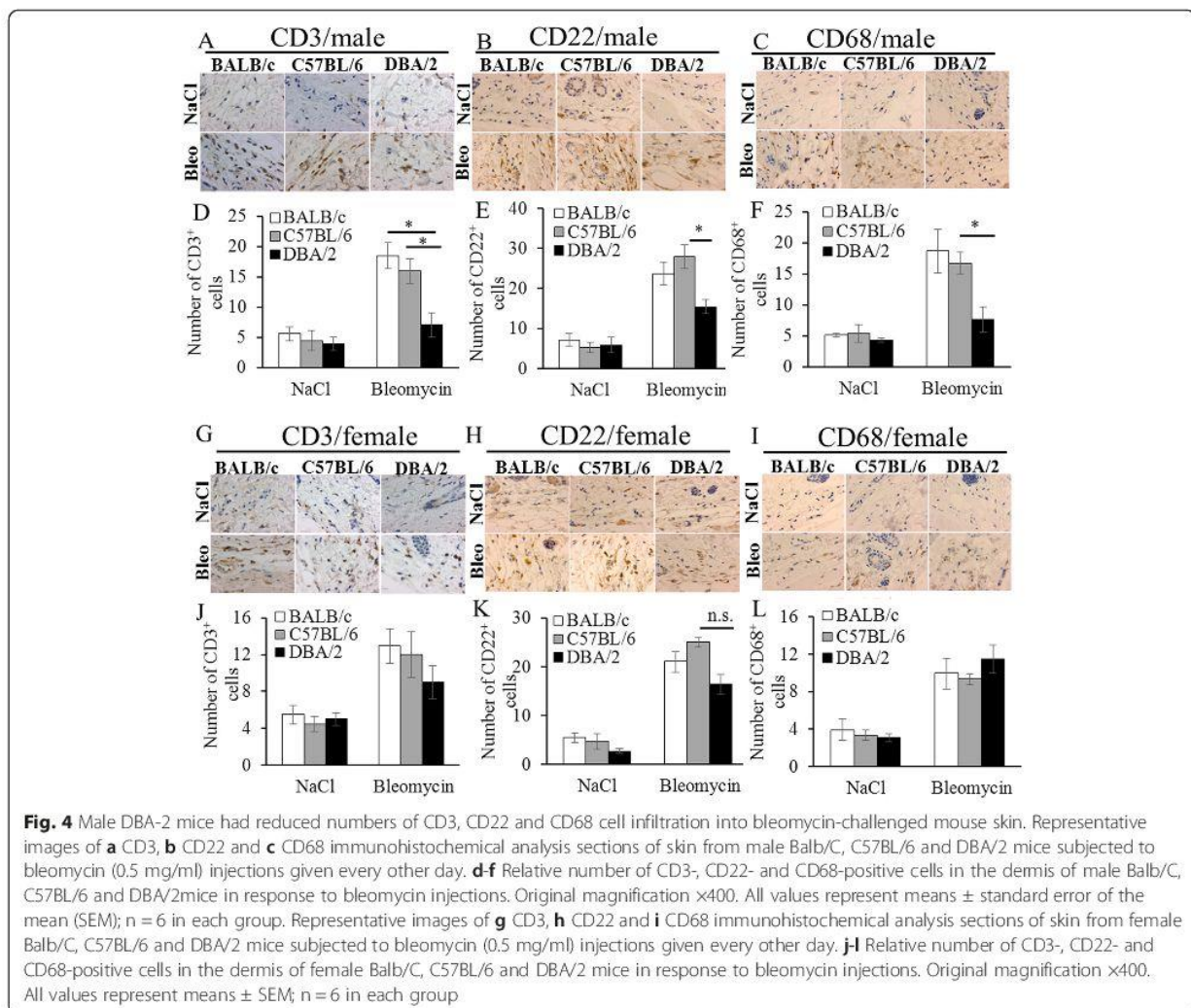
Bleomycin-treated Balb/C mice have the most severe fibrosis phenotype compared to C57BL/6 and DBA/2 mice, suggesting that the severity of skin fibrosis, apart



from other factors such as the route of administration and dose of bleomycin [14], also depends on the genetic background of mice. Male Balb/C mice had a greater number of myofibroblasts than C57BL/6 and DBA/2 mice of the same gender. Female Balb/C mice were previously shown to have higher susceptibility to bleomycin with greater dermal thickness than their female C57BL/6 and DBA/2 counterparts [14]. Similarly, in this study female Balb/C mice had greater levels of skin fibrosis characterised by increased dermal thickness, greater deposition of collagen and elevated number of dermal

myofibroblasts, suggesting that Balb/C mice (at least the female Balb/C mice), may be more susceptible to bleomycin-induced skin fibrosis than their C57BL/6 and DBA/2 counterparts.

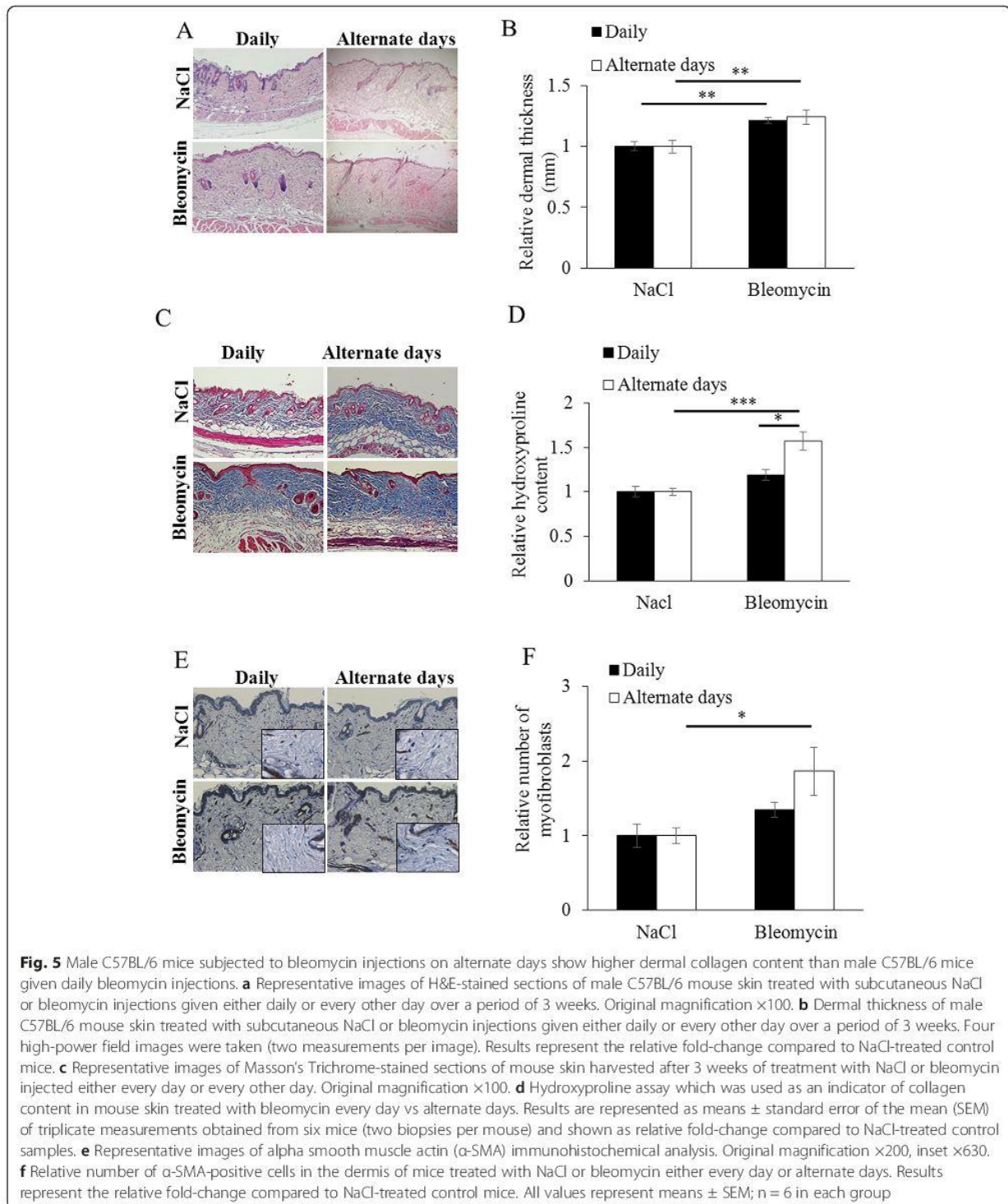
To determine the effect of gender on the severity of skin fibrosis, Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice of both genders were used to induce and assess the extent of fibrosis. Male mice tended to have a more pronounced fibrosis phenotype than female mice and, as observed in DBA/2 mice, had significantly elevated numbers of myofibroblasts than female C57BL/6 and DBA/2 mice.



The fact that male mice are more susceptible to the development of SSc-associated skin fibrosis is in agreement with epidemiological observations, which suggest that although women have greater susceptibility to SSc than men, male patients are known to have a more severe skin fibrosis phenotype [3, 15]. Age is another factor that may have impacted on our study. Human studies indicate that most women are diagnosed with SSc later in life and generally after the onset of menopause [16], whereas animals used in the current study were young and sexually active mice of both genders. Therefore, differences in the severity of fibrosis observed between the genders were possibly due to age, which in turn is characterised by differential expression of sex hormones. For instance, oestrogen was previously shown to have an influence on the development of SSc-associated fibrosis [17] with low levels of oestrogen being associated with severe fibrosis and exacerbated pulmonary hypertension [17]. Oestrogen

levels are at their lowest after the menopause and highest during pregnancy. Given that most women are diagnosed with SSc at the time when their oestrogen levels are at their lowest [16], and some autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis [18], go into remission when oestrogens are at their peak, suggests that oestrogen may play an important protective role in autoimmune diseases such as SSc. Consistent with the observations in human SSc, increased circulating levels of oestrogen in young female compared to young male mice may have had a protective effect against the development of fibrosis, offering a plausible explanation as to why male mice developed a more severe fibrosis phenotype than female mice.

Studying the characteristics of skin changes that develop as a result of repetitive bleomycin injections [10] can help us to better understand inflammation and fibrosis, both of which are key elements that recapitulate pathological events in SSc. Increased inflammatory infiltrate in



lesional skin in SSc, predominantly CD4+ T cells [19], suggests a distinct role of CD4 lymphocytes in the development of skin fibrosis. In animal experiments, bleomycin evokes a proinflammatory response and increased

prevalence of leukocytes. Due to its complexity and the involvement of multiple organs, SSc is difficult to replicate in vivo. While many animal models of SSc exist [4] there is currently no animal model that can capture this

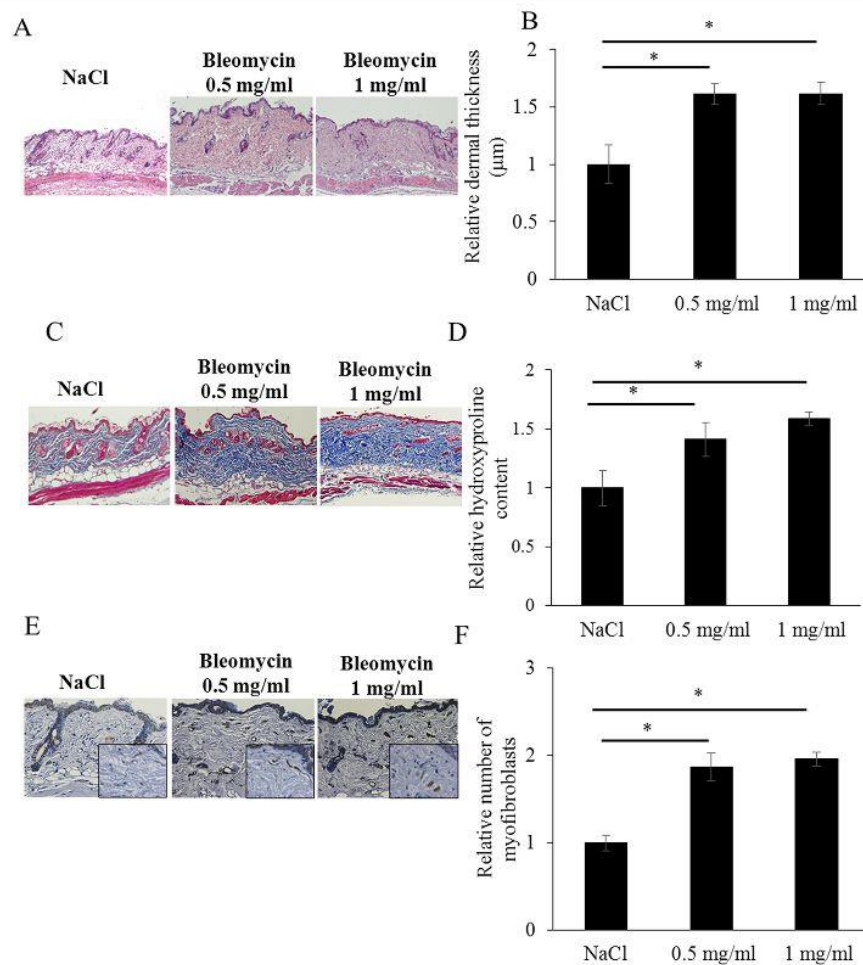


Fig. 6 The effect of low (0.5 mg/ml) and high (1 mg/ml) doses of subcutaneous bleomycin injections on dermal thickness, collagen content and number of myofibroblasts in the skin of male C57BL/6 mice subjected to bleomycin on alternate days for 3 weeks. **a** Representative images of H&E-stained sections of male C57BL/6 mouse skin treated with subcutaneous NaCl or bleomycin injections (0.5 mg/ml or 1 mg/ml) given every other day for 3 weeks. Original magnification $\times 100$. **b** Dermal thickness of male C57BL/6 mouse skin treated with subcutaneous NaCl or bleomycin injections (0.5 mg/ml or 1 mg/ml) given every other day for 3 weeks. Four high-power field images were taken (two measurements per image). Results represent the relative fold-change compared to NaCl-treated control mice. **c** Representative images of Masson's Trichrome-stained sections of mouse skin harvested after 3 weeks of treatment with NaCl or bleomycin injections (0.5 mg/ml or 1 mg/ml) given every other day for 3 weeks. Original magnification $\times 100$. **d** Hydroxyproline content in skin treated with low or high (0.5 mg/ml or 1 mg/ml) doses of bleomycin. Results are represented as means \pm standard error of the mean (SEM) of triplicate measurements obtained from six mice (two biopsies per mouse) and shown as relative fold-change compared to NaCl-treated control samples. **e** Representative images of alpha smooth muscle actin (α -SMA) immunohistochemical analysis in skin from mice treated with subcutaneous NaCl or bleomycin injections (0.5 mg/ml or 1 mg/ml) given every other day for 3 weeks. Original magnification $\times 200$, inset $\times 630$. **f** Relative number of α -SMA-positive cells in the dermis of mice treated with NaCl or bleomycin (0.5 mg/ml vs 1 mg/ml) on alternate days. Results represent the relative fold-change compared to NaCl-treated control mice. All values represent means \pm SEM; $n = 6$ in each group

complexity. Along with its disadvantages, namely the absence of vascular complications [5], the bleomycin-induced model of skin fibrosis provides us with an opportunity to study inflammation, elucidate the pathophysiology of SSc and explore potential treatment interventions. Inflammatory cells are thought to contribute to the initial activation of resident fibroblasts by the release of profibrotic mediators. To assess the contribution

of genetic background on the development of inflammation associated with dermal fibrosis, Balb/C, C57BL/6 and DBA/2 mice of both genders were treated for 3 weeks with subcutaneous injections of bleomycin. Given that male DBA/2 mice had the least number of CD3-, CD22- and CD68-positive inflammatory cells, we suggest that in studies focusing on investigating the effect of inflammation on the pathogenesis of dermal fibrosis, strains other

than DBA/2 are used. The number of inflammatory cells in bleomycin-treated male C57BL/6 mice was three times higher than the number of leucocytes found in DBA/2 mice, suggesting that C57BL/6 could be a strain of choice in studies of inflammation.

Having established the fact that male mice are more susceptible to dermal fibrosis than female mice we used male C57BL/6 mice to investigate whether varying the frequency of bleomycin injections (every day versus alternate days) affects the severity of dermal fibrosis. Bleomycin stimulates extracellular matrix formation by virtue of its profibrotic effects, and importantly, our studies indicated that daily exposure to bleomycin blunted the pro-fibrotic response of bleomycin in the skin, whereas alternate-day administration enhanced this effect. Bleomycin injections administered on alternate days resulted in increased basal hydroxyproline, a biochemical marker of collagen, compared to daily injections. Local bleomycin injections are associated with active stimulation of leukocyte infiltration [20] driving the release of a plethora of proinflammatory cytokines including TGF- β 1, which in turn promotes the synthesis and secretion of collagen and other matrix molecules [21]. Enhanced immune response and consequent TGF- β activation aggravates fibrosis, as it sets up a positive feedback, which could partially explain why bleomycin injections given on alternate days are more efficient in stimulating the extracellular matrix. Alternate-day injections may cause peaks of cytokine release in the skin and stimulate a more sustained inflammatory response than bleomycin injections given daily. The frequent peaks of proinflammatory cytokine release induced by bleomycin injections administered on alternate days versus daily injections might be important in mediating an efficient profibrotic effect of bleomycin. Bleomycin increased skin collagen levels in a dose-dependent manner and, although doses ≤ 0.5 mg/ml are reported to induce histological changes [10], our studies suggest that fibrotic responses are similar in mice treated with low (0.5 mg/ml) and high (1 mg/ml) doses of bleomycin.

Conclusions

In this study we evaluated the potential for the genetic background and gender of mice to effect the induction of experimental mouse dermal fibrosis. With the information present herein, we suggest that dermal fibrosis studies are best done in male rather than female mice due to higher responsiveness to bleomycin injections. Optimum results are obtained using the C57BL/6 strain by treating the mice with subcutaneous bleomycin at a final concentration of 0.5 mg/ml administered on alternate days. These observations are of considerable importance in the selection of an appropriate protocol for the induction of dermal fibrosis, which may be used in pharmacological testing and therapeutic interventions.

Abbreviations

ECM: extracellular matrix; H&E: haematoxylin and eosin; HRP: horseradish peroxidase; PBS: phosphate-buffered saline; SHG: second harmonic generation; SSc: systemic sclerosis; TGF- β : transforming growth factor beta; α -SMA: alpha smooth muscle actin.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JA, ME, MF and BR carried out the animal studies, histological assessment, helped to perform statistical analysis and revised the manuscript. NR and CF carried out histological and immunohistochemical analysis, performed statistical analysis and revised the manuscript. NR, JHD and YA conceived of the study, participated in its design and coordination and revised the manuscript. NR drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank plateformes de morphologie/histologie (M. Favier) et d'imagerie cellulaire (T. Guilbert and P. Bourdoncle) de l'Institut Cochin, Paris, France and Professor Catherine Chaussain, EA2496, Université Paris Descartes, Faculté de Chirurgie Dentaire, Montrouge, France. Funding was provided by INSERM, Société Française de Rhumatologie, Association des Sclérodermiques de France, Fondation pour la recherche Médicale, Arthritis Foundation, CMH Research Projects No. 00000023728. This project was supported by a research grant from SERVIER research group.

Author details

¹INSERM U1016/UMR 8104, Cochin Institute, Paris, France. ²Rheumatology A Department, Paris Descartes University, Paris, France. ³Department of Internal Medicine and Institute for Clinical Immunology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany. ⁴Institut Cochin, INSERM U1016, Bâtiment Gustave Roussy, 27 rue du Faubourg Saint Jacques 75014, Paris, France.

Received: 10 December 2014 Accepted: 21 May 2015

Published online: 30 May 2015

References

- Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51:1017–26.
- Koumaki E, Bouaziz M, Dieude P, Ruiz B, Riemekasten G, Airo P, et al. A regulatory variant in CCR6 is associated with susceptibility to antitopoisomerase-positive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2013;65:3202–8.
- Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009;360:1989–2003.
- Jordan S, Chung J, Distler O. Preclinical and translational research to discover potentially effective antifibrotic therapies in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25:679–85.
- Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine*. 2013;80:23–8.
- Avouac J, Palumbo-Zerr K, Ruzehaji N, Tomcik M, Zerr P, Dees C, et al. The nuclear receptor constitutive androstane receptor/NR113 enhances the profibrotic effects of transforming growth factor beta and contributes to the development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:3140–50.
- Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2831–44.
- Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2010;37:26–41.
- Ishikawa H, Takeda K, Okamoto A, Matsuo S, Isobe K. Induction of autoimmunity in a bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4+ T cells. *J Invest Dermatol*. 2009;129:1688–95.
- Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol*. 1999;112:456–62.
- Fang F, Shangguan AJ, Kelly K, Wei J, Gruner K, Ye B, et al. Early growth response 3 (Egr-3) is induced by transforming growth factor-beta and regulates fibrogenic responses. *Am J Pathol*. 2013;183:1197–208.

12. Avouac J, Elhai M, Tomcik M, Ruiz B, Friese M, Piedavent M, et al. Critical role of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of inflammation-driven dermal fibrosis in a mouse model of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:1089–98.
13. Thievessen I, Thompson PM, Berlemont S, Plevock KM, Plotnikov SV, Zemljic-Harpf A, et al. Vinculin-actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth. *J Cell Biol*. 2013;202:163–77.
14. Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res*. 2000;292:535–41.
15. Elhai M, Avouac J, Walker UA, Matucci-Cerinic M, Riemekasten G, Airo P, et al. A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Ann Rheum Dis*. 2014;1–7. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206386.
16. Mayes MD, Lacey Jr JV, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2246–55.
17. Tofovic SP, Zhang X, Jackson EK, Zhu H, Petrusevska G. 2-methoxyestradiol attenuates bleomycin-induced pulmonary hypertension and fibrosis in estrogen-deficient rats. *Vascul Pharmacol*. 2009;51:190–7.
18. Hughes GC, Choubey D. Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:740–51.
19. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. IV: induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell independent. *J Invest Dermatol*. 2001;117:999–1001.
20. Yamamoto T. Bleomycin and the skin. *Br J Dermatol*. 2006;155:869–75.
21. Lafyatis R. Transforming growth factor beta-at the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:706–19.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



II. Article 2: Intérêt de l'échographie cutanée comme outil de mesure de la fibrose cutanée dans différents modèles animaux de sclérodermie systémique.

PERFORMANCE OF SKIN ULTRASOUND TO MEASURE SKIN INVOLVEMENT IN DIFFERENT ANIMAL MODELS OF SYSTEMIC SCLEROSIS

Muriel Elhai, Jerome Avouac, Carmen Marchiol, Gilles Renault, Barbara Ruiz, Maxime Frechet, Gilles Chiocchia, and Yannick Allanore

Ultrasound in Med. & Biol., Vol. 39, No. 5, pp. 845–852, 2013

Notre deuxième approche a consisté à déterminer si l'échographie cutanée à haute fréquence pouvait apporter une aide à l'évaluation cutanée chez ces animaux. L'histologie est le gold standard comme outil d'évaluation de la fibrose dans les modèles murins (470). Mais, elle nécessite le sacrifice de l'animal, est chronophage et coûteuse. Récemment, de nouvelles directives ont été émises par l'Union Européenne pour promouvoir le bien-être animal. Ces directives reposent sur la règle des 3 R (Réduire, Remplacer, Raffiner) (471) et visent à réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale. Nous nous sommes donc intéressés à une méthode non-invasive d'évaluation de la fibrose: l'échographie dermique. En effet, cet outil semble prometteur pour évaluer la fibrose dermique dans le cadre des morphées ou de la ScS (472–478). Et une étude a suggéré que l'échographie dermique haute-fréquence pourrait détecter l'épaississement cutané avec des performances comparables à l'histologie dans un modèle murin de GVHD (479).

Notre objectif était de déterminer si l'échographie cutanée pourrait être utilisée comme outil de mesure de la fibrose dermique dans deux modèles murins complémentaires de ScS: le modèle de la fibrose dermique induite par la bléomycine et le modèle génétique tsk-1.

La fibrose dermique a été induite chez des souris mâles et femelles âgées de 6 semaines et appartenant à des fonds génétiques différents, C57/BL6, BALB/c et DBA/1 par des injections intra-dermiques de bléomycine pendant 3 semaines selon le protocole déterminé par l'étude précédente. Des injections sous-cutanées de NaCl ont servi de contrôle. Au total, 36 souris ont été analysées : 3 groupes de 6 souris (3 mâles et 3 femelles) C57/BL6, BALB/c et DBA/1 ont reçu de la bléomycine, tandis que les 3 autres groupes similaires recevaient du NaCl. Quatre souris tsk-1 âgées de 5 semaines et 5 souris contrôles pa/pa ont été évaluées pour déterminer les épaisseurs dermique et hypodermique. L'évaluation histologique a été réalisée dans la zone évaluée par échographie. L'épaisseur dermique a été mesurée au niveau dorsal par

échographie haute-fréquence en mode B avec une sonde de 55 MHz. Pour le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine, comme l'épaisseur dermique augmente au cours des trois semaines d'injection, nous avons évalué l'épaisseur dermique une fois par semaine pendant trois semaines. Dans le modèle murin tsk-1, du fait d'une stabilité de l'épaisseur cutanée au cours du temps, nous avons évalué la concordance intra-observateur: trois évaluations hebdomadaires de l'épaisseur dermique et hypodermique ont été réalisées chez toutes les souris tsk-1 et Pa/Pa.

Il n'a pas été mis en évidence à l'échographie de différence significative d'épaisseur dermique entre les souris traitées par la bléomycine et celles ayant reçu du NaCl. Ces résultats étaient en désaccord avec les résultats histologiques qui eux démontraient une augmentation de l'épaisseur dermique chez les souris traitées par bléomycine en comparaison aux souris ayant reçu du NaCl et ce quelle que soit la souche considérée.

Pour le modèle tsk-1, l'épaisseur hypodermique était significativement plus élevée chez les souris tsk-1 en comparaison aux souris Pa/Pa à l'évaluation histologique (augmentée de $406 \pm 46\%$; $p=0,0357$). En accord avec ces résultats, l'épaisseur hypodermique moyenne mesurée à l'échographie était significativement augmentée chez les souris tsk-1 en comparaison au groupe contrôle Pa/Pa (augmentée de $248 \pm 3\%$; $p=0,02$). Aucune différence n'a été mise en évidence pour la mesure échographique de l'épaisseur dermique entre les deux groupes. Les mesures histologique et échographique d'épaisseur cutanée étaient bien corrélées dans ce modèle ($r=0,79$; $p<0,0001$). La concordance intra-observateur pour les trois mesures consécutives chez toutes les souris tsk-1 et Pa/Pa était 0,83 (intervalle de confiance (IC) 95%: [0,52-0,94]), 0,60 (IC 95%: [-0,01-0,89]) et 0,96 (IC95% : [0,87-0,99]) pour l'épaisseur globale, dermique et hypodermique. Ainsi, l'échographie apparaît comme un outil sensible et reproductible pour la détection de l'épaisseur hypodermique dans le modèle murin tsk-1. En revanche, elle ne semble pas adaptée à la mesure de l'épaisseur dermique dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine pour toutes les souris étudiées, notamment les mâles C57/BL6 que nous souhaitions utiliser. Ainsi, nos résultats n'ont pas permis de démontrer une place spécifique à l'échographie dermique dans l'évaluation des modèles murins de ScS. C'est pourquoi, l'évaluation de nos souris a reposé sur l'histologie dans la suite de ce travail.

● *Original Contribution*

PERFORMANCE OF SKIN ULTRASOUND TO MEASURE SKIN INVOLVEMENT IN DIFFERENT ANIMAL MODELS OF SYSTEMIC SCLEROSIS

MURIEL ELHAI,* JÉRÔME AVOUAC,*[†] CARMEN MARCHIOL,* GILLES RENAULT,* BARBARA RUIZ,*
MAXIME FRÉCHET,* GILLES CHIOCCHIA,* and YANNICK ALLANORE*[†]

*Paris Descartes University, INSERM U1016, Institut Cochin, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; and [†]Paris Descartes University, Rheumatology A Department, Cochin Hospital, APHP, Paris, France

(Received 3 June 2012; revised 30 November 2012; in final form 3 December 2012)

Abstract—Animal models are widely used in systemic sclerosis (SSc) research. We set out to determine whether ultrasonography (US) could be used to assess skin fibrosis in two complementary SSc-models: the bleomycin-induced dermal fibrosis model and the tight-skin 1 mouse model. Back skin thickness was measured using a high-frequency ultrasound dedicated to the small animal. There was no significant difference in dermal thickness measured by US between mice injected with bleomycin and those treated with NaCl. These results were inconsistent with histological analyses. Mean US hypodermal thickness was significantly higher in tight-skin 1 mice as compared with Pa/Pa control subgroup ($p = 0.02$). Histologic and US measures of dermal and hypodermal thicknesses in this model were well correlated ($r = 0.79$). The intra-observer concordance was 0.96 for hypodermal thickness. US is reliable and sensitive in detecting hypodermal thickening in the tight-skin 1 mouse model. Further larger studies are warranted to better determine the place of US in SSc-research. (E-mail: yannick.allanore@cch.aphp.fr) © 2013 World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology.

Key Words: Systemic sclerosis, Animal models, Skin ultrasound, Dermal thickness.

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a complex incurable connective tissue disease characterized by extensive fibrosis affecting the skin and a variety of internal organs such as the lungs, the heart and the gastrointestinal tract (Allanore et al. 2008; Gabrielli et al. 2009). Only few aspects of SSc pathogenesis are known, starting from the early inflammatory phase to the fibrosis of skin and internal organs (Allanore and Boileau 2011). Animal models of SSc are widely used to better understand the mechanisms involved in the human disease and to investigate potential new therapies (Yamamoto 2010). Among them, mouse models are prominent. In the assessment of fibrosis, histological examination remains the gold standard to quantify skin thickness, which is the major outcome measure. However this method requires animal sacrifice, is time-consuming and is also expensive.

To improve animal welfare across Europe, the European Union has promulgated new directives for the

protection of laboratory animals according to the three Rs concept (reduce, refine, replace) (Russell and Burch 1959; Wells 2011). These laws aim to reduce, as possible, the number of animals used in experiments. Thus, the development of non-invasive measures of skin involvement is warranted in research. Unlike histologic assessment, ultrasonography (US) does not require sacrifice of animals. Particularly, high-frequency US appears to be a promising tool in evaluation and monitoring of oncological, infectious and inflammatory skin diseases (Akesson et al. 2004; El-Zawahry et al. 2007; Hesselstrand et al. 2008; Jasaitiene et al. 2011; Kaloudi et al. 2010; Kleinerman et al. 2012). Indeed, in addition to measurement of skin thickness, it allows a qualitative assessment of the skin *in vivo* (El-Zawahry et al. 2007; Jasaitiene et al. 2011; Kleinerman et al. 2012). In patients with SSc, measurement of skin involvement is essential for diagnosis and prognosis and is used as a clinical trial outcome measure (Clements et al. 1990; Steen et al. 2001). Currently, skin fibrosis is assessed by a semiquantitative score, which is limited by intra-observer and inter-observer variability (Clements et al. 1995; Clements et al. 1993). Thus, the development of more objective and sensitive tools of measure of skin

Address correspondence to: Yannick Allanore, Service Rhumatologie A, Hôpital Cochin, 27 Rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris, France. E-mail: yannick.allanore@cch.aphp.fr

involvement, such as US, is needed in clinical practice. Several studies have suggested that US and high-frequency US could assess dermal thickening and disease activity in localized scleroderma and SSc (Åkesson et al. 2004; El-Zawahry et al. 2007; Hesselstrand et al. 2008; Kaloudi et al. 2010; Kleinerman et al. 2012; Li et al. 2011; Li and Liebling 2009; Wortsman et al. 2011). In animals, some preliminary studies have suggested that high-frequency US could be valuable in assessment of skin thickness in various breeds of normal dogs (Diana et al. 2004) and in detecting dermal edema in hairless mice (Seidenari et al. 1994). In animal models of SSc, there is to date only one study, which suggested that high-frequency US could be useful in detecting skin thickening over the course of the disease in a murine model of graft versus host-induced (GVH) SSc (Tedstone et al. 2008). However, this model is barely used in SSc research, because technically challenging, and this study used US to assess ear skin changes, which is not the usual site of dermal fibrosis assessment in murine models, as well as in humans (Beyer et al. 2010, Tedstone et al. 2008, Yamamoto 2010).

Although an animal model that exhibits all of the aspects of SSc is not currently available, several experimental animal models of fibrosis are used (Yamamoto 2010). The most widely used in SSc research, especially for therapeutic approaches, are the bleomycin-induced dermal fibrosis and the tight skin-1 (TSK-1) mouse models (Avouac et al. 2011; Beyer et al. 2010; Yamamoto 2010). These complementary models mimic different stages of the disease: the bleomycin mouse model reflects early inflammatory stages of SSc and the TSK-1 mouse is a model for later inflammation-independent stages of SSc (Beyer et al. 2010). Our aim was to determine whether high-frequency US could be valuable to assess dermal thickness in these two complementary models of experimental dermal fibrosis.

MATERIALS AND METHODS

Bleomycin-induced dermal fibrosis

This model is characterized by dense inflammatory infiltrates into lesional skin, which are thought to contribute to the initial activation of resident fibroblasts by the release of profibrotic mediators. Dermal fibrosis was induced in different mice strains, because some variations among mice strains in the intensity of the dermal fibrosis have been reported upon bleomycin injections (Oi et al. 2004; Yamamoto 2010; Yamamoto et al. 2000). Mice belonging to the C57/BL6, BALB/c and DBA/1 strains were obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Skin fibrosis was induced in 6-week-old male and female mice by local injections of bleomycin for 3 weeks, as previously described

(Avouac et al. 2012; Avouac et al. 2011). Briefly, 100 μ l of bleomycin dissolved in 0.9% NaCl at a concentration of 0.5 mg/ml were administered every other day by subcutaneous injection into defined areas of 1 cm² on the upper back. Subcutaneous injections of 100 μ l 0.9% NaCl were used as controls. Six different groups of mice (three males and three females each), consisting of 36 mice in total, were analyzed. Three groups (one group of BALB/c mice, one of C57/BL6 mice and one of DBA1 mice) were treated with bleomycin, and the remaining three groups were injected with NaCl. After 3 weeks, mice were sacrificed by cervical dislocation, and the skin was processed for analysis of dermal thickness.

The TSK-1 mouse model

TSK-1 mice were used to investigate the ability of US in detecting dermal thickening in a model of later and less-inflammatory stages of SSc (Beyer et al. 2010). The TSK-1 phenotype is caused by a dominant mutation in the fibrillin 1 gene (Green et al. 1976). Inflammatory infiltrates are absent and fibroblasts from TSK-1 are endogenously activated, similar to SSc fibroblasts, resulting in accumulation of collagen fibers in the hypodermis. Four 5-weeks-old TSK-1 mice were purchased from The Jackson Laboratory. The control group consisted of 5 pa/pa mice. Mice were killed by cervical dislocation at the age of 10 weeks to analyze hypodermal and dermal thickness. The local ethics committee approved all animal experiments.

Histological assessment

Lesional skin specimens were excised, fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin and eosin.

Histological assessment was performed in the area evaluated by US. Mice were sacrificed the following day after the last US assessment. The dermal thickness was analyzed at 100-fold magnification by measuring the distance between the epidermal–dermal junction and the dermal–subcutaneous fat junction at 4 sites in the lesional skin of each mouse in the bleomycin-mouse model and at 40-fold magnification in TSK-1 and Pa/Pa mice (Avouac et al. 2012; Avouac et al. 2011). The hypodermal thickness in TSK-1 and in Pa/Pa mice was determined by measuring the thickness of the subcutaneous connective tissue beneath the panniculus carnosus at 4 different sites on the upper back of each mouse at 40-fold magnification. All images were captured by Nikon E800, and two independent blinded examiners performed the evaluation (ME and JA for the bleomycin mouse model or ME and MF for the TSK-1 mouse model).

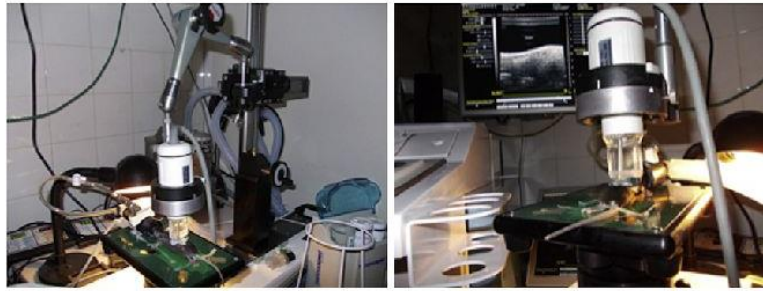


Fig. 1. Photos of the system with a mouse during the experiment. The US probe was placed on the shaved area of the back. The probe was mounted to an articulated arm to control the angle between ultrasound transverse plane and mouse skin surface (equal to 90°). It was held in such a way as to avoid compressing the skin.

Ultrasound assessment

Animal preparation. Mice were sedated using 1.5% isoflurane in air (Minerve équipement vétérinaire, Esternay, France). They were attached on the heating pad in a supine position.

Evaluation of skin thickness by US. Skin thickness from the back was measured using an ultrasound biomicroscope (VEVO770, Visualsonics) in B mode. A 55 MHz probe (RMV708) was used for optimal spatial resolution; it provided a resolution of $30 \times 70 \mu\text{m}$ (axial \times lateral). The focal length was 4.5 mm, and the depth of field was 1.4 mm. The incidence used was the sagittal view. A conductive gel was spread over the membrane to ensure complete contact between the skin and the transducer. For US measurements, the back of the mouse was shaved. The probe was mounted to an articulated arm to control the angle between ultrasound transverse plane and mouse skin surface (equal to 90°). Accurate positioning was achieved using the micrometric screws. The US probe was then accurately positioned on the lesion area, corresponding to the shaved area (*i.e.*, the injected area in the bleomycin model). It was held in such a way as to avoid compressing the skin (Fig. 1).

US assessment. For calculation of skin thickness, upper and lower boundaries were set corresponding to two hyper-echogenic bands (Fig. 2a–c). Under the lower boundary, there was a muscular layer, mobile with the probe. The height of the hyper-echogenic tissue between these two bounds was measured at 6 sites in lesional skin. In each site, three measures were performed. In cases of TSK-1 mice, there were two hyper-echogenic tissues separated by a hyper-echogenic limit (Fig. 3a, b). Dermal thickness and global thickness, *i.e.*, the sum of the two heights of hyper-echogenic tissues were measured. Hypodermal thickness was calculated as the difference between global thickness and dermal thickness.

For the bleomycin-mouse model, because dermal thickening increases over time during the three weeks

of injections, we assessed dermal thickening once a week within the three weeks and compared this measure with the one of littermates mice treated with NaCl. Two independent operators (C.M. and G.R.), blinded to the diagnosis, performed the measurements and analyses.

In the TSK-1 mouse model, because the dermal thickening is stable over time, we decided to assess the intra-observer variability: three evaluations of dermal and hypodermal thickening were performed at 8, 9 and 10 weeks old in all TSK-1 and Pa/Pa mice. The same operator (C.M.), blinded to the treatment, performed the measurements and analyses for all the time points.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm standard deviation of the mean (SEM). Student's *t*-test was used for statistical analyses. *p* values less than 0.05 were considered significant. Correlation between US and histology was assessed using Spearman rank correlation coefficient (ρ). The intra-observer concordance was assessed by the Intraclass Correlation Coefficient, which provided a measure of agreement for each mouse between the three consecutive measures. Intra-class correlation and rank correlation coefficients were calculated using MedCalc. Other statistical analyses were performed using Graph-Pad Prism software.

RESULTS

Bleomycin-induced dermal fibrosis in mice of different backgrounds

Histological assessment. Dermal thickness was significantly higher in mice treated with bleomycin as compared with mice treated with NaCl in all the three strains: following bleomycin challenge, dermal thickness was increased by $42\% \pm 4\%$ in BALB/c mice (1.1 mm vs. 0.7 mm, $p = 0.002$) (Fig. 4a), by $72\% \pm 23\%$ in C57/BL6 mice (1.2 mm vs. 0.7 mm, $p = 0.026$) (Fig. 4b) and by $62\% \pm 15\%$ in DBA/1 mice (1.1 mm vs. 0.6 mm,

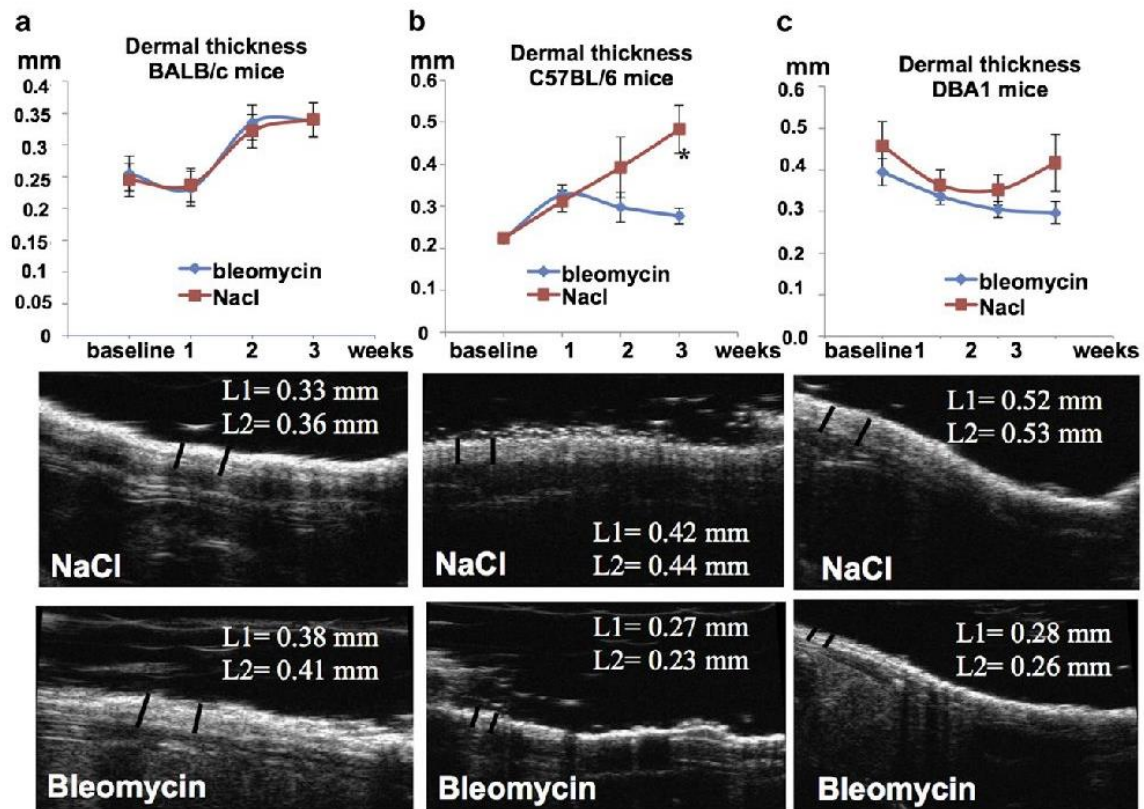


Fig. 2. Ultrasound measurements of dermal thickening over the three weeks of injections with either NaCl or Bleomycin. Evolution of dermal thickness assessed by US with examples of US images in BALB/c subgroup (a), in C57/BL6 mice (b) and in DBA/1 mice (c). The curves represent the mean value in each subgroup and error bars represent the standard deviation of the mean. On images, dermal thickening corresponds to the hyper-echogenic band (black arrow). Three measures were made by image (L1 and L2 represent two measures). Asterisk indicates statistically significant differences.

$p = 0.002$) (Fig. 4c) as compared with mice injected with NaCl.

US assessment. In BALB/c mice, dermal thickness increased in both the NaCl and bleomycin subgroup over time (from $0.25 \text{ mm} \pm 0.005 \text{ mm}$ at baseline to $0.34 \text{ mm} \pm 0.05 \text{ mm}$ at 3 weeks in the bleomycin group; $p = \text{NS}$ and from $0.24 \text{ mm} \pm 0.007 \text{ mm}$ at baseline to $0.34 \text{ mm} \pm 0.004 \text{ mm}$ at 3 weeks in the NaCl group; $p = 0.04$) (Fig. 2a). After 3 weeks of injection, the dermal thickness was not significantly different between mice challenged with bleomycin and littermates treated with NaCl. Examples of US images in the BALB/c subgroup are shown in Figure 2a.

In C57/BL6 mice, dermal thickness assessed by US increased in the bleomycin group (from $0.22 \text{ mm} \pm 0.007 \text{ mm}$ at baseline to $0.28 \text{ mm} \pm 0.02 \text{ mm}$ at 3 weeks; $p = 0.01$) and also in the NaCl subgroup (from $0.22 \text{ mm} \pm 0.009 \text{ mm}$ at baseline to $0.48 \text{ mm} \pm 0.006 \text{ mm}$ at 3 weeks; $p = 0.0043$). After 3 weeks, dermal thickness assessed by US was significantly higher in the subgroup

treated with NaCl, as compared with those injected with bleomycin ($p = 0.026$) (Fig. 2b).

In DBA/1 mice, dermal thickness did not change significantly over time in both groups (from $0.39 \text{ mm} \pm 0.03 \text{ mm}$ at baseline to $0.30 \text{ mm} \pm 0.027 \text{ mm}$ at 3 weeks in the bleomycin subgroup and from $0.46 \text{ mm} \pm 0.06 \text{ mm}$ to $0.42 \text{ mm} \pm 0.07 \text{ mm}$ in the NaCl subgroup, $p = \text{NS}$). Comparison between the NaCl subgroup and the bleomycin subgroup did not reveal any difference (Fig. 2c).

Results of histological and US assessments for all the three strains are summarized in Table 1.

Correlation between histology and US after three weeks of bleomycin injections

No correlation between US and histological measures of dermal thickness has been observed in mice treated with bleomycin or NaCl (in BALB/c mice: Spearman rank correlation coefficient ρ was equal to -0.03 , $p = 0.9$; in C57/BL6 mice: $\rho = -0.3$, $p = 0.3$; in DBA1 mice: $\rho = -0.4$, $p = 0.4$).

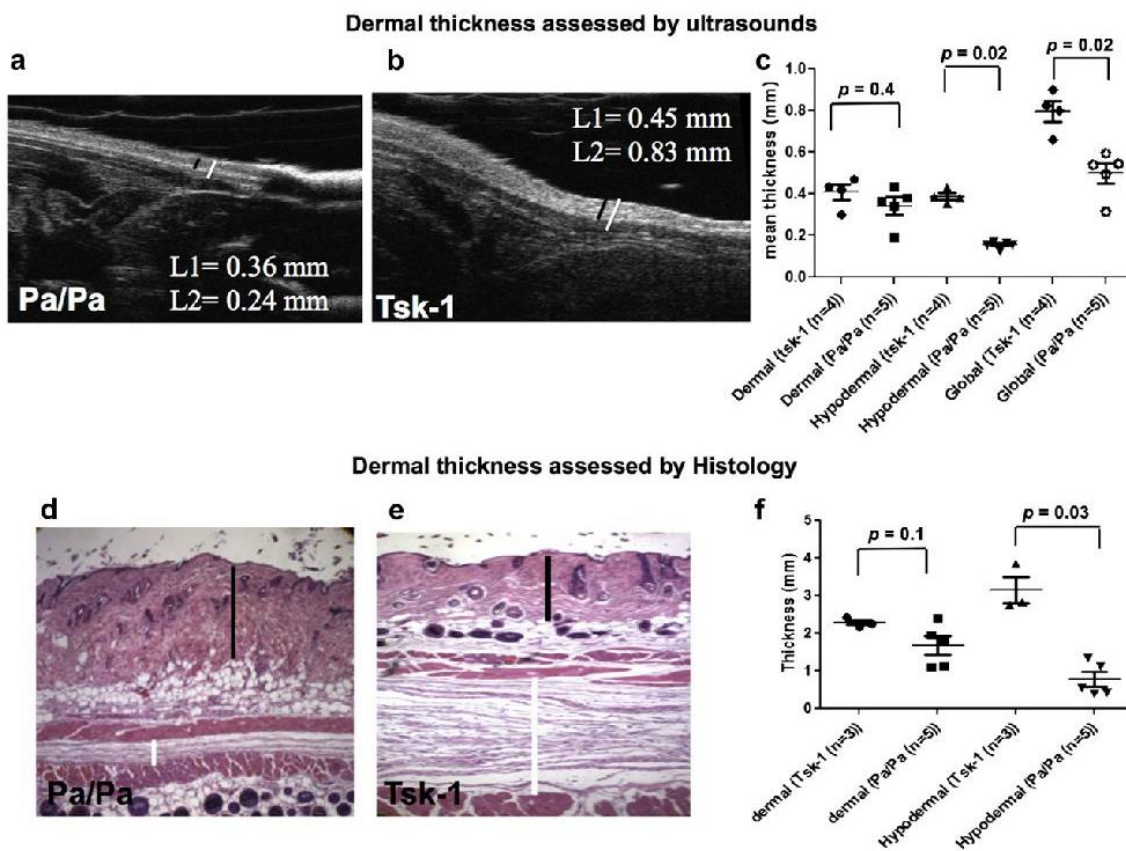


Fig. 3. Ultrasound measurements of dermal, global and hypodermal thickenings in TSK-1 and Pa/Pa mice. Examples of ultrasound images in Pa/Pa mice (a) and in TSK-1 (b). Dermal and hypodermal thickenings correspond to the two hyperechogenic tissues; the black arrow represents dermal thickening (measure = L1), whereas the white arrow corresponds to global thickening, i.e. the sum of dermal and hypodermal thickenings (measure = L2). Hypodermal thickness was calculated as the difference between global thickness and dermal thickness. (c) comparison of dermal, global and hypodermal thickenings in TSK-1 and Pa/Pa mice. Bars represent the mean of three consecutive measures. Error bars represent the standard deviation of the mean. (d and e) Histological assessment of dermal (black arrow indicates an example of distance measurement) and hypodermal (white arrow) thickenings in TSK-1 mice and Pa/Pa mice. Representative hematoxylin and eosin-stained skin sections at 40-fold magnification of Pa/Pa mice (d) and TSK-1 mice (e) are shown. There was no significant difference for dermal thickness, but an increased hypodermal thickness in TSK-1 mice as compared with Pa/Pa mice (f). Bars show the mean \pm the standard deviation of the mean.

Dermal and hypodermal thicknesses in TSK-1 and Pa/Pa mice

Histological assessment. Dermal thickness was increased by $36\% \pm 4\%$ in TSK-1 mice as compared with Pa/Pa mice, but it did not reach significance (2.3 mm vs. 1.6 mm, $p = 0.1429$). Hypodermal thickness was significantly higher in TSK-1 mice as compared with Pa/Pa mice (increased by $406\% \pm 46\%$) (3.15 mm vs. 0.7 mm, $p = 0.0357$) (Fig. 3).

US assessment. Examples of US measures in TSK-1 and Pa/Pa subgroups are shown in Figure 3 (a, b). Mean hypodermal thickness was significantly higher in the TSK-1 mice as compared with the Pa/Pa subgroup ($p = 0.0159$). There was no significant difference in

dermal thickness measured by US between both groups (Fig. 3c).

Results of both histological and US assessments in TSK-1 and Pa/Pa mice are summarized in Table 2.

Correlation between histology and US

Histologic and US assessments for all measures were well correlated ($\rho = 0.788$; $p < 0.0001$) (Fig. 5).

Intra-observer variability

As the dermal thickening is stable over time in this model, we assessed the intra-observer variability: three evaluations of dermal and hypodermal thickening were performed once a week within three weeks in all TSK-1 and Pa/Pa mice. The intra-observer concordance for the

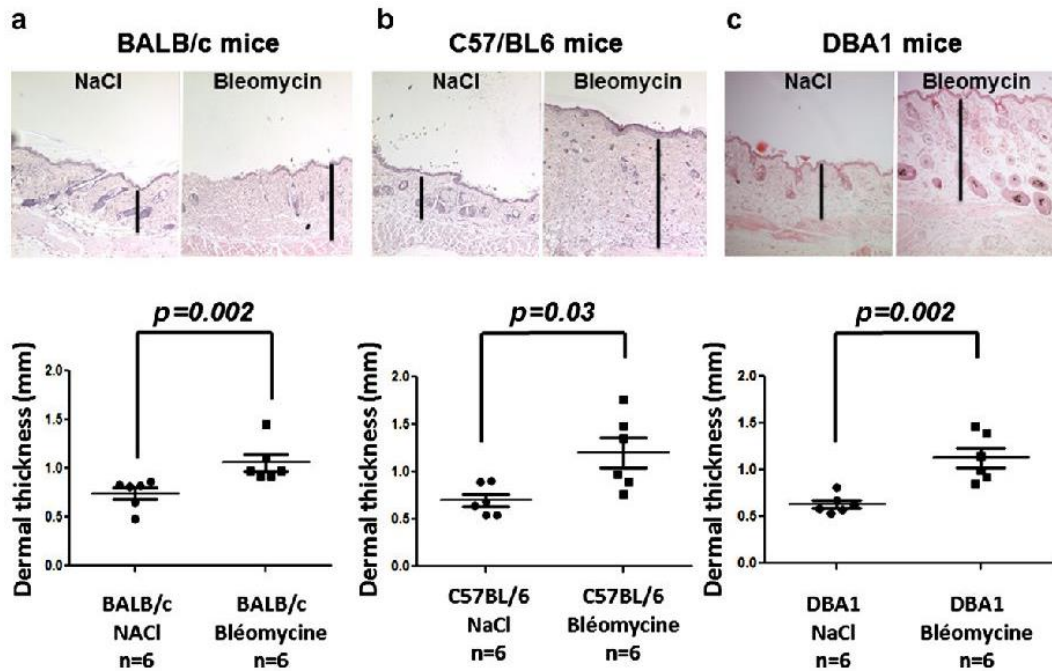


Fig. 4. Histological assessment of dermal thickening after three weeks of injections of bleomycin. Representative hematoxylin and eosin-stained skin sections at 100-fold magnification are shown. Increased dermal thickness (*black arrow*) in BALB/c mice (a), C57/BL6 mice (b) and DBA/1 mice (c) injected with bleomycin as compared with mice treated with NaCl. Control mice were injected with NaCl. Bars show the mean \pm the standard deviation of the mean.

three consecutive measures was 0.83 (confidence interval (CI) 95%: [0.52–0.94]), 0.60 (CI 95%: [–0.01–0.89]) and 0.96 (CI 95%: [0.87–0.99]) for global, dermal and hypodermal thickness measures, respectively.

DISCUSSION

Our study is the first, to our knowledge, to specifically assess the ability of US in detecting skin thickness in two widely used mouse models of SSc. Furthermore, to thoroughly evaluate the usefulness of skin US in SSc research, US was performed under the usual experimental conditions in both models. Our results show that US is a reliable and sensitive tool in detecting hypodermal thickening in the TSK-1 mouse model.

Despite preliminary reports suggesting that US could be a relevant method for dermal assessment in

animals (Diana et al. 2004; Seidenari et al. 1994; Tedstone et al. 2008), we failed to demonstrate the merit of US to evaluate dermal thickening in our SSc mouse models. Some technical difficulties could explain this result: the lesional skin assessed was a small area of 1 cm² on the upper back, which can be difficult to locate, and the skin was shaved and not depilated, which can interfere with the analysis. However, these difficulties are related to the common experimental conditions in the bleomycin-mouse model, *i.e.*, injection in a small area of 1 cm², need of shaving because depilation is irritative and can modify histological results (Beyer et al. 2010; Yamamoto 2010). In addition, the difficulties of US in distinguishing dermal fibrosis between mice injected with bleomycin and those treated with NaCl may have been related to dermal edema following injections. Furthermore, despite our effort to standardize the

Table 1. Evaluation of dermal thickness by ultrasound and histology in the mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis

Treatment received	DBA/1 mice (<i>n</i> = 12)		BALB/c mice (<i>n</i> = 12)		C57/BL6 mice (<i>n</i> = 12)	
	Bleomycin	NaCl	Bleomycin	NaCl	Bleomycin	NaCl
Histology (mm)	1.1 \pm 0.01	0.6 \pm 0.006	1.1 \pm 0.004	0.7 \pm 0.008	1.2 \pm 0.02	0.7 \pm 0.009
US* (mm)	0.30 \pm 0.027	0.42 \pm 0.07	0.28 \pm 0.02	0.48 \pm 0.006	0.34 \pm 0.05	0.34 \pm 0.05

US = ultrasonography.

* Dermal thickness measured at US at the third week. Values are mean \pm SEM.

Table 2. Evaluation of dermal and hypodermal thicknesses measured by ultrasound and histology in the tight skin mouse model

Localization	TSK-1 mice (<i>n</i> = 4)		Pa/Pa mice (<i>n</i> = 5)	
	Dermal	Hypodermal	Dermal	Hypodermal
Histology (mm)	2.3 ± 0.04	3.15 ± 0.11	1.6 ± 0.035	0.7 ± 0.06
US* (mm)	0.46 ± 0.16	0.37 ± 0.11	0.42 ± 0.17	0.16 ± 0.07

US = ultrasonography; Tsk-1 = tight skin 1.

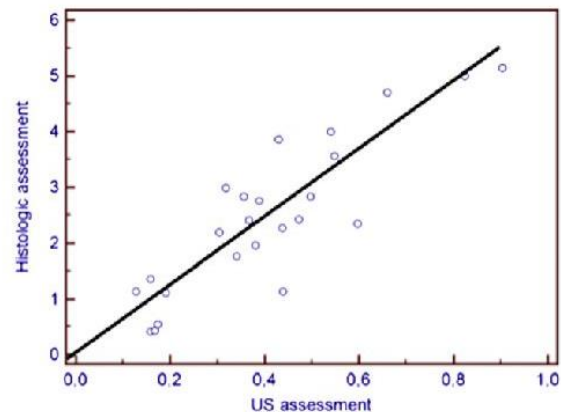
* Mean of the three consecutive measures. Values are mean ± SEM.

imaging plane, some US measurements did not use the highest resolution of the VEVO 770 system and this is a limitation of the study.

The VEVO systems (*i.e.*, 2100 or 770) appear to be the most relevant systems for this analysis. Firstly, they both offer very high resolution in B mode to differentiate the dermal layers (in spite of very different technologies in probe technology and beam forming). Furthermore, they are, up to now, the most appropriate systems for the small animal ultrasound imaging. Indeed, these systems allow accurate and reliable positioning using the micrometric screws provided by the Integrated Rail System. However, we can hypothesize that some additional techniques may improve the tissue delineation, and thus the ability of high-frequency US to measure dermal thickness, such as 3-D scan or the acquisition of raw radio-frequency signals. They should be evaluated in further studies. Similarly, the development of high-frequency US elastography, which calculates the degree of elasticity of the tissue, could be helpful to better assess dermal fibrosis (Fujimura *et al.* 2008; Garra 2007; Iagnocco *et al.* 2010; Kleinerman *et al.* 2012).

On the other hand, in our study, US showed its value in evaluating hypodermal thickening, confirming previous results obtained in human and animals (Bellisari *et al.* 1993; Kleinerman *et al.* 2012; Leahy *et al.* 2012; Li *et al.* 2011; McEvoy *et al.* 2007; Mlosek *et al.* 2011; Sabir *et al.* 2003; Wilkinson and McEwan 1991). But we also demonstrated that US did not only show increased hypodermal thickness in TSK-1 mice compared with Pa/Pa mice, but also correlated with histological findings for skin thickness. In addition, US was highly consistent for multiple measurements performed in the same mouse. These findings are of interest because hypodermal thickening is the parameter that is usually assessed in this model and published in studies (Avouac *et al.* 2011; Beyrer *et al.* 2010; Green *et al.* 1976; Yamamoto 2010).

Histological examination is currently the gold standard for evaluation of hypodermal thickening in this model. However it requires sacrifice of animals and is time-consuming for preparation and evaluation of the



rho = 0.788
p < 0.0001

Fig. 5. Correlations between histological and ultrasound (US) assessments for all consecutive measures assessed by Spearman rank correlation coefficient (ρ) ($\rho = 0.788$; $p < 0.0001$).

tissues. Furthermore, TSK-1 mice are very expensive and histological procedures can damage tissues, which may prevent a rigorous evaluation. On the other hand, US does not require sacrifice of the animals. It is affordable, widely available, safe and portable (Greco *et al.* 2012). Therefore using this method could result in a decreased number of sacrificed mice, which is in accordance with the 3Rs concept, and in a decrease in costs (Russell and Burch 1959; Wells 2011). US could also allow several assessments of the same individual mice over the time and be used in preclinical mouse studies for assessments of hypodermal thickening in the TSK-1 mouse model upon administration of potential new therapeutics. The application of this technology should allow skin assessments in this mouse model, monitoring of the individual animals over the time and also detecting of the effects of potential new treatments.

Moreover, in patients with SSc, US could be an objective tool to assess skin fibrosis and disease activity (Akesson *et al.* 2004; El-Zawahry *et al.* 2007; Hesselstrand *et al.* 2008; Kaloudi *et al.* 2010; Kleinerman *et al.* 2012; Li *et al.* 2011; Li and Liebling 2009; Wortsman *et al.* 2011). Thus it could be used for diagnosis, prognosis and as an objective clinical trial outcome measure. However evaluation of US in patients with SSc was beyond the scope of the present study, which only focused on the use of US in mouse models of SSc.

Altogether, our results suggest that US is reliable and effective in detecting skin involvement and, particularly, hypodermal thickening in the TSK-1 mouse model, a non-inflammatory mouse model of SSc. However,

it seems not efficient enough to assess dermal thickening in our mouse models of SSC.

Acknowledgments—We thank the Small Animal Imaging Facility INSERM U1016 (Franck Lager and Didier Fradelizi) and the Histology Department, INSERM U1016 (Maryline Favier and Corinne Lesaffre) for excellent technical assistance. This study was supported by the Société Française de Rhumatologie, the Association des Sclérodermiques de France, Arthritis Foundation, Servier Research Group and the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

- Akesson A, Hesselstrand R, Scheja A, Wildt M. Longitudinal development of skin involvement and reliability of high frequency ultrasound in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:791–796.
- Allanore Y, Boileau C. Genetics and pathophysiology of systemic sclerosis. *Bull Acad Natl Med* 2011;195:55–65, discussion 66–67.
- Allanore Y, Avouac J, Kahan A. Systemic sclerosis: An update in 2008. *Joint Bone Spine* 2008;75:650–655.
- Avouac J, Palumbo K, Tomcik M, Zerr P, Dees C, Horn A, Maurer B, Akhmetshina A, Beyer C, Sadowski A, Schneider H, Shiozawa S, Distler O, Schett G, Allanore Y, Distler JH. Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor β -mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum* 2012;64:1642–1652.
- Avouac J, Fürtrohr BG, Tomcik M, Palumbo K, Zerr P, Horn A, Dees C, Akhmetshina A, Beyer C, Distler O, Schett G, Allanore Y, Distler JH. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2011;63:800–809.
- Bellisari A, Roche AF, Siervogel RM. Reliability of B-mode ultrasonic measurements of subcutaneous adipose tissue and intra-abdominal depth: Comparisons with skinfold thicknesses. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17:475–480.
- Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: Prospects and limitations. *Arthritis Rheum* 2010;62:2831–2844.
- Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, Weinstein A, Weisman M, Mayes M, Collier D, *et al*. Inter and intra-observer variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1995;22:1281–1285.
- Clements PJ, Lachenbruch PA, Seibold JR, Zee B, Steen VD, Brennan P, Silman AJ, Allegar N, Varga J, Massa M, *et al*. Skin thickness score in systemic sclerosis: An assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J Rheumatol* 1993;20:1892–1896.
- Clements PJ, Lachenbruch PA, Ng SC, Simmons M, Sterz M, Furst DE. Skin score. A semiquantitative measure of cutaneous involvement that improves prediction of prognosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1256–1263.
- Diana A, Preziosi R, Guglielmini C, Degliesposti P, Pietra M, Cipone M. High-frequency ultrasonography of the skin of clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 2004;65:1625–1630.
- El-Zawahry MB, Abdel El-Hameed El-Cheweikh HM, Abd-El-Rahman Ramadan S, Ahmed Bassiouny D, Mohamed Fawzy M. Ultrasound biomicroscopy in the diagnosis of skin diseases. *Eur J Dermatol* 2007;17:469–475.
- Fujimura T, Osanai O, Moriwaki S, Akazaki S, Takema Y. Development of a novel method to measure the elastic properties of skin including subcutaneous tissue: New age-related parameters and scope of application. *Skin Res Technol* 2008;14:504–511.
- Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009;360:1989–2003.
- Garra BS. Imaging and estimation of tissue elasticity by ultrasound. *Ultrasound Q* 2007;23:255–268.
- Greco A, Mancini M, Gargiulo S, Gramanzini M, Claudio PP, Brunetti A, Salvatore M. Ultrasound biomicroscopy in small animal research: Applications in molecular and preclinical imaging. *J Biomed Biotechnol* 2012 [Epub ahead of print].
- Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 1976;82:493–512.
- Hesselstrand R, Scheja A, Wildt M, Akesson A. High-frequency ultrasound of skin involvement in systemic sclerosis reflects edema, extension and severity in early disease. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:84–87.
- Iagnocco A, Kaloudi O, Perella C, Bandinelli F, Ricciari V, Vasile M, Porta F, Valesini G, Matucci-Cerinic M. Ultrasound elastography assessment of skin involvement in systemic sclerosis: Lights and shadows. *J Rheumatol* 2010;37:1688–1691.
- Jasaitiene D, Valiukeviciene S, Linkeviciute G, Raisutis R, Jasiuniene E, Kazys R. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25:375–382.
- Kaloudi O, Bandinelli F, Filippucci E, Conforti ML, Miniati I, Guiducci S, Porta F, Candelieri A, Conforti D, Grassiri G, Grassi W, Matucci-Cerinic M. High frequency ultrasound measurement of digital dermal thickness in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1140–1143.
- Kleinerman R, Whang TB, Bard RL, Marmur ES. Ultrasound in dermatology: Principles and applications. *J Am Acad Dermatol* 2012 Jan 26 [Epub ahead of print].
- Leahy S, Toomey C, McCreesh K, O'Neill C, Jakeman P. Ultrasound measurement of subcutaneous adipose tissue thickness accurately predicts total and segmental body fat of young adults. *Ultrasound Med Biol* 2012;38:28–34.
- Li SC, Liebling MS, Haines KA, Weiss JE, Prann A. Initial evaluation of an ultrasound measure for assessing the activity of skin lesions in juvenile localized scleroderma. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:735–742.
- Li SC, Liebling MS. The use of Doppler ultrasound to evaluate lesions of localized scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2009;11:205–211.
- McEvoy FJ, Strathe AB, Madsen MT, Svalastoga E. Changes in the relative thickness of individual subcutaneous adipose tissue layers in growing pigs. *Acta Vet Scand* 2007;49:32.
- Mlosek RK, Dębowska RM, Lewandowski M, Malinowska S, Nowicki A, Eris I. Imaging of the skin and subcutaneous tissue using classical and high-frequency ultrasonographies in anti-cellulite therapy. *Skin Res Technol* 2011;17:461–468.
- Oi M, Yamamoto T, Nishioka K. Increased expression of TGF- β 1 in the sclerotic skin in bleomycin-'susceptible' mouse strains. *J Med Dent Sci* 2004;51:7–17.
- Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Ltd; 1959.
- Sabir N, Pakdemirli E, Sermez Y, Zencir M, Kazil S. Sonographic assessment of changes in thickness of different abdominal fat layers in response to diet in obese women. *J Clin Ultrasound* 2003;31:26–30.
- Seidenari S, Zanella C, Pepe P. Echographic evaluation of sodium lauryl sulfate (SLS)-induced irritation in mice. *Contact Dermatitis* 1994;30:41–42.
- Steen VD, Medsger TA Jr. Improvement in skin thickening in systemic sclerosis associated with improved survival. *Arthritis Rheum* 2001;44:2828–2835.
- Tedstone JL, Richards SM, Garman RD, Ruzek MC. Ultrasound imaging accurately detects skin thickening in a mouse scleroderma model. *Ultrasound Med Biol* 2008;34:1239–1247.
- Wells DJ. Animal welfare and the 3Rs in European biomedical research. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1245:14–16.
- Wilkinson MJ, McEwan NA. Use of ultrasound in the measurement of subcutaneous fat and prediction of total body fat in dogs. *J Nutr* 1991;121(11 Suppl):S47–S50.
- Wortsman X, Wortsman J, Szanic I, Carreño L. Activity assessment in morphea using color Doppler ultrasound. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:942–948.
- Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol* 2010;37:26–41.
- Yamamoto T, Kuroda M, Takagawa S, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000;292:535–541.

III. Article 3 : Le blocage d'OX40L protège de la fibrose inflammatoire

OX40L BLOCKADE PROTECTS AGAINST INFLAMMATION-DRIVEN FIBROSIS

Muriel Elhai, Jérôme Avouac, Nadira Ruzehaji, Olivia Amiar, Barbara Ruiz, Hassina Brahiti, Matthieu Ponsoye, Maxime Frechet, Anne Cauvet-Burgevin, Sonia Pezet, Jérémy Sadoine, Thomas Guilbert, Hisaya Akiba, Vigo Heissmeyer, Arun Subramaniam, Robert Resnick, André Kahan, Gilles Chiocchia, Yannick Allanore.

Soumis à Journal of Clinical Investigation

Comme vu précédemment, OX40-OX40L apparaît comme une cible pertinente dans la ScS, en particulier OX40L qui semble promouvoir le signal inflammatoire et auto-immun (402,414). Nous avons donc cherché à déterminer la contribution fonctionnelle d'OX40L au phénotype clinique de la ScS.

L'observation d'une surexpression de la protéine OX40L dans le derme des patients ScS, en comparaison à des sujets contrôles, en particulier dans les formes cutanées diffuses, a conforté l'idée qu'OX40L pourrait être impliqué dans le phénotype de la ScS. OX40L était exprimé, comme attendu, par les cellules inflammatoires (lymphocytes T et B) et les cellules endothéliales. En revanche, il a été observé pour la première fois une expression d'OX40L par les cellules mésenchymateuses dans la peau lésionnelle de patients ScS.

Nous avons ensuite évalué l'effet d'une invalidation d'OX40L *in vivo* dans un modèle de fibrose dermique inflammatoire, le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine : les souris invalidées pour OX40L (ox40l^{-/-}) étaient fortement protégées de la fibrose avec une diminution de l'épaisseur dermique (p=0,027), du contenu en collagène (p=0,034) et du nombre de myofibroblastes (p=0,044) de la peau lésionnelle suite aux injections de bléomycine. Cette protection du phénotype fibrosant s'accompagnait d'une diminution de l'infiltrat inflammatoire lymphocytaire T (p=0,029), B (p=0,016) et macrophagique (p=0,0291) et du relargage de cytokines pro-fibrotiques (IL-6 et TNF- α). Les voies de signalisation pro-fibrotiques inhibées par l'invalidation d'OX40L étaient les voies d'inhibition des métalloprotéases matricielles ainsi que les voies de signalisation NF κ B et AP-1. Le rôle de NF κ B et des métalloprotéases matricielles est bien connu dans la fibrose. Nous nous sommes donc intéressés à la voie de signalisation AP-1. Cette voie est surexprimée dans la peau et les fibroblastes de patients ScS et semble favoriser la synthèse de collagène par les

fibroblastes (480). De plus, l'inhibition de cette voie a prévenu le développement de la fibrose dermique *in vivo* dans un modèle murin de la maladie.

Nous avons observé une surexpression des protéines c-fos et c-jun, constituant AP-1, chez les souris ox40l^{+/+} par rapport aux souris ox40l^{-/-} après traitement par bléomycine. C-fos était exprimé par les lymphocytes T et les myofibroblastes, ce qui suggère qu'OX40L peut réguler l'infiltrat inflammatoire et l'activation des fibroblastes par une voie de signalisation dépendante d'AP-1 dans ce modèle de fibrose dermique inflammatoire.

Dans la perspective de transposer ces résultats à la recherche clinique, nous avons ensuite évalué l'effet d'un anticorps monoclonal neutralisant anti-OX40L dans ce modèle. Cet anticorps avait déjà montré son efficacité dans d'autres modèles murins de maladies auto-immunes (416,436,440,458,481). Les souris traitées par l'anticorps ont été protégées de la fibrose dermique induite par la bléomycine avec une diminution significative de l'épaisseur dermique ($p=0,002$), du contenu en hydroxyproline ($p=0,026$) et du nombre de myofibroblastes ($p=0,009$). Par ailleurs, la tolérance a été satisfaisante avec l'absence de souffrance des animaux et un poids conservé.

Mais, la situation en pratique clinique est le plus souvent celle de patients se présentant avec une fibrose établie; ainsi, un potentiel traitement de la ScS doit permettre non seulement de prévenir la fibrose, mais aussi de guérir une fibrose établie. C'est pourquoi, nous avons évalué l'intérêt de l'anticorps dans un modèle modifié de fibrose dermique induite par la bléomycine: le modèle de fibrose établie où les injections d'anticorps sont débutées après induction de la fibrose, soit après 3 semaines d'injections intra-dermiques de bléomycine, comme précédemment décrit dans l'article de revue (149). Dans ce modèle, un traitement par l'anticorps anti-OX40L a non seulement prévenu l'aggravation de la fibrose, mais a aussi permis d'induire la régression d'une fibrose établie: l'épaisseur dermique a diminué de 26% ($p=0,002$), le contenu en collagène de 22% ($p=0,020$) et le nombre de myofibroblastes de 42% ($p=0,027$).

Pour mieux préciser le rôle d'OX40L dans le remodelage de la matrice extracellulaire, le modèle murin de cicatrisation cutanée après excision de peau a été utilisé. Les résultats obtenus ont confirmé le rôle d'OX40L dans la phase inflammatoire du remodelage matriciel avec un défaut de cicatrisation sept jours après l'excision cutanée chez les souris ox40l^{-/-} et chez les souris traitées par l'anticorps anti-OX40L à forte dose, sans différence à la phase tardive non inflammatoire de la cicatrisation.

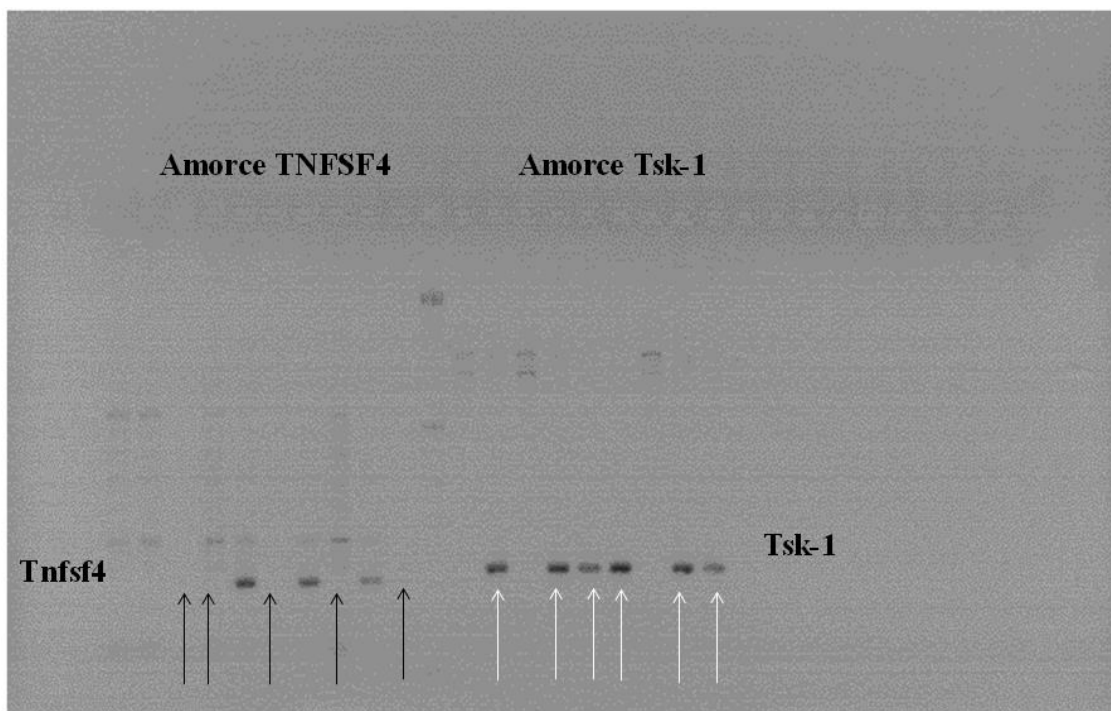
Afin d'évaluer l'effet d'OX40L dans la fibrose dermique non inflammatoire, un modèle murin complémentaire a été utilisé: le modèle génétique tight-skin 1 (tsk-1) (482).

Ce modèle est caractérisé par une fibrose hypodermique prédominante. Les fibroblastes issus de la peau de souris *tsk-1* présentent un état activé, pro-fibrotique qui persiste après plusieurs passages *in vitro* (483).

Nous avons croisé des souris *tsk1*^{+/pa} *ox40l*^{+/+} avec des souris *pa/pa* *ox40l*^{-/-} pour obtenir (après 2 croisements successifs) des souris *tsk1*^{+/pa} *ox40l*^{-/-}. Au total, 4 souris *tsk-1/ox40l*^{-/-} et 5 souris *tsk-1/ox40l*^{+/+} ont été générées (Figure 26). A 10 semaines, les souris ont été sacrifiées pour analyse histologique. Le phénotype fibrotique attendu des souris *tsk-1* était bien observé avec une augmentation significative de l'épaisseur hypodermique et du contenu en hydroxyproline, par rapport aux souris contrôles *pa/pa*. Une tendance non significative à la diminution de l'épaisseur hypodermique ($p=0,6857$) et de la concentration en hydroxyproline ($p=0,286$) a été observée chez les souris *tsk-1* invalidées pour OX40L en comparaison aux souris *tsk-1* exprimant OX40L (Figure 27).

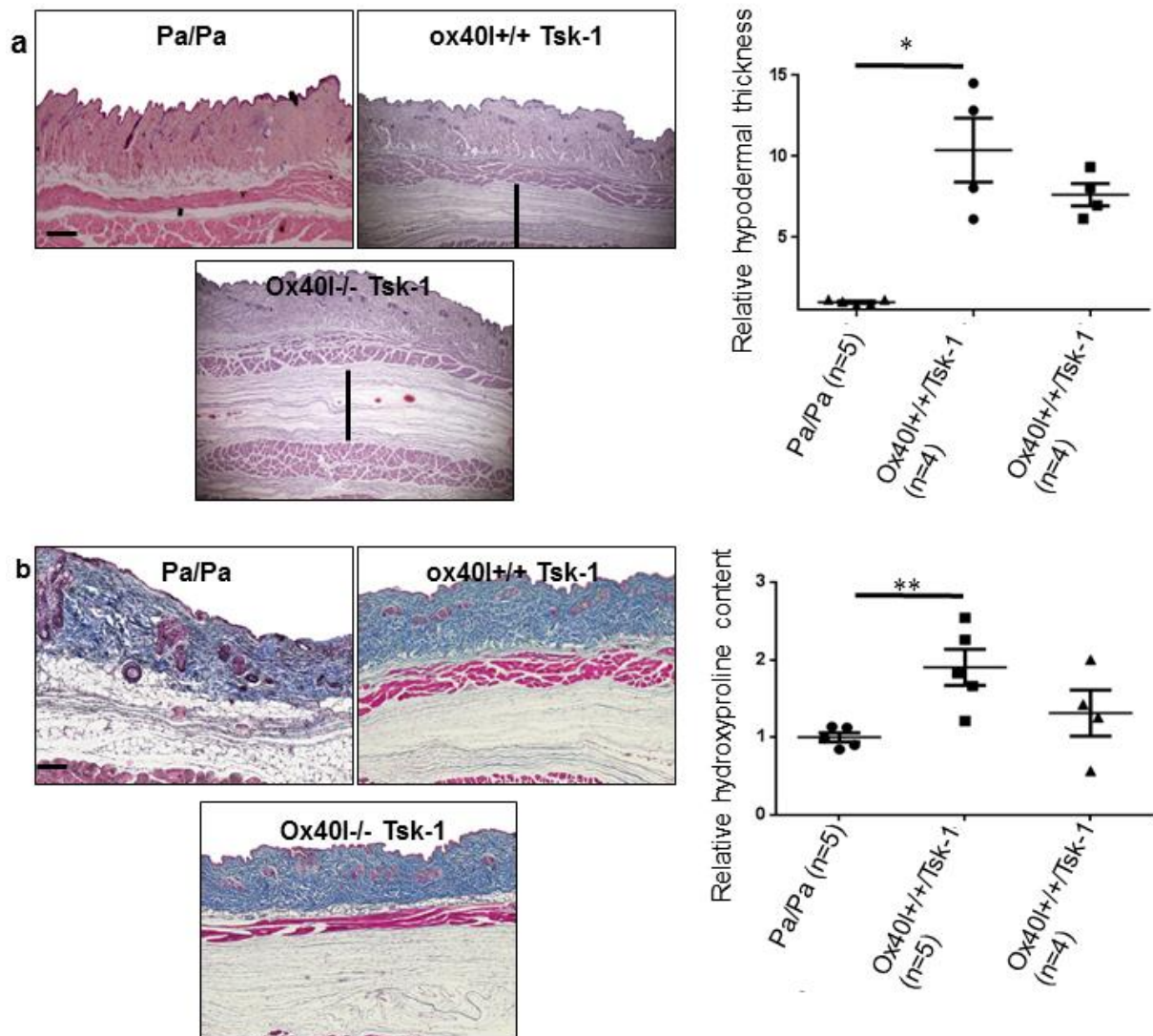
Compte-tenu de ces résultats douteux, une approche complémentaire a consisté à traiter les souris *tsk-1* par l'anticorps anti-OX40L ($n=5$) ou par l'anticorps contrôle ($n=4$). Les résultats ont confirmé l'absence d'effet de l'anticorps anti-OX40L avec l'absence de différence d'épaisseur hypodermique ou de contenu en hydroxyproline.

Figure 26 : Génotypage des souris *tsk-1*^{+/tnfsf4}^{-/-}



Est représenté le génotypage des souris pour la détection des souris *tsk-1*^{+/tnfsf4}^{-/-} après croisement de souris *tsk-1*^{+/tnfsf4}^{+/-} avec des souris *pa/pa* *tnfsf4*^{-/-}. Les puits dans lesquels ont été déposées les amorces de *Tnfsf4* et *Tsk-1* sont représentés ainsi que le profil de migration attendu des bandes (*tnfsf4* : bande de 204 paires de bases (pdb) ; *tsk* bande attendue entre 200 et 300 pdb). Les souris n'exprimant pas *tnfsf4* sont marquées par des flèches noires, celles exprimant *tsk-1* par des flèches blanches. Les souris invalidées pour *tnfsf4* et exprimant *tsk-1* sont les souris 2, 4, 6 et 8.

Figure 27 : Les souris invalidées pour OX40L ne sont pas protégées de la fibrose dans le modèle murin *tsk-1*.

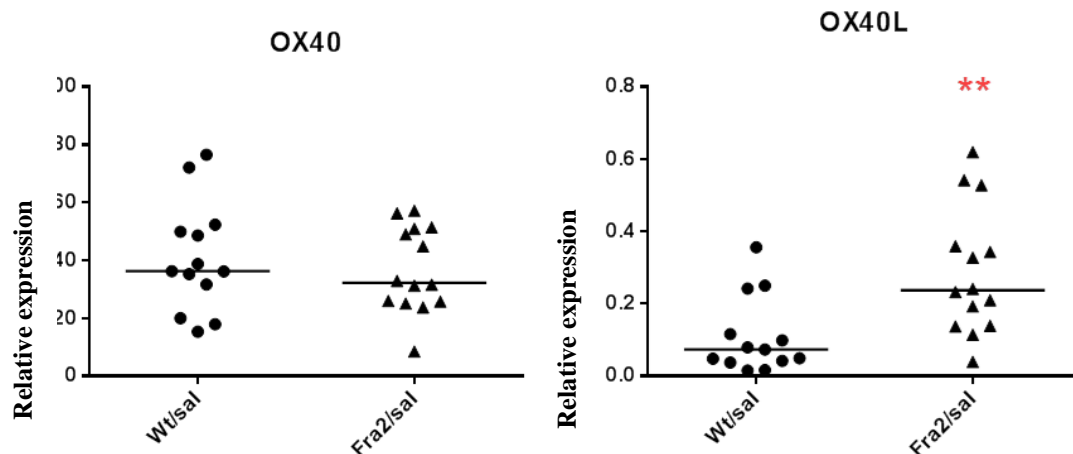


(A) Sections cutanées colorées à l'hématoxyline-éosine après grossissement au $\times 40$ de souris Pa/Pa contrôles ($n=5$), de souris *Tsk-1* exprimant OX40L (*ox40l+/+/tsk-1*) ($n=5$) et de souris *Tsk-1* invalidées pour OX40L (*ox40l-/-/tsk-1*) ($n=4$). (A-B) L'épaisseur hypodermique n'était pas significativement différente entre les souris *ox40l+/+/tsk-1* et *ox40l-/-/tsk-1*. (C) Le contenu en hydroxyproline n'était pas significativement différent entre les souris *ox40l+/+/tsk-1* et *ox40l-/-/tsk-1*. Les résultats sont représentés avec la moyenne \pm SEM. Les souris contrôles sont les souris pa/pa, dont les résultats sont définis comme égaux à 1; les résultats obtenus chez les souris sont normalisés par rapport à cette valeur.

Etant donné le rôle clé en clinique de l'atteinte d'organe, notre approche a été enrichie par l'utilisation de souris transgéniques fra-2, qui sont un nouveau modèle de ScS, caractérisées par une fibrose pulmonaire inflammatoire et une HTAP (176,177). De manière intéressante, nous avons observé une augmentation d'expression d'OX40 et OX40L par PCR quantitative

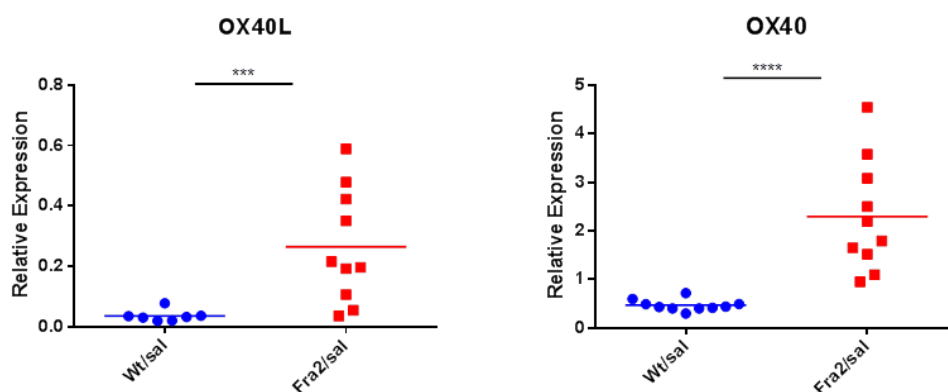
(Taqman) dans la peau et le poumon de nos souris fra-2, en comparaison à des souris wt (Figures 28 et 29).

Figure 28 : Expression par PCR quantitative d'OX40 et OX40L dans la peau de souris wild type (wt) et Fra2



*Il n'y a pas de différence d'expression d'OX40 entre les souris wild type (wt) (n=13) et les souris transgéniques pour fra-2 (n=14). En revanche, OX40L est surexprimé dans la peau des souris fra-2 par rapport aux souris wt. L'expression est représentée sous forme d'expression relative. La médiane est représentée. **: p<0,01*

Figure 29 : Expression par PCR quantitative d'OX40 et OX40L dans le poumon de souris wild type (Wt) et Fra-2



*OX40 et OX40L sont surexprimés dans le poumon des souris fra-2 (n=10) par rapport aux souris wt (n=10). L'expression est représentée sous forme d'expression relative. La médiane est représentée. ***: p<0,001; ****: p<0,0001*

L'évaluation pulmonaire par micro-scanner a montré que les souris fra-2 traitées par l'anticorps contrôle avaient avec une fibrose pulmonaire inflammatoire qui n'était pas présente chez les souris fra-2 traitées par l'anticorps anti-OX40L ou chez les souris contrôles ($p < 0,01$). Par ailleurs, la capacité pulmonaire fonctionnelle était abaissée chez les souris fra-2 traitées par l'anticorps contrôle en comparaison aux souris fra-2 traitées par l'anticorps anti-OX40L ($p < 0,001$) sans différence entre le groupe traité par l'anticorps anti-OX40L et le groupe wt.

L'histologie a mis en évidence un aspect de pneumopathie interstitielle non spécifique avec un infiltrat interstitiel inflammatoire prédominant, comme cela est observé au cours de la ScS. Le score de fibrose était plus important chez les souris fra-2 traitées par l'anticorps contrôle versus celles recevant l'anticorps anti-OX40L ($p = 0,032$) (484). La concordance entre les deux examinateurs pour la cotation de la fibrose était bonne avec un score kappa égal à 0,791, IC95% [0,688-0,894]. Le contenu en collagène était réduit de 23% chez les souris Fra-2 traitées par l'anticorps anti-OX40L ($p = 0,029$).

Par ailleurs, les souris fra-2 traitées par l'anticorps contrôle avaient des signes de vasculopathie avec une occlusion vasculaire présente chez 42,9% d'entre-elles versus 0% des souris WT ou des souris fra-2 traitées par l'anticorps anti-OX40L ($p = 0,02$). Cette HTAP était marquée par un infiltrat inflammatoire péri-vasculaire très important, comme cela est observé au cours de la ScS. Le marquage pour l' α -SMA a confirmé le remodelage vasculaire avec une occlusion ou une muscularisation de la paroi des vaisseaux chez 71% des souris fra-2 traitées par l'anticorps contrôle, tandis que ce n'était pas observé chez les souris fra-2 traitées par l'anticorps anti-OX40L ou chez les souris wt. Ce remodelage vasculaire chez les souris fra-2 traitées par l'anticorps contrôle a été conforté par les données de microscopie optique par génération de seconde harmonique avec une distribution préférentiellement périvasculaire des fibres de collagène.

Enfin, nous avons voulu évaluer l'intérêt du dosage sérique de la forme soluble d'Ox40L comme biomarqueur potentiel au cours de la ScS. Les données transversales des sérums collectés dans notre cohorte de patients ont confirmé son intérêt avec des taux augmentés chez les patients ScS ($n = 177$) en comparaison aux sujets contrôles sains ($n = 100$) ($p < 0,001$), en particulier dans les formes cutanées diffuses et les formes associées à une HTAP.

Les données longitudinales ont montré son intérêt comme biomarqueur pour identifier les patients à risque de progression sévère puisqu'un taux sérique élevé d'Ox40L soluble à l'inclusion était prédictif d'une aggravation de la fibrose dermique et pulmonaire au cours du suivi avec un risque multiplié respectivement par 8 et par 4 ($p < 0,0001$).

Nos résultats confirment la contribution d'OX40L au phénotype inflammatoire et vasculaire de la ScS et suggèrent que son blocage pourrait être un traitement potentiel de la ScS et peut-être d'autres maladies fibrosantes. Ce travail met en exergue la relation inflammation-fibrose dans la physiopathologie de la ScS.

OX40L blockade protects against inflammation-driven fibrosis.

Muriel Elhai*^{1,2}, Jérôme Avouac*^{1,2}, Nadira Ruzehaji¹, Olivia Amiar¹, Barbara Ruiz¹, Hassina Brahiti¹, Matthieu Ponsoye¹, Maxime Frechet¹, Anne Burgevin¹, Sonia Pezet¹, Jérémy Sadoine³, Thomas Guilbert¹, Hisaya Akiba⁴, Vigo Heissmeyer^{5,6}, Arun Subramaniam⁷, Robert Resnick⁷, André Kahan², Gilles Chiocchia⁸, Yannick Allanore^{1,2}.

* M Elhai and J Avouac have equally contributed to this work

1: INSERM U1016 UMR8104 Cochin Institute, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cite, Paris, France

2: Rheumatology A department, Paris Descartes University, Cochin Hospital, Paris, France

3: EA 2496 Pathologie, Imagerie et Biothérapies Orofaciales, UFR Odontologie, Université Paris Descartes and PIDV, PRES Sorbonne Paris Cité, Montrouge, France

4: Department of Immunology Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

5: Institute of Molecular Immunology, Research Unit Molecular Immune Regulation, Helmholtz Zentrum München, Marchioninistr. 25, Munich DE-81377, Germany

6: Institute for Immunology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Goethestrasse 31, Munich, DE-80336, Germany

7: Immune Mediated Diseases, Sanofi Genzyme, Framingham, USA

8: Inserm, U1173, UFR des Sciences de la Santé, Simone Veil, Université Versailles-Saint-Quentin, Saint-Quentin-En-Yvelines, France

Grant supports: INSERM, ATIP/AVENIR programme, Société Française de Rhumatologie, Fondation pour la recherche Médicale, Arthritis Foundation, Institut Servier, JSPS KAKENHI #26293087.

Disclosures:

M.E, N.R, O.A, B.R, H.B, M.P, M.F, A.B, S.P, J.S, T.G, H.A, V.H, A.K, G.C: no conflict of interest

A.S and R.R work for Sanofi

J.A: has/had consultancy relationship and/or has received research funding in relationship with the treatment of systemic sclerosis from Actelion, Bayer, BMS, Roche-Chugai, Pfizer, Sanofi.

Y.A: has/had consultancy relationship and/or has received research funding in relationship with the treatment of systemic sclerosis from Actelion, Bayer, Biogen Idec, Bristol-Myers Squibb, Genentech/ Roche, Inventiva, Medac, Pfizer, Sanofi/Genzyme, Servier and UCB.

Corresponding author and reprint requests:

Pr. Yannick Allanore

Cochin Institut, INSERM U1016 UMR 8104

Paris Descartes University, Rheumatology A department, Cochin Hospital

27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France

Tel: 33 1 58 41 25 63, Fax: 33 1 58 41 26 24

Email: yannick.allanore@cch.aphp.fr

Abstract word count: 194 words, Manuscript word count: 11374 words

ABSTRACT

Treating fibrosis represents a critical unmet need, since fibrosis is the leading cause of death in industrialized countries and there is no effective therapy to counteract the fibrotic process. The development of fibrosis relates to the interplay between vessel injury, immune cell activation and fibroblast stimulation, which can occur in various tissues. Immunotherapies have been a breakthrough in the treatment of immune diseases. The OX40-OX40L axis is emerging as a new potential target offering the advantage of a targeted approach on co-stimulatory signals with limited impact on the whole immune response. We report compelling evidence supporting that blockade of OX40L is a promising strategy for the treatment of inflammation-driven fibrosis using systemic sclerosis as a prototypic disease. OX40L blockade prevents inflammation-driven skin, lung and vessel fibrosis and induces the regression of established dermal fibrosis in different complementary mouse models. OX40L exerts potent pro-fibrotic effects by promoting the infiltration of inflammatory cells into lesional tissues and therefore the release of pro-inflammatory mediators, thereafter leading to fibroblast activation. We have identified soluble OX40L as a promising serum biomarker to predict the worsening of lung and skin fibrosis. OX40L appears as an attractive target in inflammation-driven fibrosis.

INTRODUCTION

Despite contributing to as much as 45% of deaths in the industrialized countries, little progress has been made in deciphering fibrotic diseases until now (1). Nonetheless, it has been demonstrated that pulmonary, renal, hepatic and even dermal fibrosis share common pathways, which drive the pathologic events. Fibrosis occurs as a result of sustained injury to the epithelium, which causes the overproduction of cytokines and growth factors. These latter promote the recruitment and differentiation of mesenchymal cell precursors into myofibroblasts, which produce high amounts of collagen and other extracellular matrix proteins. Under normal conditions, at the end of the repair, the myofibroblasts undergo apoptosis and the fibrosis resolves restoring normal tissue. In fibrotic diseases, the normal repair and resolution processes are disrupted and the fibrotic reaction persists, leading to scarring and progressive impaired organ function.

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune T cell disease, which is defined by scleroderma, i.e. pathological fibrosis of the skin, but also of internal organs such as lungs (2). Therefore, SSc is considered as a prototype entity for fibrotic diseases to study the pathogenesis of fibrosis and particularly the links between inflammation/auto-immunity and fibrosis.

Immunotherapies have been a breakthrough in several autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, but are associated with an increased risk of infections (3). An emerging therapeutic approach for T-cell-mediated diseases is to target the antigen-specific T cells involved in the disease, without leading to generalized immunosuppression (4). The OX40-OX40 ligand (OX40L) pair, which is involved in late T-cell co-stimulatory signal and transiently expressed following antigen recognition, fits with these criteria (5, 6).

It has been demonstrated in several animal models of autoimmune and inflammatory diseases, that blocking OX40-OX40L was effective in reducing clinical symptoms (4, 7–17). In fibrotic conditions such as scleroderma, this therapeutic approach has not been evaluated yet. Genetic

data have shown that *TNFSF4*, which encodes for OX40L, is a SSc susceptibility gene, suggesting a potential role of this pathway in this disease, although the functional effects of the variants are not known (18–20). In addition, preliminary results have shown that serum soluble OX40 levels were significantly increased in SSc patients as compared to healthy individuals (21).

OX40L blockade was shown to be more effective than OX40 blockade in reducing autoimmunity in the murine model of collagen-induced arthritis (22). Therefore, we chose to target OX40L in complementary experimental mouse models. Using both gene inactivation strategy and targeted molecular approach, we herein demonstrate that blocking OX40L prevents from inflammation-driven dermal fibrosis, fibrosing alveolitis and lung vessel remodeling, supporting that anti-OX40L antibody is a promising strategy for the treatment of inflammatory stages of fibrotic diseases. In addition, we show that soluble OX40L may be a reliable biomarker for prediction of skin and lung fibrosis worsening.

RESULTS

OX40L is overexpressed in the skin of SSc-patients

To determine whether targeting OX40L-OX40 axis in SSc may be relevant, we investigated OX40L expression in lesional skin taken from SSc patients. OX40L protein expression was detectable *ex vivo* by immunohistochemistry in the skin of the 8 SSc-patients and the 5 age-matched healthy individuals recruited. However, the intensity of immunostaining for OX40L was 3.6 fold higher in the lesional skin of SSc-patients compared to controls ($p=0.003$). Among SSc-patients, a 1.9-fold increased OX40L expression was observed in patients with the diffuse cutaneous subset compared to patients with the limited cutaneous subtype ($p=0.036$) (Fig. 1, c-d).

Positive staining for OX40L was mostly detected in the germinal layer of epidermis as well as in several cell lines in the dermis (Fig. 1, a-b). As expected, we identified OX40L expression in CD3 and CD22 positive cells (Fig. 2, a-b), confirming the known expression of OX40L by B and T cells (6). As previously reported in the literature, OX40L was also expressed by endothelial cells (Fig. 1b) (6). Of the most interest, intensive staining for OX40L was also observed in CD90 positive as well as α smooth muscle actin (α -SMA) positive cells in the skin of SSc-patients (Fig. 2, c and d), suggesting that OX40L is expressed by fibroblasts and myofibroblasts in fibrotic skin. In addition, *in vitro* experiments further supported the expression of OX40L by primary human dermal fibroblasts from both SSc-patients and healthy control subjects (Fig. 2, e).

OX40L deficient mice are protected from bleomycin-induced dermal fibrosis

To study OX40L-OX40 axis in the development of inflammation-driven dermal fibrosis, we evaluated the outcome of mice lacking OX40L (*ox40l*^{-/-}) in the model of bleomycin-induced dermal fibrosis (23–25). Skin architecture did not differ between *ox40l*^{+/+} and *ox40l*^{-/-} mice. However, *ox40l*^{-/-} mice were markedly protected from bleomycin-induced fibrosis: the mean

\pm SEM increase in dermal thickness was $24 \pm 6\%$ in *ox40l^{+/+}* mice, as compared with $6 \pm 7\%$ in *ox40l^{-/-}* mice ($p=0.027$). Thus, dermal thickening upon bleomycin challenge was reduced by $13 \pm 7\%$ in *ox40l^{-/-}* mice compared to *ox40l^{+/+}* mice ($p=0.027$) (Fig.3, a). Consistent with decreased dermal thickening, reduced accumulation of collagen upon bleomycin challenge was observed on trichrome stained skin sections of *ox40l^{-/-}* mice. In addition, the hydroxyproline content in lesional skin of *ox40l^{-/-}* mice was significantly lower than in the skin of *ox40l^{+/+}* mice, with a decrease of $19 \pm 8\%$ ($p=0.034$) (Fig.3, b). The number of myofibroblasts upon challenge with bleomycin was also significantly reduced by $57 \pm 32\%$ ($p=0.044$) in *ox40l^{-/-}* mice as compared to *ox40l^{+/+}* mice (Fig.3, c).

OX40L invalidation reduces T cell, B cell and macrophage infiltration in lesional skin of mice challenged with bleomycin

To analyze whether OX40L influences the outcome of bleomycin-induced fibrosis by regulating inflammatory infiltrates, we next counted the number of T cells, B cells and macrophages in lesional skin. T cell counts detected by immunohistochemistry for CD3 were reduced in lesional skin by $64 \pm 8\%$ in *ox40l^{-/-}* mice as compared to *ox40l^{+/+}* mice treated with bleomycin ($p=0.029$) (Fig. 4, a). Upon bleomycin challenge, a significant decrease of CD22 B cells and CD68 macrophages cells was observed in *ox40l^{-/-}* mice compared to control mice ($71 \pm 9\%$, $p=0.016$ and $74 \pm 3\%$, $p=0.029$ respectively) (Fig. 4, b and c).

OX40L invalidation reduces levels of proinflammatory cytokines in the lesional skin of mice challenged with bleomycin

To further characterize the mechanisms involved in protection from fibrosis following OX40L invalidation, the levels of different cytokines were determined in the lesional skin. Compared to *ox40l^{+/+}* mice subjected to bleomycin treatment, *ox40l^{-/-}* mice showed reduced levels of cytokines that have been implicated into inflammation and fibrosis such as interleukin (IL)-6 (reduction of $56 \pm 9\%$, $p=0.029$) and tumor necrosis factor- α (TNF α) (reduction of $66 \pm 2\%$,

p=0.016) in the lesional skin. Conversely, no difference in the levels of IL-4 and IL-10 was observed between ox40l^{-/-} and ox40l^{+/+} mice following bleomycin injections (Fig. 4, d), whereas there was a trend for decreased IL-17 and interferon- γ (IFN γ), but not reaching significance.

Invalidation of OX40L induces gene expression changes in the lesional skin of mice challenged with bleomycin

To identify downstream pathways affected by OX40L inhibition, we performed a microarray analysis comparing genes expression between ox40l^{+/+} and ox40l^{-/-} mice submitted to bleomycin injections. Ingenuity pathway analysis performed on a set of genes selected by a fold change ≥ 1.5 and a p-value <0.05 identified five top key cell functions and five canonical pathways (Table 1). Among these, inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) appeared as very relevant in the context of fibrosis (p=0.020) (Table 1). The main genes belonging to this pathway were MMP-28, thrombospondin-2 and tissue factor pathway inhibitor-2.

Another approach based on gene set enrichment analysis identified two downstream signaling pathways downregulated in OX40L deficient mice: nuclear factor-kappa B (NF- κ B), which is a central mediator of OX40 signals, and activator protein 1 (AP-1), which has been barely reported yet (Table 1).

OX40L regulates inflammatory and myofibroblast lesional skin infiltration through AP-1

We next aimed to determine whether OX40L inhibition leads to decreased AP-1 signaling. To this end, we performed immunohistochemistry and immunofluorescence staining for 2 well-known constituting AP-1 proteins (c-fos and c-jun) in lesional skin from ox40l^{+/+} and ox40l^{-/-} mice after bleomycin injections. Decreased expression of c-fos was observed in ox40l^{-/-} mice submitted to bleomycin injections (Fig. 5 a). c-fos was detected on T cells and myofibroblasts (Fig. 5 b and c). In addition, the number of c-fos expressing myofibroblasts

was significantly reduced in the lesional skin of ox40l^{-/-} mice challenged with bleomycin, compared to wild type mice ($p=0.0260$) (Fig. 5 d). Similar results were observed with c-jun (data not shown).

OX40L mAb protects from the development of bleomycin-induced fibrosis

Following the promising results of the gene inactivation strategy, we have developed a molecular targeted strategy based on the use of a neutralizing monoclonal antibody against murine OX40L. This monoclonal antibody has previously demonstrated its efficacy in other experimental models of autoimmune diseases (10, 11, 13, 26). No toxicity was observed upon 3 weeks of treatment with anti-OX40L antibody. Moreover, weight loss was $<10\%$ and no significant reduction of the food consumption of the mice was observed (data not shown). Treatment with anti-OX40L mAb significantly reduced dermal thickening by $31 \pm 6 \%$ ($p=0.002$) (Fig. 6, a). Consistent with these results, we observed a reduced accumulation of collagen upon bleomycin challenge on trichrome stained skin sections of mice treated with anti-OX40L mAb as compared to those receiving control IgG (Fig. 6, b). Similarly, in lesional skin, the hydroxyproline content and the number of myofibroblasts were also efficiently reduced upon inhibition of OX40L: the hydroxyproline content was decreased by $18 \pm 5 \%$ ($p=0.026$) (Fig. 6, b) and the number of myofibroblasts by $74 \pm 67 \%$ ($p=0.009$) (Fig. 6, c).

OX40L mAb induces the regression of established fibrosis in the modified bleomycin model

Although the prevention of fibrosis can be regarded as a key aim in the treatment of SSc, the clinical situation is most often characterized by patients who present with already established fibrosis. Therefore, we further addressed the antifibrotic effects of anti-OX40L mAb in a modified bleomycin model, i.e. a model of established fibrosis. After induction of the fibrosis, we observed that treatment with anti-OX40L mAb induced a regression of established fibrosis. Upon 6 weeks of bleomycin challenge, dermal thickness decreased by $26 \pm 3 \%$

($p=0.002$) in mice treated with anti-OX40L mAb for the last 3 weeks as compared to mice treated with control IgG (Fig.7, a). The collagen content was also reduced by $22 \pm 7 \%$ ($p=0.020$) and the number of myofibroblasts by $42 \pm 6 \%$ ($p=0.027$) (Fig.7, b and c).

Ox40L inhibition interferes with early inflammatory stages of wound healing

To further explore the role played by Ox40L in extracellular matrix remodeling, we used the murine model of excisional wound healing (27). After wounding, *ox40l^{-/-}* mice displayed an increase in wound area, wound diameter and wound gape at day 7, but without significant difference at day 14 (Fig. 8, a-e). Complete wound closure occurred at day 14 after wounding in both *ox40l^{+/+}* and *ox40l^{-/-}* mice. We also analyzed the effect of the anti-Ox40L mAb and different doses of treatment in this model. We observed a dose effect at day 7 (Fig. 8, f-i), but there was no significant difference at day 14 and complete wound closure occurred in both groups.

Ox40L mAb does not protect from non-inflammatory skin fibrosis in the tight skin 1 mouse model

Next, we aimed to determine whether Ox40L inhibition was efficient in an inflammation-independent model of skin fibrosis, the tight skin 1 (*tsk-1*) mouse model (28, 29). The *tsk-1* phenotype is caused by a dominant mutation in the fibrillin-1 gene (29). *Tsk-1* mice are characterized by accumulation of collagen fibers in the hypodermis. *Tsk-1* mice are a model for later, inflammation-independent, stages of scleroderma. To investigate the role of Ox40L in this model, *Tsk-1* mice were treated with anti-Ox40L mAb and were compared to *Tsk-1* mice treated with control mAb. We did not observe any difference for hypodermal thickening and collagen content in the skin of *Tsk-1* mice treated with anti-Ox40L mAb as compared to those treated with control mAb (Fig. 9, a and b).

Ox40L mAb protects from fibrosing alveolitis in the Fra-2 transgenic mouse model

Given that interstitial lung involvement and pulmonary arterial hypertension (PAH) are key prognostic factors in SSc (30), we aimed to assess the effects of OX40L pharmacological inhibition in a new model: the Fra-2 transgenic mice exhibiting these severe involvements (31, 32). Indeed, these mice are characterized by non-specific interstitial pneumonia associated with severe vascular remodeling of pulmonary arteries leading to PAH. Interestingly, Fra-2 transgenic mice displayed an increased expression of OX40 and OX40L, assessed by quantitative PCR (Taqman), in the skin and in the lungs as compared to control mice (data not shown). Treatment by anti-OX40L mAb was well tolerated with no weight loss (mean weight before sacrifice: 22.51 ± 1.05 in control mice, 22.37 ± 1.49 in Fra-2 mice treated with control antibody and 23.41 ± 1.19 in Fra-2 mice receiving anti-OX40L mAb). Clinical score of welfare was equal to 0 in all mice but two (two Fra-2 mice receiving respectively control antibody and anti-OX40L antibody with a score equal to 1/3). Fra-2 mice treated with control IgG had higher lung density (in Hounsfield Units (HU)) at micro-CT (computed tomography) analysis as compared to C57/BL6, consistent with fibrosing alveolitis (mean HU: -418.22 HU vs. -494.29 HU, $p=0.007$) (Fig. 10 a). Fra-2 mice treated with anti-OX40L mAb displayed significant decrease in lung density as compared to Fra-2 mice receiving control IgG (mean HU: -505.83 HU, $p=0.004$) without significant difference with control C57/BL6 mice (Fig. 10 c). Furthermore there was a loss of aerated lung volume in Fra-2 mice treated with control IgG, distinguishable from the normal lungs of control C57/BL6 mice, reflecting restrictive lung disease. Functional residual capacity (FRC) was significantly decreased in Fra-2 mice treated with control IgG, as compared to control C57/BL6 with a FRC/total lung volume equal to 44.7% versus 77.4% ($p<0.001$). Fra-2 mice receiving anti-OX40L mAb had higher residual capacity with a FRC/lung volume equal to 71.4% ($p<0.001$ as compared to Fra-2 mice treated with control IgG), which was not significantly different from control C57/BL6 mice (Fig. 10. b and d).

Lung specimens from Fra-2 mice treated with control IgG exhibited SSc-like features of non-specific interstitial pneumonia with large patchy areas of lung parenchyma characterized by both diffuse cellular inflammation and collagen deposition (33). Lung fibrosis histological score was significantly higher in Fra-2 mice treated with control IgG, as compared to those receiving anti-OX40L mAb (mean score: 4.69 versus 2.69; $p=0.032$) (Fig. 11 a and b). Lung fibrosis score was moderately correlated with density lung score ($\rho: 0.470$, 95% CI: [0.0913-0.729]; $p=0.018$) and highly correlated with FRC/lung volume ($\rho: -0.846$, 95% CI: [-0.930 -0.677]; $p<0.001$). Consistent with CT and histological analysis, hydroxyproline content was reduced by 23 ± 9 % in Fra-2 mice treated with anti-OX40L mAb ($p=0.029$) (Fig. 11 c). Second harmonic generation showed a preferential perivascular distribution of fibrosis, which was consistent with fibrosing alveolitis (Fig. 11 d). Scoring of fibrillar collagen deposits confirmed an increase in collagen scoring in Fra-2 mice receiving control IgG, as compared to control mice and Fra-2 mice treated with anti-OX40L mAb ($p=0.0002$ and $p=0.0093$, respectively) (Fig. 11 e).

OX40L mAb protects from pulmonary arterial hypertension (PAH) in the Fra-2 transgenic mouse model

We next aimed to determine the effects of anti-OX40L mAb to prevent the development of PAH in Fra-2 tg mice (30, 31). Typical histological features of these mice consist on intimal thickening, medial hypertrophy, perivascular infiltrates and adventitial fibrosis (31). Increase in wall thickness and occlusion of pulmonary arteries, associated with massive perivascular inflammatory infiltrates, resembling SSc-associated PAH, were more frequently detected in Fra-2 tg mice treated with control antibody as compared with wildtype (wt) mice or Fra-2 mice receiving anti-OX40L antibody (Fig. 12 a). Obliterated vessels were undetectable in wt mice and Fra-2 mice treated with anti-OX40L (0%) whereas the percentage of obliterated vessels was increased to 42.9 % in Fra-2 tg mice receiving control antibody ($p=0.02$).

Consistently, Fra-2 transgenic mice treated with control IgG exhibited increased muscularization in vessel walls of small pulmonary arteries with higher frequencies of completed muscularized or occluded vessels (5/7; 71.4%) as compared to control C57/BL6 mice (0/10; $p=0.003$) and Fra-2 mice treated with anti-OX40L mAb (0/8; $p=0.007$) (Fig. 12 b). We next assessed the role of endothelial to mesenchymal transition in development of PAH in Fra-2 mice by costaining for α -SMA and CD31 and did not observe co-expression of both markers in vessel wall, suggesting that PAH in this model was rather explained by differentiation of resident fibroblasts into myofibroblasts than endothelial to mesenchymal transition (Fig. 12 c). This proliferation was decreased in Fra-2 mice treated with anti-OX40L antibody.

Soluble OX40L as a new biomarker of fibrosis: clinical implications for human disease

To investigate the relevance of soluble OX40L as a biomarker of fibrosis in SSc, we measured OX40L serum concentrations. Soluble OX40 levels, measured by ELISA were significantly higher in SSc-patients ($n=177$) than in healthy controls ($n=100$) in a cross-sectional analysis (Fig. 13). SSc-patients stratification showed that OX40L serum levels were increased in patients having the diffuse cutaneous subset as compared to those with the limited one (Fig. 13, a). Looking at the predictive value of OX40L concentrations, longitudinal analyses of our cohort of SSc-patients showed that high level of serum OX40L at baseline (defined by a level higher or equal to 95% percentile of healthy patients, i.e. 8.4370 ng/ml) was highly predictive of worsening of dermal fibrosis during the follow-up (HR (Hazard ratio): 8.28, 95% CI (confidence interval) [2.11-32.5]; $p<0.0001$) (Fig. 13, b). Regarding interstitial lung disease, there was no association between presence of fibrosing alveolitis in SSc-patients ($n=133$) and serum levels of OX40L. However, the longitudinal study showed that a high level of serum OX40L at baseline was predictive of pulmonary worsening (defined by appearance of fibrosing alveolitis on high resolution CT or a decrease

in forced vital capacity of at least 10% during follow-up) (HR: 4.2994, 95% CI :1.5173 - 12.1827, P<0.0001) (Fig. 13 c).

PAH-SSc patients had higher levels of serum OX40L at baseline (n=8; mean (\pm SD): 6.74 (\pm 3.31)) than patients without (n=169; mean (\pm SD): 4.99 (\pm 3.29)) (Fig. 13 d). The follow-up showed that patients with elevated serum OX40L at baseline had a trend for developing PAH de novo more frequently than patients with low serum OX40L at baseline (HR: 3.64, 95% CI [0.32-41.02]; p=0.13), which did not reach statistical significance (data not shown).

DISCUSSION

Our study provides the first evidence that OX40L, a costimulatory molecule required for full activation of T cells, is implicated in the development of inflammation-driven skin, lung and vessel fibrosis.

SSc is the ideal disease to study the events that preclude the onset of fibrosis since both the immune component and typical fibrotic events coincide in this condition. We identified increased OX40L expression in the lesional skin of SSc-patients, with prominence in SSc patients with the diffuse cutaneous subset. This is of importance since diffuse SSc is defined by the highest extent of skin fibrosis and because this subset carries high morbidity and mortality (34). In addition to the expected expression of OX40L in perivascular T and B cells (6), we observed an expression not previously reported of OX40L by activated dermal fibroblasts, which suggests that mesenchymal cells can be directly activated by OX40/OX40L pathway, thus promoting collagen synthesis and fibrosis. Next, we showed that OX40L inhibition, through complementary gene inactivation and targeted molecular strategies, prevented and even induced the regression of bleomycin-induced dermal fibrosis. This widely used model mimics early and inflammatory stages of SSc. It is characterized by dense inflammatory infiltrates in lesional skin, which contribute to the activation of resident fibroblasts by the release of profibrotic mediators. OX40L blocking exerted antifibrotic-effects in this model by decreasing the infiltration of T cells into lesional skin. This is in line with the data already reported in other preclinical models of autoimmune disorders, in which the protection from the disease obtained with OX40L inhibition was related to the reduction of T-cell accumulation in the lesional tissue (4, 5, 8, 12, 35). Consistent with increased OX40L expression on B cell and monocyte/macrophage populations reported in patients with systemic lupus, sepsis and chronic hepatitis (36), we also observed a marked reduction of B cell and macrophage infiltrates in *ox40l*^{-/-} mice upon bleomycin injections.

Our data support that OX40L regulates the cytokine balance toward a proinflammatory and profibrotic profile. Indeed, lower levels of TNF- α and IL-6 were found in OX40L deficient mice subjected to bleomycin injections. These cytokines have been implicated in the activation of fibroblasts, collagen synthesis and subsequent fibrosis (37–40). This finding is consistent with the previous description of enhanced production of TNF- α and IL-6, through OX40/OX40L interaction (41). Reduced IL-6 release after OX40L invalidation has also been described in the murine model of encephalomyelitis (12).

NF- κ B is one of the central mediators of OX40 signaling (42). This is in agreement with our microarray analysis, which revealed reduced NF- κ B signaling in the lesional skin of ox40l^{-/-} mice upon bleomycin treatment. We also identified AP-1 as a downstream signaling pathway of OX40L in the lesional skin of ox40l^{-/-} mice. This finding has been scarcely reported yet, but is consistent with the upregulation of c-jun and c-fos mRNA observed in activated endothelial cells after binding OX40L (43). Interestingly, AP-1 is implicated both in inflammatory response and fibrosis. AP-1 is upregulated in a TGF- β -dependent manner in SSc and pharmacological inhibition of AP-1 prevents the pathological activation of dermal fibroblasts and the development of experimental dermal fibrosis (44). The reduced expression of c-jun and c-fos observed on T cells and fibroblasts from ox40l^{-/-} mice upon bleomycin challenge suggests that OX40L may regulate inflammation and fibroblast activation through AP-1 signaling in inflammation-driven skin fibrosis.

The results obtained in the bleomycin model were in line with the findings observed in the cutaneous wound-healing model. We showed that OX40L inhibition was associated with delayed healing at day 7, suggesting that OX40 interferes only with the early inflammatory phases of wound repair, which are an essential prerequisite for scarring (45, 46). This result further supports that OX40L regulates inflammation-dependent extracellular matrix remodeling. Blocking OX40L with a specific mAb did not display antifibrotic properties in

the Tsk-1 mouse model, characterized by endogenous activation of fibroblasts independent from inflammation, supporting that inflammatory environment is required for OX40L to exert profibrotic effects.

In addition to skin fibrosis, our results highlight the substantial interest of blocking OX40L to prevent severe organ damages characterizing SSc. Treatment with OX40L mAb markedly prevented fibrosing alveolitis in the Fra-2 transgenic mouse model, by reducing inflammatory infiltrates, which are prominent features of this mouse model. Consistently, OX40L transgenic mice spontaneously develop interstitial pneumonia with inflammatory cells in the alveolar septa of lung sections, accompanied by significant production of anti-DNA antibody (14). This result is of particular importance since fibrosing alveolitis is the leading cause of death in SSc and no efficient therapy is yet available to treat this devastating condition (30, 47). Furthermore, Fra-2 transgenic mice receiving anti-OX40L antibody had reduced perivascular inflammatory infiltrates and were protected against vessel remodeling leading to PAH, the most extreme vascular phenotype of SSc (31, 32). Consistently, OX40L transgenic mice spontaneously develop severe PAH associated with massive lymphocytic perivascular infiltration (48). Thus, OX40L inhibition may have the potential to address several aspects of SSc-PAH pathology, which are not covered by current therapies, which mostly act through vasoconstriction relief. However, fighting inflammation is a very appealing complementary strategy since both endothelial dysfunction and inflammation are intertwined with the initiation and progression of PAH.

In idiopathic PAH, proliferative vasculopathy results both from endothelial to mesenchymal transition and from differentiation of resident fibroblasts into myofibroblasts. Our results suggest that the second mechanism is prominent in Fra-2 transgenic mice and, of the most interest, this proliferation was decreased in mice treated with anti-OX40L antibody.

In OX40L transgenic mice, an increase in IL-13 and IL-17 and a decrease in regulatory T

cells was noticed (48). IL-13 and regulatory cells were not studied in our work, but we observed no effect of OX40L blockade on Th2 cytokines unlike previous reports (14, 49). We observed a trend for a decrease in IL-17 in ox40l^{-/-} mice submitted to bleomycin injections, but it did not reach significance, maybe because the increase after bleomycin injections in ox40l^{+/+} mice was too low.

Taken together, our results may have direct implications, since a human monoclonal anti-OX40L antibody is available and preliminary phase-2 data reported that it was well tolerated in patients with mild allergic asthma (50).

Fibrosis is the final common pathway hallmarking SSc and many more diseases. Therefore, it is conceivable that blocking OX40L appears as a promising treatment of SSc and numerous fibrotic disorders. In addition, anti-OX40L antibody offers the putative advantage of selectively targeting pathogenic T cells without causing generalized immunosuppression, which might less expose patients to increased risk of infections unlike other conventional immunosuppressive drugs (5, 6, 22, 51, 52).

Besides the lack of effective therapy, the other unmet clinical need in SSc and fibrotic disorders is the absence of reliable biomarker predicting disease progression. Soluble OX40L is a promising biomarker, since increased serum levels were detected in SSc patients and were predictive of the worsening of skin and lung fibrosis during follow-up.

METHODS

Patients and skin biopsies

OX40L was quantified by ELISA in the serum of 177 SSc-patients and 100 healthy age- and sex-matched volunteers using Human Soluble OX40L (sOX40L) ELISA kit (Cusabio, Wuhan, China). All patients fulfilled American College of Rheumatology criteria for scleroderma established in 1980 (53).

Among SSc-patients, 147 (83.1%) were female and 30 were men. The mean age (\pm SD) of SSc-patients was 56.9 ± 13.8 years. The mean disease duration was 9.8 ± 8.2 years. 70/171 (41%) patients had the diffuse cutaneous subset and 101 (59%) the limited form according to Leroy's criteria (54). Pulmonary hypertension was defined by pre-capillary pulmonary hypertension on right heart catheterization (resting mean pulmonary artery pressure ≥ 25 mmHg together with a pulmonary capillary wedge pressure of ≤ 15 mmHg) (55). Fibrosing alveolitis was searched by high resolution CT. Among these patients, 124 were followed-up for a mean 5.6 ± 2.9 years. A high level of serum OX40L at baseline was considered if serum OX40L was superior or equal to 95% percentile of healthy patients, i.e. 8.4370 ng/ml. Progression of dermal fibrosis was defined by worsening of Rodnan skin score $\geq 10\%$ and was observed in 14/103 (13.6%) SSc-patients during the follow-up (56). Worsening of fibrosing alveolitis was defined by new onset of lung fibrosis on high-resolution CT and/or deterioration of lung volume ($\geq 10\%$ of forced vital capacity) during the follow-up. Progression of fibrosing alveolitis was observed in 28/122 (22.9%) SSc-patients. Paraffin embedded sections of lesional skin biopsies were obtained from 8 SSc-patients (3 limited and 5 diffuse cutaneous forms) and 5 healthy age- and sex-matched healthy volunteers.

Fibroblasts culture

Fibroblasts cultures were obtained from biopsies in involved skin of SSc-patients and healthy volunteers. Mouse fibroblasts cultures were obtained from samples taken from the ears of

mice. Fibroblasts were prepared by outgrowth cultures. Fibroblasts from passages 2–3 were used for the experiments.

Bleomycin-induced dermal fibrosis in OX40L deficient mice

OX40L deficient mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice on a C57BL/6 littermates expressing OX40L (ox40l^{+/+}) were purchased from Janvier, (Le Genest-Saint-Isle, France). The animals were kept under standard laboratory conditions. Diet and water were provided ad libitum. Skin fibrosis was induced in 6-week-old male mice by local injections of bleomycin for 3 weeks; 100 μ l of bleomycin dissolved in 0.9% NaCl at a concentration of 0.5mg/ml were administered every other day by subcutaneous injections in defined areas of 1cm² at the upper back (57). Subcutaneous injections of 100 μ l 0.9% NaCl were used as controls. Four different groups, consisting of two groups with ox40l^{-/-} mice and ox40l^{+/+} were analyzed. One group of ox40l^{-/-} mice and one group of ox40l^{+/+} mice was challenged with bleomycin, whereas the remaining two groups were injected with NaCl. The four groups consisted of 30 mice in total. The evaluation parameters were validated parameters (44, 58). Mice were sacrificed by cervical dislocation after 3 weeks of treatment, and the injected skin was processed further for analysis.

Prevention and treatment of bleomycin-induced fibrosis with anti-OX40L monoclonal antibody (mAb)

Skin fibrosis was induced in 6-week-old, pathogen-free, male C57BL/6 mice (Janvier) by injection of bleomycin for 3 weeks, as previously described. Subcutaneous injections of 100 μ l 0.9% NaCl, the solvent for bleomycin, was used as controls.

One hybridoma producing a neutralizing mAb against mouse OX40L (RM134L, rat IgG2b) was used, as previously described (10, 11, 13, 59). This hybridoma was grown in RPMI 1640 with FCS; then, the supernatant was purified by protein G chromatography and quantified using spectrophotometry. The purity of the obtained antibody was assessed by polyacrylamide

gel electrophoresis. To investigate whether inhibition of OX40L exerts anti-fibrotic effects *in vivo*, one group of 7 mice was treated with anti-OX40L mAb (RM134L, rat IgG2b). In the preventive protocol, treated mice received intraperitoneal injections of 300 µg anti-OX40L mAb (RM134L, rat IgG2b) in 100 µL PBS three times per week, starting at the day before the injection of bleomycin, over a period of 3 weeks (weight of mice: 20-25 g). Two control groups of 7 mice each were used: one group treated with an equivalent amount of control rat IgG (Sigma, St. Louis, MO) and injected with bleomycin and one treated with control IgG (300 µg of antibody three times per week) and injected with NaCl. The three groups consisted of 21 mice in total. In the therapeutic protocol, we assessed the effects of OX40L inhibition in established dermal fibrosis. The injection schemes concerned 3 different groups of 8 mice each. Two groups of mice were challenged with bleomycin for 6 weeks and treated in parallel with intraperitoneal injection of 300µg anti-OX40L mAb or control IgG three times per week, starting after 3 weeks of treatment with bleomycin. The third group received bleomycin injections for 3 weeks followed by NaCl injections for the next 3 weeks to control for spontaneous regression of fibrosis. Mice were sacrificed by cervical dislocation after 6 weeks of treatment.

Evaluation of dermal thickness

The dermal thickness was analyzed at 100-fold magnification by measuring the distance between the epidermal-dermal junction and the dermal-subcutaneous fat junction at four sites on skin sections stained by hematoxylin eosin, as previously described (58, 60). Two independent examiners blinded to the treatment status performed the evaluation (MF and ME). All images were captured with a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Badhoevedorp, Netherlands) equipped with a DSP 3CCD camera (Sony, Tokyo, Japan).

Collagen measurements

The collagen content in lesional skin samples was explored by hydroxyproline assay, as

previously described (58, 60). Briefly, each sample was hydrolyzed and titrated to a pH of 7. This solution was combined with chloramine T and p-dimethylaminobenzaldehyde in perchloric acid and read at 557 nm with a spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). This experiment was performed for two samples per mouse analyzed.

For direct visualization of collagen fibers, trichrome staining was performed using the Masson's Trichrome Staining Kit (Sigma-Aldrich, Lyon, France).

Immunohistochemistry for α -smooth muscle actin (α -SMA), OX40L, c-fos, c-jun, CD3, CD22 and CD68.

Myofibroblasts were identified by staining for α -SMA, as previously described (58). Cells positive for α -SMA in mouse skin sections were detected by incubation with monoclonal anti- α -SMA antibody (clone 1A4; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at a dilution of 1:1,000 for 3 hours at room temperature. Polyclonal rabbit anti-mouse labeled with horseradish peroxidase (HRP) (Dako, Glostrup, Denmark) was used as secondary antibody for 1 hour at room temperature. The numbers of myofibroblasts was determined at 200-fold magnification in four different sections from each mouse by two blinded examiners (MF and ME).

To quantify the numbers of infiltrating T cells, B cells, macrophages and the expression of c-fos and c-jun, lesional skin sections from ox40l^{-/-} and ox40l^{+/+} mice were incubated with polyclonal rabbit anti-mouse antibodies for CD3 (dilution 1:50) or CD22 (dilution 1:100) or polyclonal mouse anti-mouse antibodies for CD68 (dilution 1:100) or c-fos (dilution 1:100) or monoclonal rabbit anti-mouse for c-jun (dilution 1:50) (Abcam, Cambridge, UK for all the antibodies) overnight à 4°C, after antigen retrieval, as previously described (58, 60). Polyclonal goat anti-rabbit or rabbit anti-mouse (Dako, Glostrup, Denmark) was used as secondary antibody (dilution 1:200). T cells, B cells and macrophages were counted in eight different sections of lesional skin of each mouse at 400-fold magnification. Counting was

performed in a blinded manner by two examiners (MF and ME).

The expression of OX40L in lesional skin from SSc-patients and controls was detected by staining overnight at 4°C with polyclonal rabbit anti-human OX40L antibody at a dilution of 1:100 (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Polyclonal goat anti-rabbit antibody (Dako, Glostrup, Denmark) was used as secondary antibody (dilution 1:200). The intensity of OX40L immunostaining was quantified with the image J software, as described in the following webpage (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/stained-sections/index.html>). All images were captured with a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Badhoevedorp, Netherlands) equipped with a DSP 3CCD camera (Sony, Tokyo, Japan) or with Lamina multilabel slide scanner (PerkinElmer's).

Immunofluorescence for OX40L, CD3, CD22, CD31, α -SMA, c-fos and CD90.

For costaining experiments, immunofluorescent staining was performed in lesional skin from SSc-patients. The protocol and antibodies were similar to immunohistochemistry protocol. Fibroblasts were identified by staining for polyclonal rabbit anti-human antibodies for CD90 (dilution 1:100) (Abcam, Cambridge, UK). Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse IgG and Alexa Fluor® 488 Goat Anti-rabbit antibodies (Life Technologies Saint Aubin, France) were used as secondary antibody for one hour at room temperature at a dilution of 1:200. Slides were then mounted coverslip with a drop of mounting medium and stored in the dark at +4°C until analysis. The expression of OX40L was also assessed on SSc-fibroblasts and healthy fibroblasts cultured *in vitro*. Nuclei were stained using DAPI.

For costaining between c-fos and respectively CD3 and α -SMA, as well as CD31 (dilution 1:100) (Abcam, Cambridge, UK) and α -SMA, the same protocol was performed. Alexa Fluor® 594 Goat Anti-rabbit IgG and Alexa Fluor® 488 Goat Anti-rabbit antibodies (Life Technologies Saint Aubin, France) were used as secondary antibody. All images were captured on a Zeiss Axio Observer Z1 microscope with a dry x 40 and a dry x 63 objectives

and CoolSNAP HQ2 CCD camera or with Lamina multilabel slide scanner (PerkinElmer's). The intensity of α -SMA positive cells expressing c-fos was quantified with the image J software.

Inflammatory cytokine measurement in lesional skin samples of bleomycin treated mice

Cytokine levels were measured in the skin of 16 ox40l^{-/-} and ox40l^{+/+} mice subjected to bleomycin or NaCl injections (4 per group), as previously described (58, 60). Briefly, mouse skin tissue lysate was prepared by homogenization in modified RIPA buffer with Precellys 24 tissue homogenizer/grinder (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Protein concentration was determined with the amidoblack method (61). Skin lysates were assayed for the following cytokines by multiplex bead array technology (BD biosciences, Le Pont de Claix, France): tumor necrosis factor- α (TNF α), Interleukin (IL)-6, interferon- γ (IFN- γ), IL-4, IL-10 and IL-17.

Murine model of excisional wound healing

Six animals per group were used (two wounds per animal or 12 wounds per group). Ox40l^{+/+} and ox40l^{-/-} mice were wounded in a first protocol. In a separate cohort, C57/BL6 wild type mice were injected intradermally around the wound margins with two different doses of anti-OX40L mAb: one group of 3 mice was treated with 300 μ g of anti-OX40L mAb at day 1, 2 and 3 after wounding, whereas the second group of 3 mice received 600 μ g. Control wounded groups of 3 mice each were treated with an equivalent dosage of IgG control antibodies. Wounds were induced as described previously (27). At the time of the procedure, anesthesia was induced by inhalation of isoflurane. Two 6 mm symmetrical wounds, one of each side of the midline, were created by excising the skin to the subcutaneous fascia below the panniculus carnosus on the prepped dorsal surface of the mouse. Temgesic (buprenorphine 0.05 mg/kg) was administered post-operatively to provide analgesia for up to 8 hours. Digital images of the wounds were taken at 0, 7 and 14 days post-surgery for analysis of change in wound size

by measuring wound area and wound diameter by two independent and blinded assessors. At various time points (i.e. 7 and 14 days post-wounding) the mice were euthanized. Mouse wounds were surgically excised to the fascia and fixed in 10% formalin for histological analysis. Histological wound measurements of wound gape were measured on sections stained by hematoxylin/eosin as previously described (27).

Effects of OX40L inhibition in the tight skin mouse model

To investigate the role of OX40L in a non-inflammatory complementary model of scleroderma, five tight skin 1 (Tsk-1) mice (purchased from The Jackson laboratory) were treated with 300µg anti-OX40L mAb and four Tsk-1 mice by control IgG three times per week intraperitoneally, starting at 5 weeks (before development of fibrosis). The last group consisted of 5 pa/pa (control) mice. Mice were sacrificed by cervical dislocation at the age of 10 weeks to analyze the hypodermal thickness and the hydroxyproline content in lesional skin. The hypodermal thickness was determined by measuring the thickness of the subcutaneous connective tissue beneath the panniculus carnosus at 4 different sites of the upper back in each mouse at 40-fold magnification. The measure was performed by two independent blinded investigators (M.P and M.E).

Transcriptomic approach

All 7 skin samples were defrosted, extracted, and hybridized at the same time. Affymetrix microarray technology was used to analyze gene expression levels

-extraction protocol: Total RNA were extracted from lesional skin sample of 3 ox40l^{+/+} and 4 ox40l^{-/-} mice treated with bleomycin with RNeasy Mini kit with DNase I digestion according to the manufacturer's instructions.

- transcriptomes preparation and data analysis:

Samples were carrying out according to good practice of Genom'IC facility (Institut Cochin). All microarray data and information have been submitted on GEO-NCBI site with the accession number GSE73705.

Data were RMA normalized with Bioconductor. We first controlled and analysed data in an unsupervised way by PCA and use ANOVA to extract DEGs with PartekGS©. Enrichment analysis were carried out through the use of IPA© and Pathway Studio©.

Prevention of fibrosing alveolitis and pulmonary arterial hypertension in the Fra-2 model

The Fra-2 (fos-related antigen-2) transgenic (tg) mouse model combines vasculopathy with fibrosing alveolitis (31). To further study severe complications of the disease and internal organ fibrosis, Fra-2 transgenic mice, which were obtained from a collaboration established with Sanofi Genzyme, were treated with anti-OX40L mAb (RM134L, rat IgG2b) beginning on week 13 of development. Littermate controls were also included in the study. The animals were kept under standard laboratory conditions. Diet and water were provided ad libitum. Animal welfare was assessed every 2 days and animals were weighed weekly. Two groups of 8 and 7 Fra-2 transgenic mice were treated respectively by anti-OX40L mAb or control rat IgG as previously described starting before appearance of fibrosing alveolitis and vasculopathy, i.e. when mice were 13 weeks old. Two control groups of 5 C57/BL6 were treated respectively by intraperitoneal injections of anti-OX40L mAb and control rat IgG. Since results were similar between the 2 control groups, i.e. C57/BL6 mice injected with anti-OX40L and control IgG, these groups were analyzed together. Mice were sacrificed by cervical dislocation at 17 weeks old.

Assessment of fibrosing alveolitis by micro computed tomography

Fibrosing alveolitis of mice was evaluated using micro-computed tomography (CT) two days before sacrifice. CT images were obtained with a Perkin Elmer's Quantum FX system (Caliper Life Sciences). The animals were placed in the supine position on the CT table.

Mice were sedated with 3-4% isoflurane anesthesia under 0.5-1.5 L/min for induction by a nose cone. Anesthesia was maintained with 2.5-3% isoflurane under 400-800 mL/min during the acquisition. During image acquisition thoracic breathing movements were recorded, detecting the up- and downward movement of the thorax. Images were acquired throughout the spontaneous respiratory cycle. Only images acquired during expiration were analyzed. Images were acquired with the following parameters: 90 kV X-ray source voltage, 160 μ A current. Total scanning time was approximately 4.5 minutes per mouse choosing in the list mode made by the constructor with the gating parameter. Tomograms were reconstructed using Rigaku Software. The analysis starts with the isolation of lung tissue by drawing a volume of interest manually. Analysis of lung density and drawing was performed with Ctan Brucker Software. Lung density was measured in Hounsfield Units after calibration. A phantom calibration was made on the acquisition Rigaku software: a water-filled 1.5 ml tube, inside of a 2 ml tube was scanned. Based on full stack histograms of a manually delimited volume-of-interest containing only water or air, the mean grayscale index of water was set at 0 HU, grayscale index of air was set at -1000 HU. This value was reported in the Ctan Brucker Software. Means of lung density of both groups were achieved by evaluation of all CT scans acquired from the apices to the bases of the lungs. Furthermore, the volume of functional lung parenchyma corresponding to functional residual capacity (FRC) was manually drawing, by excluding fibrosis area and vessels. Percentages of FRC on total lung volumes were calculated. The CT expert (J.S) was blinded to the background of mice, to the treatment and to the results of the histological assessment.

Histopathologic assessment of fibrosing alveolitis

Lung sections were stained with hematoxylin eosin. The severity of fibrosing alveolitis was semi-quantitatively assessed according to the method described by Ashcroft et al by 2 examiners blinded to the genotype and the treatment (O.A and M.E) (62). Lung fibrosis was graded on a scale of 0 to 8 by examining randomly chosen fields of the left upper lobe. The grading criteria were as follows: grade 0: normal lung; grade 1: minimal fibrous thickening of alveolar walls; grade 3: moderate thickening of walls without obvious damage; grade 5: increased fibrosis with definite damage and formation of fibrous bands; grade 7: severe distortion of structure and large fibrous areas; and grade 8: total fibrous obliteration. Grades 2, 4, and 6 were used as intermediate stages between these criteria. Hydroxyproline content in lung biopsies was assessed as previously described. All images were taken with Lamina multilabel slide scanner.

Nonlinear microscopy and second harmonic generation processing

Multiphoton inverted stand Leica SP5 microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) was used for tissue imaging. A Ti:Sapphire Chameleon Ultra (Coherent, Saclay, France) with a center wavelength at 810 nm was used as the laser source for generating second harmonic (SHG) and two-photon-excited fluorescence signals (TPEF). The laser beam was circularly polarized to ensure isotropic excitation of the sample regardless of the orientation of fibrillar collagen. A Leica Microsystems HCX IRAPO 25x/0.95 W objective was used to excite and collect SHG and TPEF. Signals were detected in epi-collection through a 405/15-nm and a 525/50 bandpass filters respectively, by NDD PMT detectors (Leica Microsystems) with a constant voltage supply, at constant laser excitation power, allowing direct comparison of SHG intensity values. Two fixed thresholds were chosen to distinguish biological material from the background signal (TPEF images) and specific collagen fibers (SHG images). SHG score was established by comparing the area occupied by the collagen

relative to the sample surface. Image processing and analysis (thresholding and SHG scoring) were performed using Image J homemade routines (<http://imagej.nih.gov/ij/>) as previously described (63). Results were normalized to control C57/BL6 mice.

Vessel remodeling

In each mouse, a total of 15 vessels accompanying either alveolar ducts or alveoli were examined by two observers (O.A and M.E) masked to the genotype and treatment. Each vessel was categorized as nonmuscular (no evidence of vessel wall muscularization), partially or completely muscular (smooth muscle cells identifiable in part or in the entire vessel circumference) or occluded. Muscularization was defined as the presence of typical smooth muscle cells stained with alpha-SMA. All images were taken with Lamina multilabel slide scanner.

Statistics

All data analyses were performed using Graph Pad. Data were expressed as dot blots with mean. Data were presented as mean (SEM) for continuous variables and numbers (percentages) for categorical variables. Data were statistically analyzed using Fischer tests for differences in frequency and the Mann-Whitney test for comparison between two continuous variables. To analyze whether serum OX40L was predictive of dermal, pulmonary or vascular worsening, a Cox proportional hazard model was performed and summarized as hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (CI). A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Correlation between lung fibrosis score and data obtained at micro-CT was assessed by calculating the Spearman's coefficient of rank correlation (ρ) and 95% CI.

Study approval: All patients and controls signed a consent form approved by the local institutional review boards. The local ethical committee approved all animal experiments (agreement N°CEEA34.JA.023.12).

Author contributions:

Designing research studies: M.E, J.A, N.R and Y.A

Conducting experiments: M.E, J.A, N.R, O.A, B.R, H.B, M.P, M.F, A.C and J.S

Acquiring data: M.E, J.A, N.R, O.A, B.R, H.B, M.P, M.F, A.C, S.P, J.S, T.G and R.R

Analyzing data: M.E, J.A, N.R, J.S, T.G, R.R, A.K, G.C and Y.A

Providing reagents: H.A, V.H, A.S and R.R

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published.

Acknowledgements: We thank Avigail Bismuth, Lucille Desallais, the Histology facility (Maryline Favier, and Corinne Lesaffre), the Cochin Imaging facility (B. Durel), the Immunology Flow Cytometry facility (Cybio platform) (M. Andrieu) and the Genomics platform (F. Letourneur, F. Dumont) of the Cochin Institute, Paris, France and Prof. Catherine Chaussain, Dental School University Paris Descartes, EA 2496, Montrouge, France for excellent technical assistance

REFERENCES

1. Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci. Transl. Med.* 2013;5(167):167sr1.
2. Varga J, Pasche B. Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2009;5(4):200–206.
3. Singh JA et al. Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* 2015;386(9990):258–265.
4. Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4(6):420–431.

5. Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol. Rev.* 2009;229(1):173–191.
6. Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, Sugamura K. OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv. Immunol.* 2010;105:63–98.
7. Imura A et al. The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1996;183(5):2185–2195.
8. Higgins LM et al. Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1999;162(1):486–493.
9. Weinberg AD, Wegmann KW, Funatake C, Whitham RH. Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1999;162(3):1818–1826.
10. Tsukada N et al. Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95(7):2434–2439.
11. Yoshioka T et al. Contribution of OX40/OX40 ligand interaction to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 2000;30(10):2815–2823.
12. Ndhlovu LC, Ishii N, Murata K, Sato T, Sugamura K. Critical involvement of OX40 ligand signals in the T cell priming events during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2001;167(5):2991–2999.

13. Nohara C et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: a critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2001;166(3):2108–2115.
14. Murata K et al. Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2002;169(8):4628–4636.
15. Hoshino A et al. Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *Eur. J. Immunol.* 2003;33(4):861–869.
16. Totsuka T et al. Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAbs in a murine model of chronic colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003;284(4):G595–603.
17. Blazar BR et al. Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Blood* 2003;101(9):3741–3748.
18. Gourh P et al. Association of TNFSF4 (OX40L) polymorphisms with susceptibility to systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;69(3):550–555.
19. Bossini-Castillo L et al. A replication study confirms the association of TNFSF4 (OX40L) polymorphisms with systemic sclerosis in a large European cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70(4):638–641.
20. Coustet B et al. Independent replication and meta analysis of association studies establish TNFSF4 as a susceptibility gene preferentially associated with the subset of anticomere-positive patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2012;39(5):997–1003.

21. Komura K et al. Increased serum soluble OX40 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2008;35(12):2359–2362.
22. Gwyer Findlay E et al. OX40L blockade is therapeutic in arthritis, despite promoting osteoclastogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(6):2289–2294.
23. Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J. Dermatol.* 2010;37(1):26–41.
24. Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 2013;80(1):23–28.
25. Ruzehaji N et al. Combined effect of genetic background and gender in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* 2015;17(1):145.
26. Akiba H et al. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 2000;191(2):375–380.
27. Ruzehaji N et al. Attenuation of flightless I improves wound healing and enhances angiogenesis in a murine model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2014;57(2):402–412.
28. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JHW. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum.* 2010;62(10):2831–2844.
29. Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am. J. Pathol.* 1976;82(3):493–512.
30. Tyndall AJ et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;69(10):1809–1815.

31. Maurer B et al. Fra-2 transgenic mice as a novel model of pulmonary hypertension associated with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2012;71(8):1382–1387.
32. Maurer B et al. Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation* 2009;120(23):2367–2376.
33. du Bois RM. Mechanisms of scleroderma-induced lung disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2007;4(5):434–438.
34. Frech TM et al. Treatment of early diffuse systemic sclerosis skin disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2013;31(2 Suppl 76):166–171.
35. Carboni S et al. CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2003;145(1-2):1–11.
36. Jacquemin C et al. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 2015;42(6):1159–1170.
37. Muangchan C, Pope JE. Interleukin 6 in systemic sclerosis and potential implications for targeted therapy. *J. Rheumatol.* 2012;39(6):1120–1124.
38. Kitaba S et al. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am. J. Pathol.* 2012;180(1):165–176.
39. Distler JHW, Schett G, Gay S, Distler O. The controversial role of tumor necrosis factor alpha in fibrotic diseases. *Arthritis Rheum.* 2008;58(8):2228–2235.

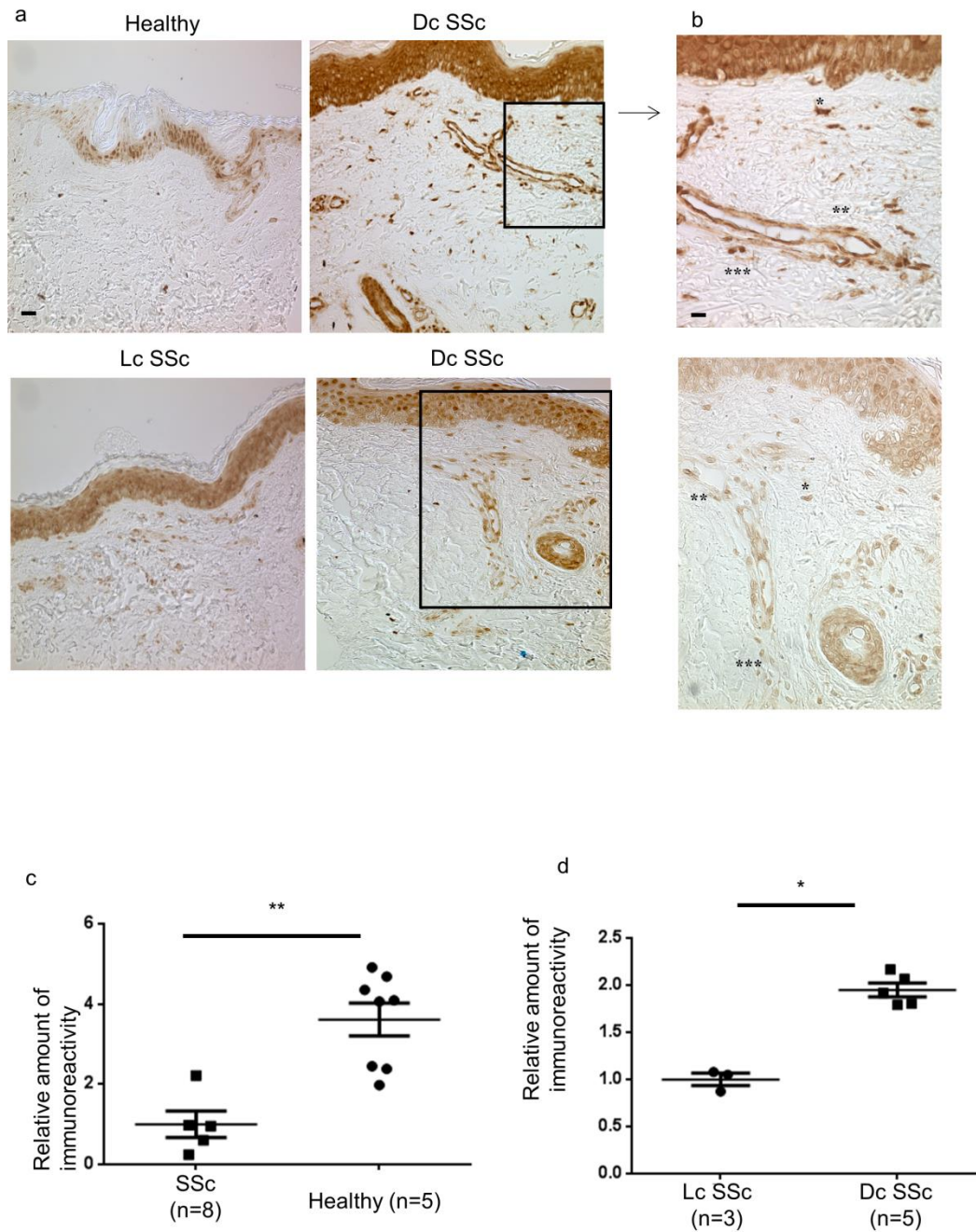
40. Koca SS et al. Effectiveness of etanercept in bleomycin-induced experimental scleroderma. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2008;47(2):172–175.
41. Ohshima Y et al. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1997;159(8):3838–3848.
42. Song J, So T, Croft M. Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2008;180(11):7240–7248.
43. Matsumura Y, Hori T, Kawamata S, Imura A, Uchiyama T. Intracellular signaling of gp34, the OX40 ligand: induction of c-jun and c-fos mRNA expression through gp34 upon binding of its receptor, OX40. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1999;163(6):3007–3011.
44. Avouac J et al. Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor β -mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(5):1642–1652.
45. Mukai K et al. The effect of 17 β -estradiol on cutaneous wound healing in protein-malnourished ovariectomized female mouse model. *PloS One* 2014;9(12):e115564.
46. Eming SA et al. A novel property of povidon-iodine: inhibition of excessive protease levels in chronic non-healing wounds. *J. Invest. Dermatol.* 2006;126(12):2731–2733.
47. Bagnato G, Harari S. Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 2015;24(135):102–114.

48. Rabieyousefi M et al. Indispensable roles of OX40L-derived signal and epistatic genetic effect in immune-mediated pathogenesis of spontaneous pulmonary hypertension. *BMC Immunol.* 2011;12:67.
49. Seshasayee D et al. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J. Clin. Invest.* 2007;117(12):3868–3878.
50. Gauvreau GM et al. OX40L blockade and allergen-induced airway responses in subjects with mild asthma. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 2014;44(1):29–37.
51. Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4(6):420–431.
52. Humphreys IR et al. A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection. *J. Exp. Med.* 2003;198(8):1237–1242.
53. 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.* 1980;23(5):581–590.
54. LeRoy EC et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 1988;15(2):202–205.
55. Proceedings of the 4th World Symposium on Pulmonary Hypertension, February 2008, Dana Point, California, USA. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54(1 Suppl):S1–117.
56. Clements PJ et al. Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J. Rheumatol.* 1993;20(11):1892–1896.

57. Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J. Dermatol.* 2010;37(1):26–41.
58. Avouac J et al. Critical role of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of inflammation-driven dermal fibrosis in a mouse model of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2013;72(6):1089–1098.
59. Akiba H et al. CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1999;162(12):7058–7066.
60. Avouac J et al. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):800–809.
61. Kamel H et al. Comparison of gold levels and distribution in guinea pig serum. *Arthritis Rheum.* 1978;21(4):441–446.
62. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol.* 1988;41(4):467–470.
63. Gailhouste L et al. Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis. *J. Hepatol.* 2010;52(3):398–406.

FIGURES

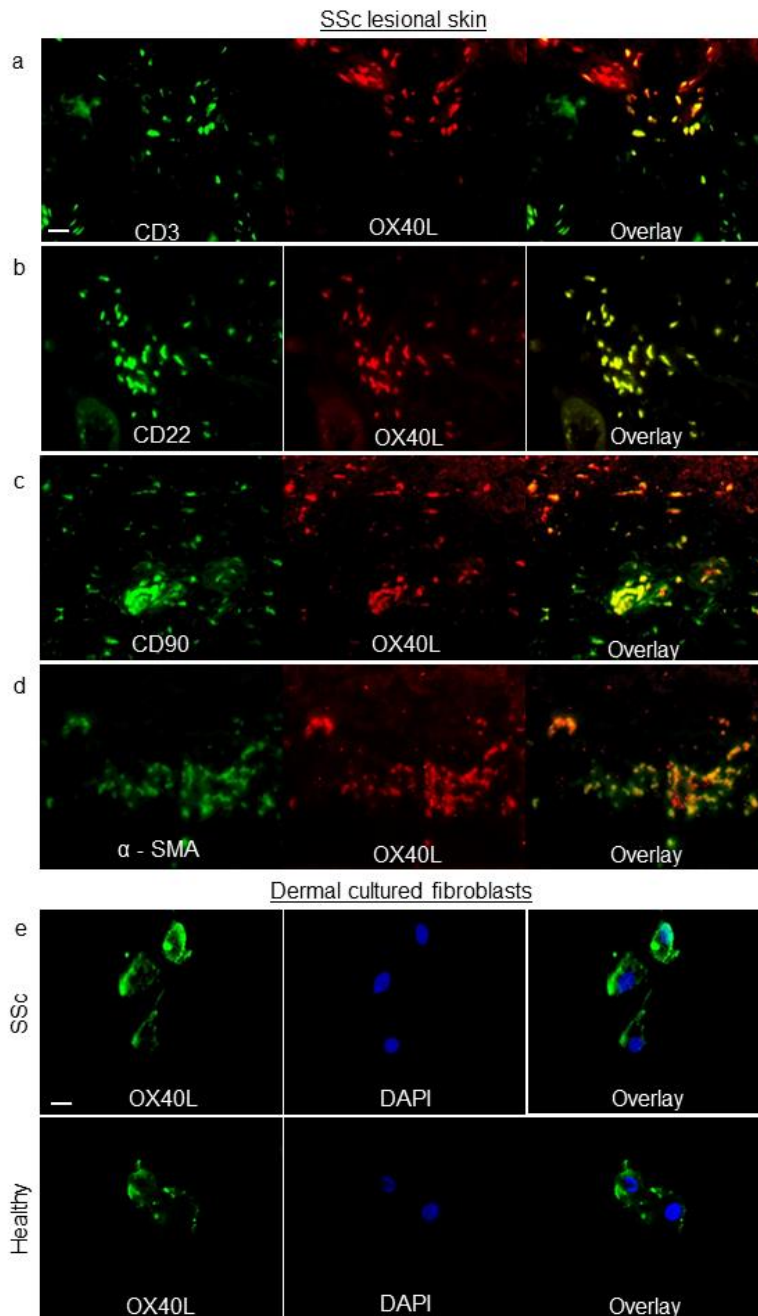
FIGURE 1: OX40L is overexpressed in fibrotic skin in patients with SSc.



(a) Sections of skin biopsies stained for OX40L were obtained from healthy controls and SSc-patients in lesional skin. Four representative tissue sections are shown. Magnification x 200; Bar = 50µm. (b) Sections of diffuse SSc lesional skin stained for OX40L at higher magnification (x400), Bar= 25µm. * fibroblast, **: endothelial cell, ***: inflammatory cell (c-d) Semi quantitative analysis of intensity of immunostaining using the ImageJ software revealed an overexpression of OX40L in the lesional skin of SSc-patients as compared with healthy controls and an overexpression of OX40L in diffuse cutaneous forms as compared to the limited ones. The staining was performed in three independent series. Values are represented by dot blots with the mean ± SEM. Lc SSc: limited cutaneous systemic sclerosis,

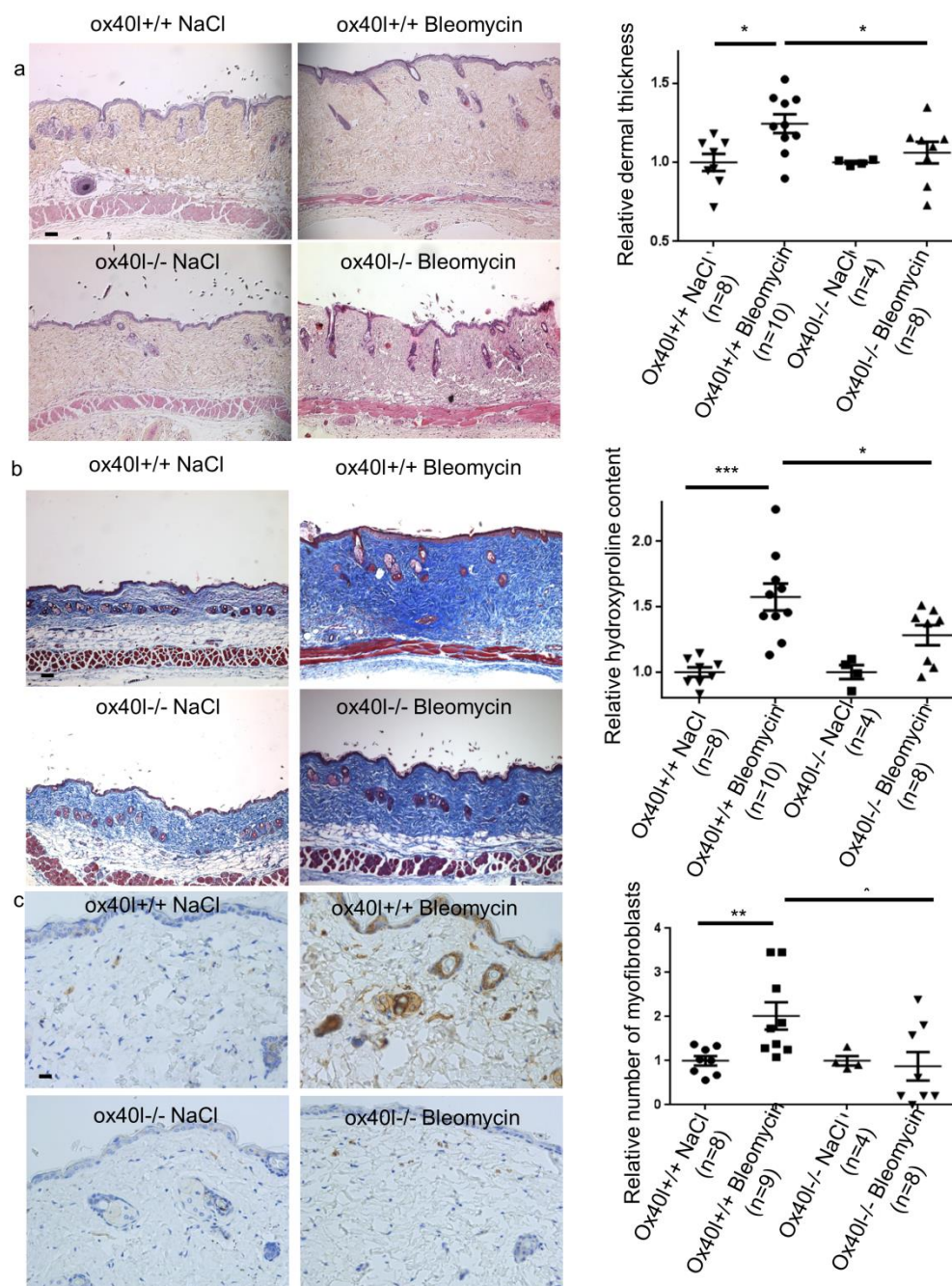
Dc SSc: diffuse cutaneous SSc * Statistical test: two-tailed Mann-Whitney test.* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

FIGURE 2: OX40L is expressed by leukocytes and fibroblasts in lesional skin



(a, b, c, d) Sections of skin biopsies were obtained from SSc-patients in lesional skin and were stained by immunofluorescence for OX 40L and CD3, CD22, CD90 and α -SMA, respectively. The staining was performed in three independent series. Magnification x 400. Bar: 10 μ m. Fibroblasts obtained from lesional skin of scleroderma patients and from healthy controls (e) Nuclei were stained by DAPI. Magnification x 630. Bar: 5 μ m.

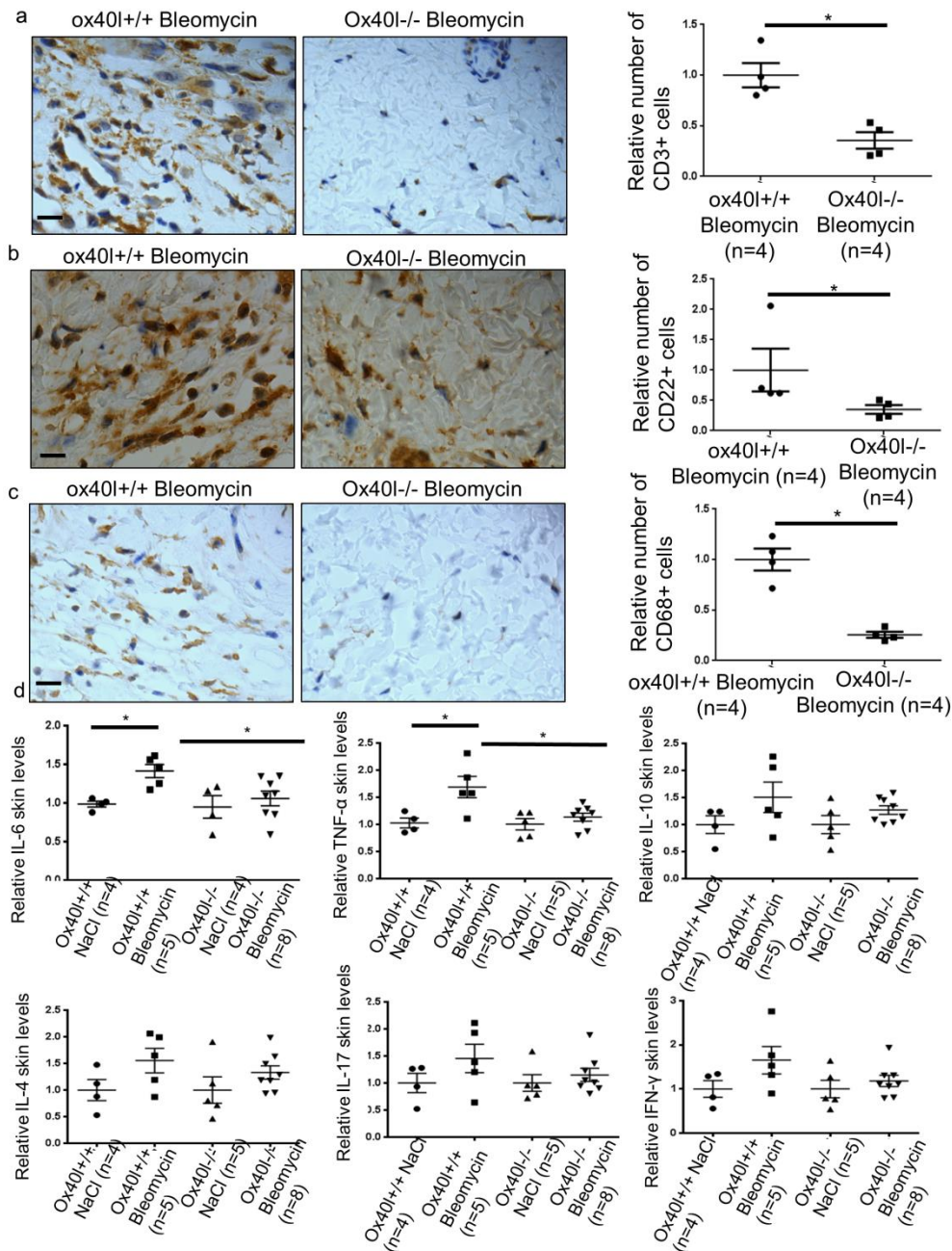
FIGURE 3: Mice lacking OX40L are protected from dermal fibrosis induced by bleomycin.



(a) Reduced dermal fibrosis in *ox40l*^{-/-} mice upon challenge with bleomycin. Representative sections stained by hematoxylin/eosin at 100-fold magnification are shown: *ox40l*^{+/+} mice injected with NaCl subcutaneously (n=8), *ox40l*^{-/-} mice receiving subcutaneous injections of bleomycin (n=10), *ox40l*^{+/+} mice receiving subcutaneous injections of NaCl (n=4) and *ox40l*^{-/-} mice injected with bleomycin (n=8). Bar: 100µm. Decreased dermal thickening in *ox40l*^{-/-} mice compared to their *ox40l*^{+/+} littermates. (b) Reduced accumulation of collagen in *ox40l*^{-/-} mice upon challenge with bleomycin. Representative sections stained by trichrome staining at 100-fold magnification. Bar: 100µm. Reduced hydroxyproline content in lesional skin of *ox40l*^{-/-} mice. (c) Lower myofibroblast counts in *ox40l*^{-/-} mice. Myofibroblasts were

identified on positive staining for α -SMA in slides after counterstaining with hemalun. Bar: 50 μ m. Values are represented by dot blots with the mean \pm SEM; ox401^{+/+} and ox401^{-/-} control mice were injected with NaCl and different outcome measures obtained in these mice were defined as equal to 1.0; the other results are normalized to this value. The experiment was performed in two independent series. Statistics: two-sided Mann-Whitney Test. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

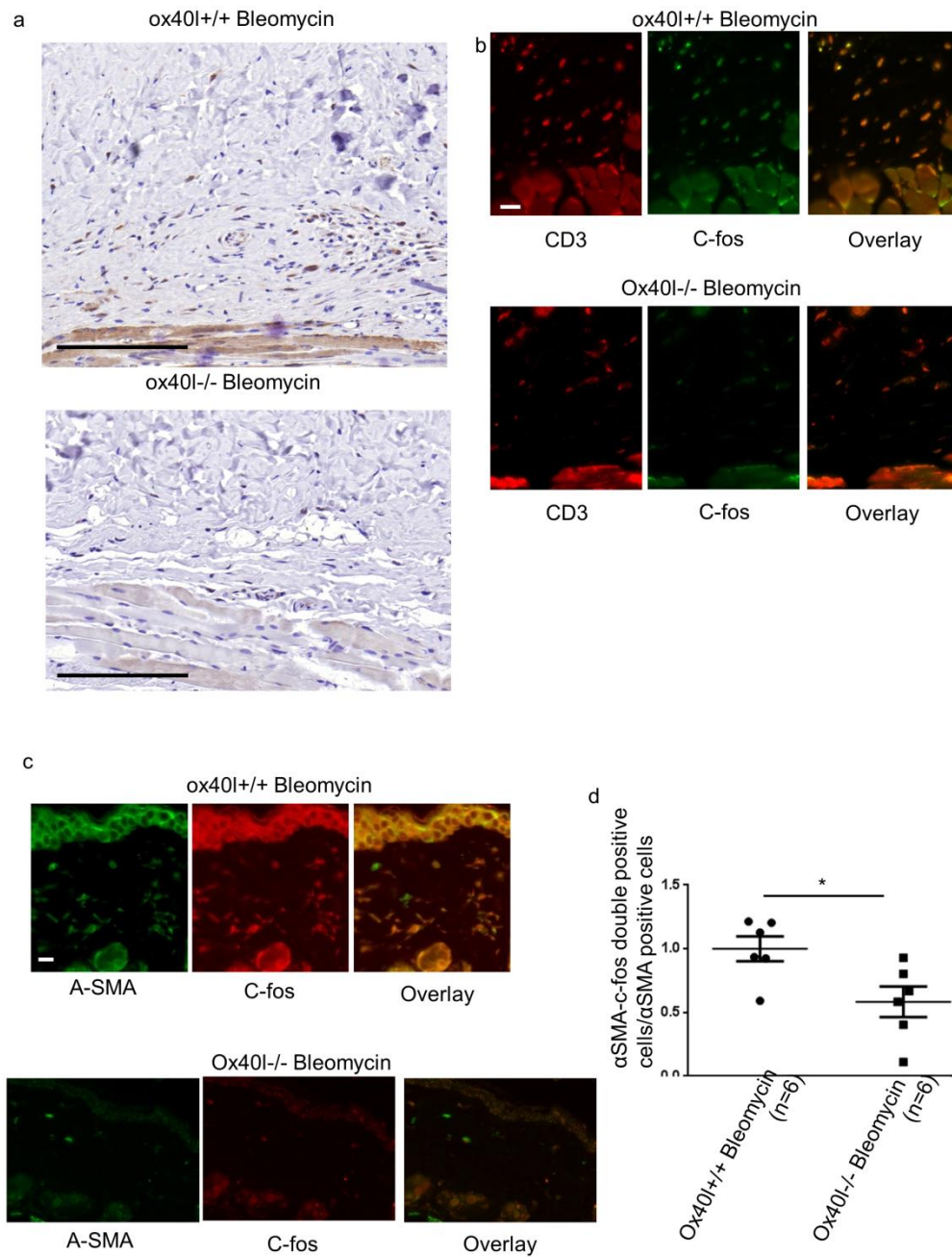
FIGURE 4: Decrease in T cells, B cells and macrophages infiltration and in levels of proinflammatory cytokines in lesional skin lysates of OX40L deficient mice subjected to bleomycin injections.



(a, b and c) Reduced number of CD3+ T cells (a), CD22+ B cells (b) and CD68+macrophages (c) by immunohistochemistry in lesional skin of ox40l deficient mice challenged with bleomycin. 10 mice were used for these experiments (5 ox40l+/+ and 5 ox40l-/-mice receiving bleomycin). Representative sections stained by immunohistochemistry for CD3, CD22 and CD68 at 400-fold magnification are shown. Bar: 10 μ m. The results are normalized to values obtained in ox40l+/+ mice treated with bleomycin. (d) Reduced skin levels of the inflammatory cytokines TNF- α and IL-6, in ox40l-/- mice compared with

ox40l^{+/+} mice subjected to bleomycin. 16 mice were used for these experiments (4 mice per group). All cytokine concentrations are normalized on total protein concentration. All results are normalized to ox40l^{+/+} mice injected with NaCl. Values are represented by dot blots with the mean \pm SEM; Statistics: two-tailed Mann-Whitney Test. * p<0.05

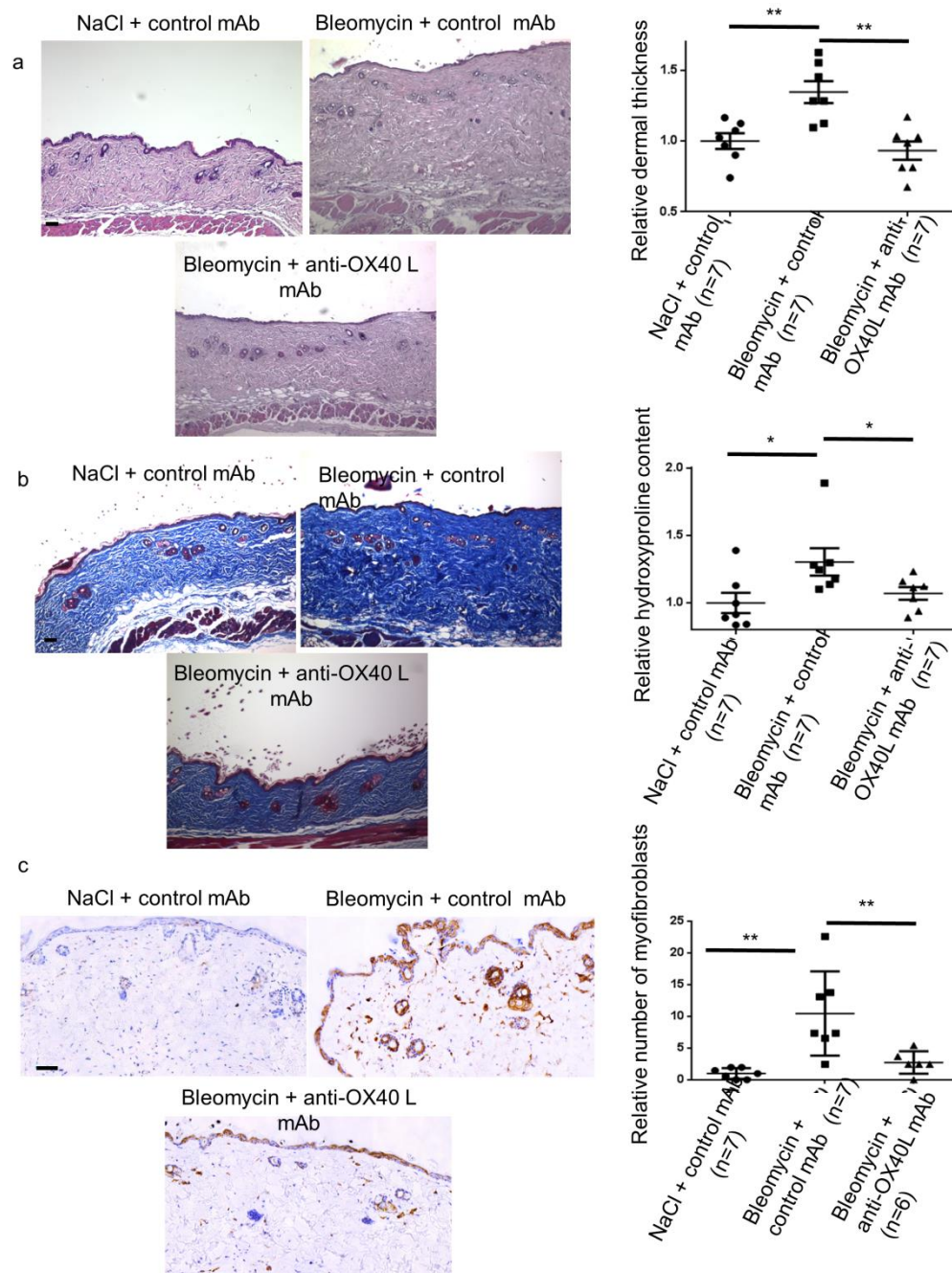
FIGURE 5: c-fos protein is underexpressed in mice lacking OX40L after bleomycin injections



(a) Representative sections stained by immunohistochemistry for c-fos at 200-fold magnification are shown in *ox40l+/+* mice and *ox40l-/-* mice receiving subcutaneous injections of bleomycin. The experiment was performed in two independent series of 3 mice. Bar: 200 μ m. (b) c-fos was expressed by CD3 positive T-cells. The staining was performed in three independent series. Magnification x 400. Bar: 10 μ m. (c) c-fos was expressed by α -SMA positive cells. The staining was performed in three independent series. Magnification x 400. Bar: 10 μ m. (d) Semi quantitative analysis of intensity of double staining among cells expressing α -SMA was performed using the ImageJ software. Myofibroblasts from mice lacking OX40L had less expression of c-fos than myofibroblasts from mice expressing OX40L after bleomycin injections. The staining was performed in six mice from each group

(in two independent series). Values are represented by dot blots with means \pm SEM. The value obtained in ox401^{+/+} mice treated with bleomycin was defined as 1.0; the other results are normalized to this value. Values are the mean \pm SEM. Statistics: two-sided Mann Whitney Test. * $p < 0.05$.

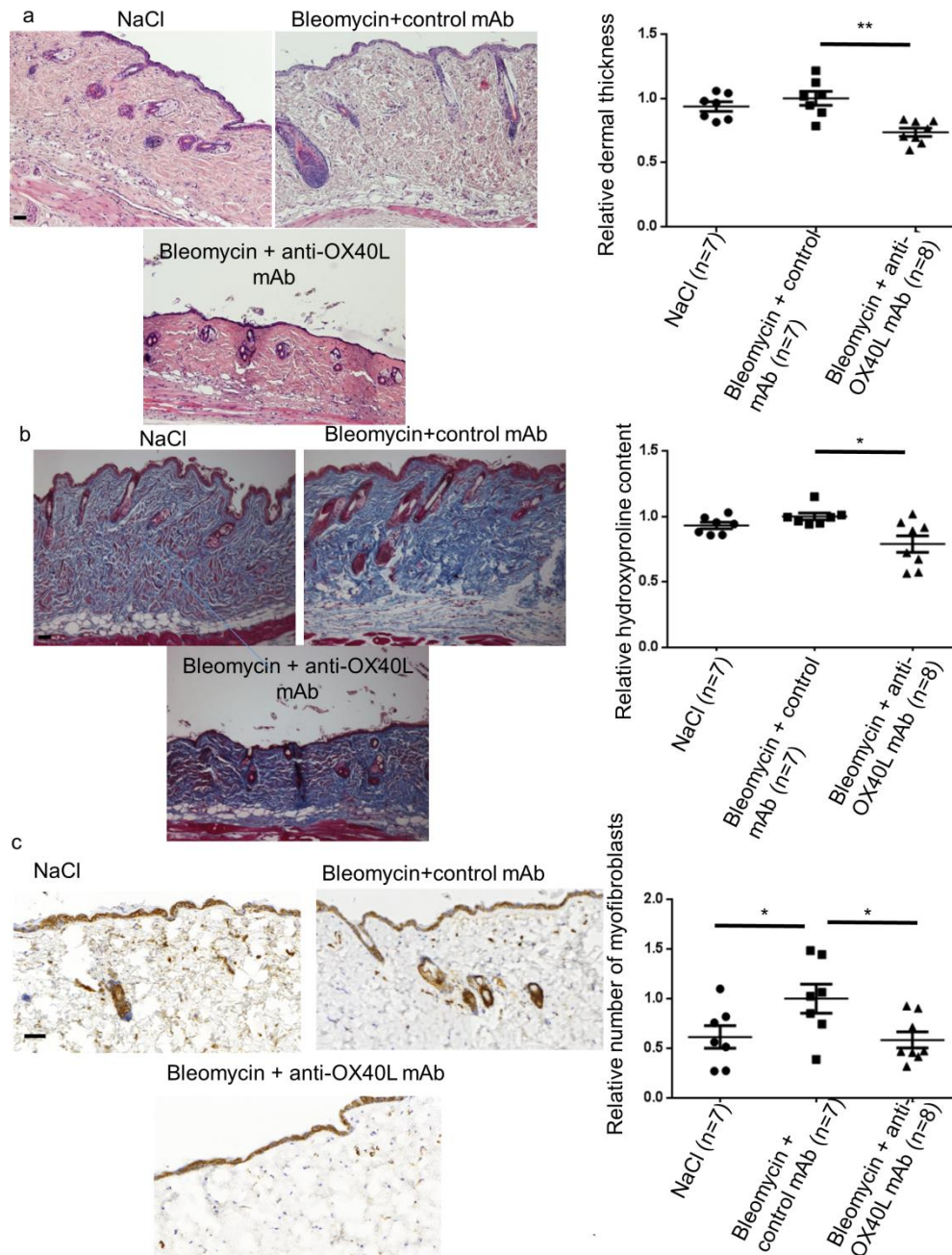
FIGURE 6: Bleomycin-induced skin fibrosis is prevented upon OX40L inhibition with a neutralizing mAb.



(a) Representative sections stained by hematoxylin/eosin at 100-fold magnification are shown: C57/Bl6 mice injected with NaCl subcutaneously and control IgG intraperitoneally (n=7), C57/Bl6 mice receiving intraperitoneal injections of control IgG and subcutaneous injections of bleomycin (n=7), C57/Bl6 mice receiving subcutaneous injections of bleomycin and intraperitoneal injections of anti-OX40L neutralizing monoclonal antibody (n=7) Bar: 100µm. Treatment with OX40L neutralizing mAb significantly reduced dermal thickening. (b) Reduced accumulation of collagen was observed in mice treated with anti-OX40L as

compared to those treated with control IgG, upon bleomycin challenge, on trichrome staining at 100-fold magnification. Bar: 100 μ m. This was consistent with a decrease in hydroxyproline content upon OX40L inhibition in mice injected with bleomycin. (c) The number of myofibroblasts was significantly reduced in mice treated by OX40L neutralizing mAb. 21 mice were used for these experiments (7 mice per group). Myofibroblasts were identified on positive staining for α -SMA in slides after counterstaining with hemalun. Bar: 100 μ m. Values are represented by dot blots with mean \pm SEM. Control mice were injected with NaCl and defined as 1.0; the other results are normalized to this value. The experiment was performed in two independent series. Statistics: two-sided Mann-Whitney Test. * p<0.05;**p<0.01

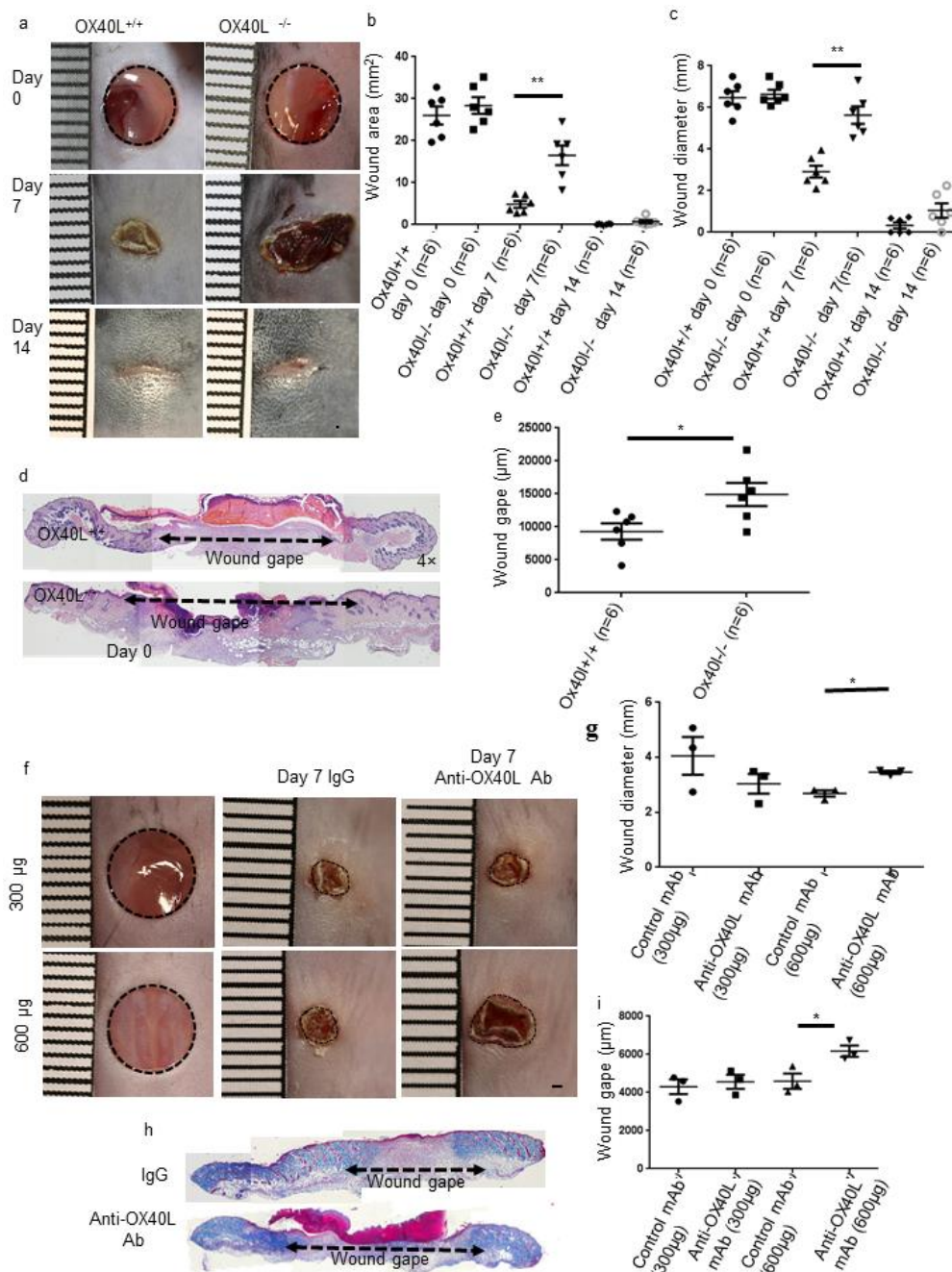
FIGURE 7: Inhibition of OX40L with a neutralizing mAb induces regression of established fibrosis in the bleomycin mouse model.



(a) Representative sections stained by hematoxylin/eosin at 100-fold magnification are shown: C57/Bl6 mice injected with bleomycin subcutaneously for 6 weeks and control IgG intraperitoneally for the last 3 weeks (n=7), C57/Bl6 mice receiving subcutaneous injections of bleomycin for 6 weeks and in parallel for the last 3 weeks intraperitoneal injections of anti-OX40L neutralizing monoclonal antibody (n=7), C57/Bl6 mice receiving subcutaneous injections of bleomycin for 3 weeks followed by subcutaneous injections of NaCl for the last 3 weeks (n=8). Bar: 100µm. Treatment with OX40L neutralizing mAb significantly reduced dermal thickening. (b) Reduced accumulation of collagen was observed in mice treated with

anti-OX40L as compared to those treated with control IgG, upon bleomycin challenge and those injected by bleomycin followed by NaCl, on trichrome staining at 100-fold magnification. Bar: 100 μ m. Decrease in hydroxyproline content upon OX40L inhibition in mice injected with bleomycin. (c) The number of myofibroblasts was significantly reduced in mice treated by OX40L neutralizing mAb. Myofibroblasts were identified on positive staining for α -SMA in slides after counterstaining with hemalun. Bar: 100 μ m. 22 mice were used for these experiments. The results are normalized to the values obtained in mice treated with bleomycin for 6 weeks and with control IgG. Results are represented by dot blots with mean \pm SEM. The experiment was performed in two independent series. Statistics: two-sided Mann-Whitney test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

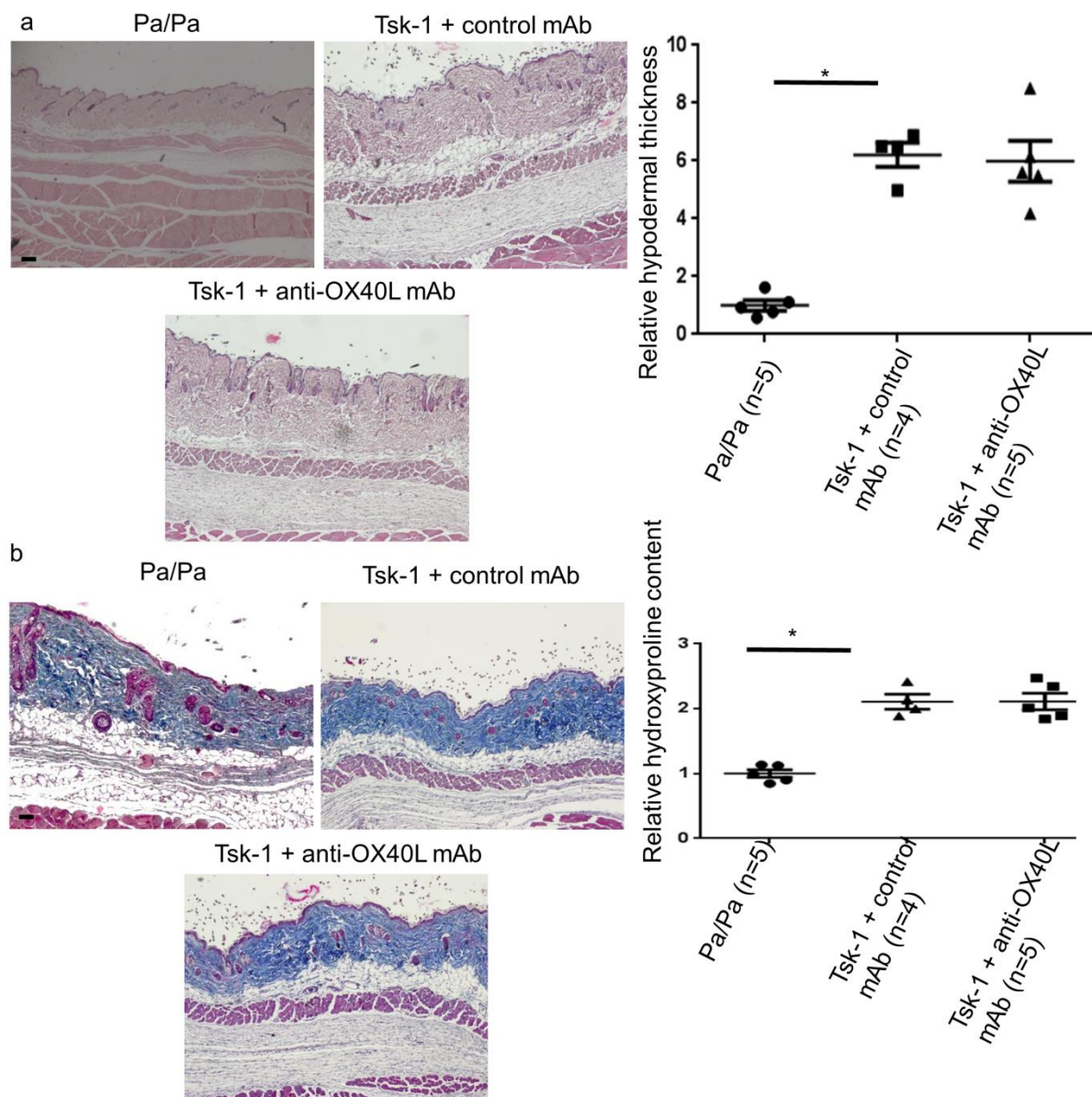
FIGURE 8: Invalidation and inhibition of OX40L are associated with a slowing in healing but without complete blockage of healing.



(a) Representative digital photographs of wounds taken at day 0, 7 and 14 after wounding in OX40L^{+/+} mice (n=6) and in OX40L^{-/-} mice (n=6). Bar: 1mm. (b) Increase in wound area in OX40L^{-/-} mice, as compared to OX40L^{+/+} mice at day 7, without significant difference at day 14. (c) Increase in wound diameter in OX40L^{-/-} mice, as compared to OX40L^{+/+} mice at day 7, without significant difference at day 14. (d) Histological sections of the wounds stained by hematoxylin/eosin at day 7 post-wounding. Original magnification x40. (e) Increase in wound

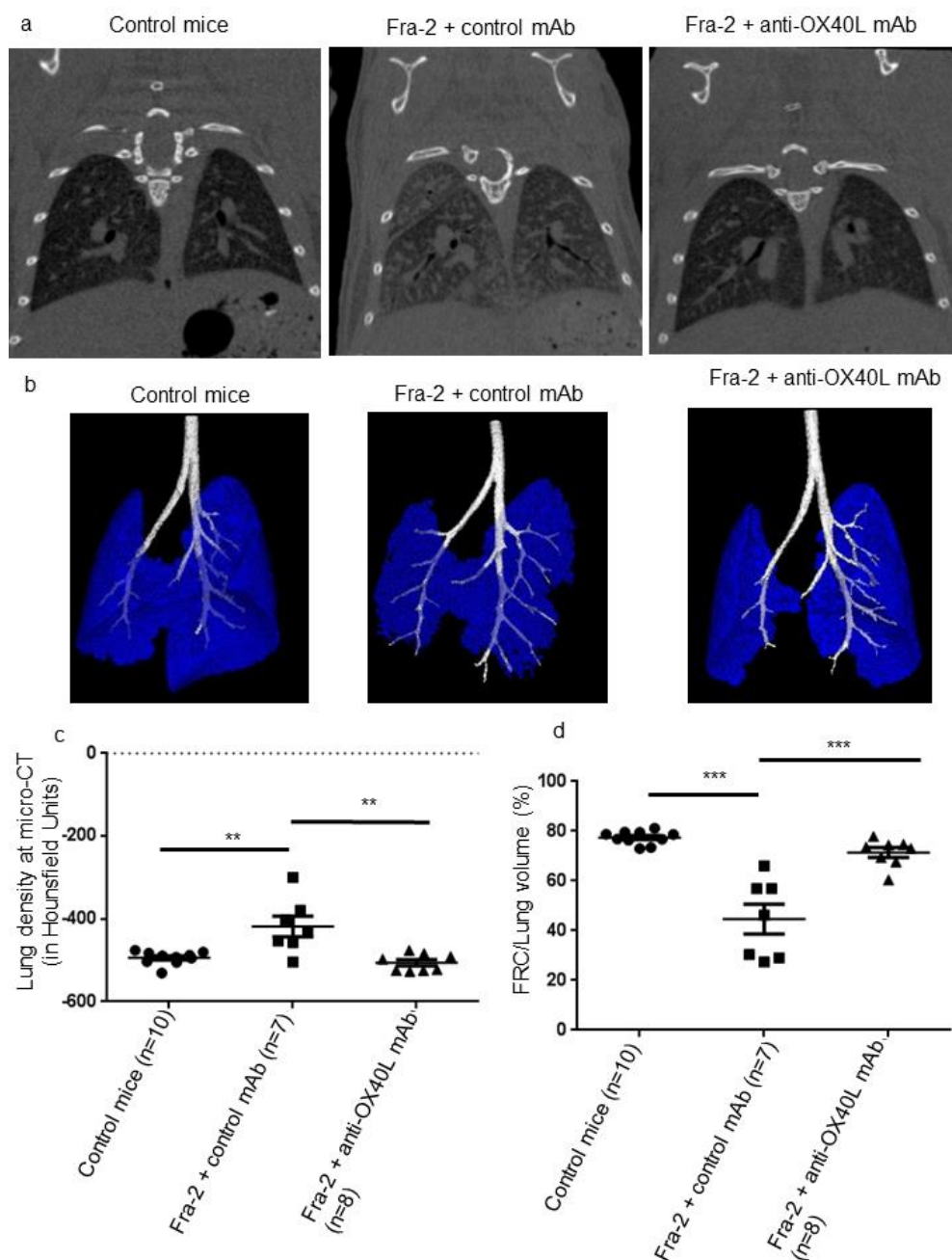
gape in ox40l^{-/-} mice, as compared to ox40l^{+/+} mice at day 7 post-wounding. (f) Representative digital photographs of wounds taken at day 0 and 7 after wounding in wildtype mice having received intracutaneous injections of anti-OX40L mAb or control IgG around wound margins at 2 different dosages: 300 µg or 600 µg at day 1, 2 and 3 after wounding. Bar: 1mm. (g) Increase in wound diameter in wounded mice injected with anti-OX40L mAb as compared to those receiving control IgG at the dosage 600 µg at day 7, but not at the dosage of 300 µg at day 7. There was no significant difference at day 14. (h) Masson's trichrome stained sections of day 7 wounds treated with anti-OX40L mAb (600 µg) and equivalent IgG control. Original magnification is ×40. (i) Increase in wound gape in wounded mice, injected with anti-OX40L mAb as compared to those receiving control IgG at the dosage 600 µg at day 7, but not at the dosage of 300 µg at day 7. There was no significant difference at day 14. The experiment was performed in one independent series. Statistics: two-sided Mann-Whitney test. * p<0.05

FIGURE 9: No effect of inhibition of OX40L in the tight skin-1 mouse model



(a) Representative sections stained by hematoxylin/eosin at 40-fold magnification are shown: control mice pa/pa (n=5), Tsk-1 mice treated with control monoclonal antibody (n=4) and Tsk-1 mice treated with anti-OX40L monoclonal antibody (n=5). Hypodermal thickening is not significantly different between tsk-1 mice treated with anti-OX40L monoclonal antibody and those treated with control monoclonal antibody. 14 mice were used for these experiments. Bar: 250 μ m. (b) Hydroxyproline content is not significantly different between tsk-1 mice treated with anti-OX40L monoclonal antibody and control monoclonal antibody. Representative pictures stained by trichrome at 40-fold magnification are shown. Values are represented by dot blots with means \pm SEM. Control mice were pa/pa mice and defined as 1.0; the other results are normalized to this value. The experiment was performed in two independent series. Statistics: two-sided Mann-Whitney Test. * p<0.05

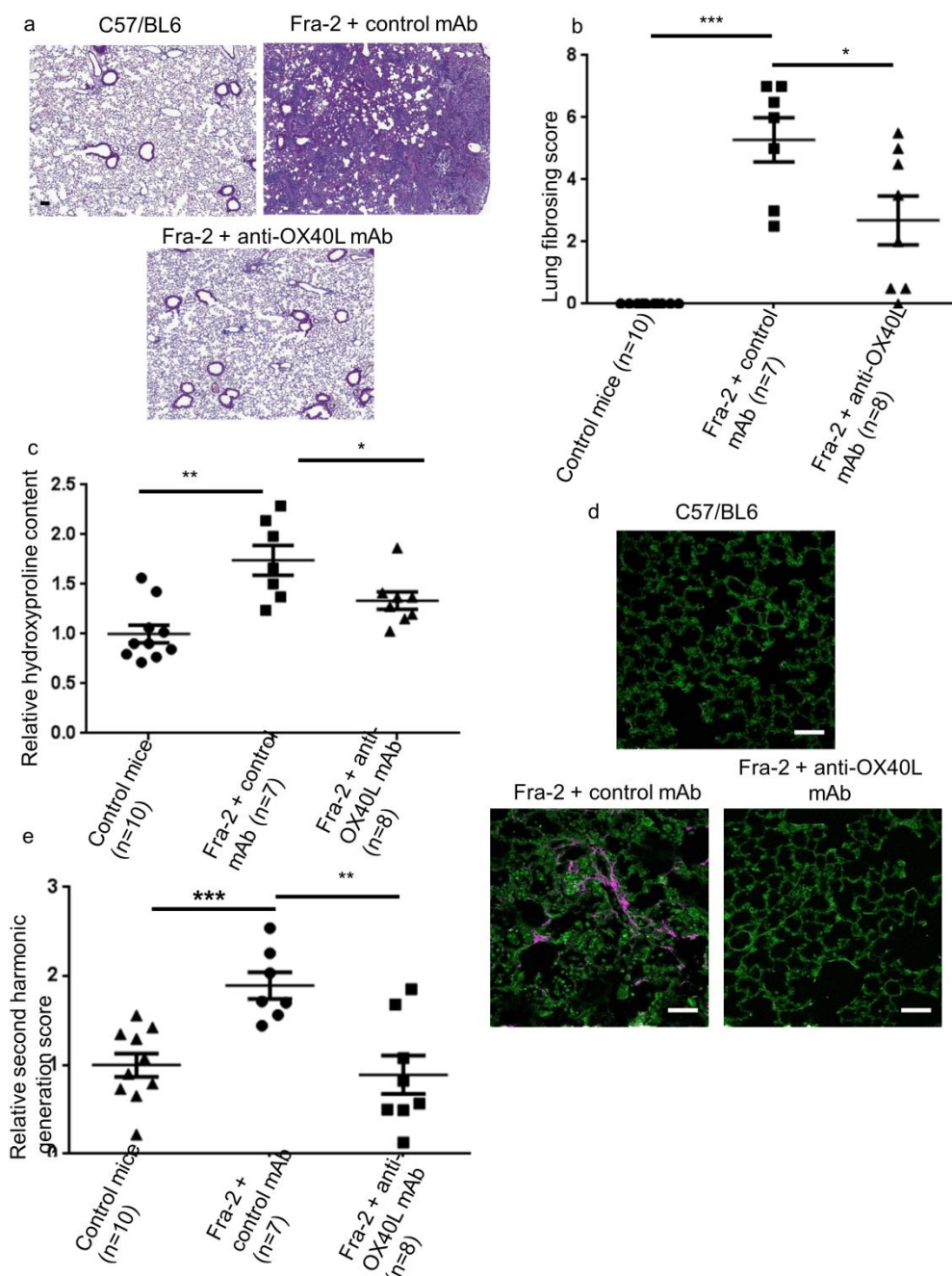
FIGURE 10: Inhibition of OX40L prevents the development of fibrosing alveolitis: CT-scan data.



(a) Fibrosis alveolitis was observed in Fra-2 mice receiving control IgG, but not in control C57/BL6 mice or Fra-2 mice. Representative pictures of micro-computed tomography are shown. (b) Representative pictures of functional residual capacity in different mice in blue (bronchi are in white) (c) Increase in lung density at micro-computed tomography in Fra-2 transgenic mice treated with control IgG (n=7) as compared to Fra-2 mice treated with anti-OX40L mAb (n=8) or C57/BL6 mice (n=10) (C57/BL6 mice were treated with control IgG (n=5) or anti-OX40L mAb (n=5)). (d) Residual lung volume, expressed as the percentage of functional residual capacity on total lung volume, was significantly higher in Fra-2 mice treated with anti-OX40L mAb and similar to what is observed in C57/BL6 control mice, as

compared to Fra-2 mice treated with control IgG. Values are dot blots with the mean \pm SEM; Statistics: two-sided Mann-Whitney Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

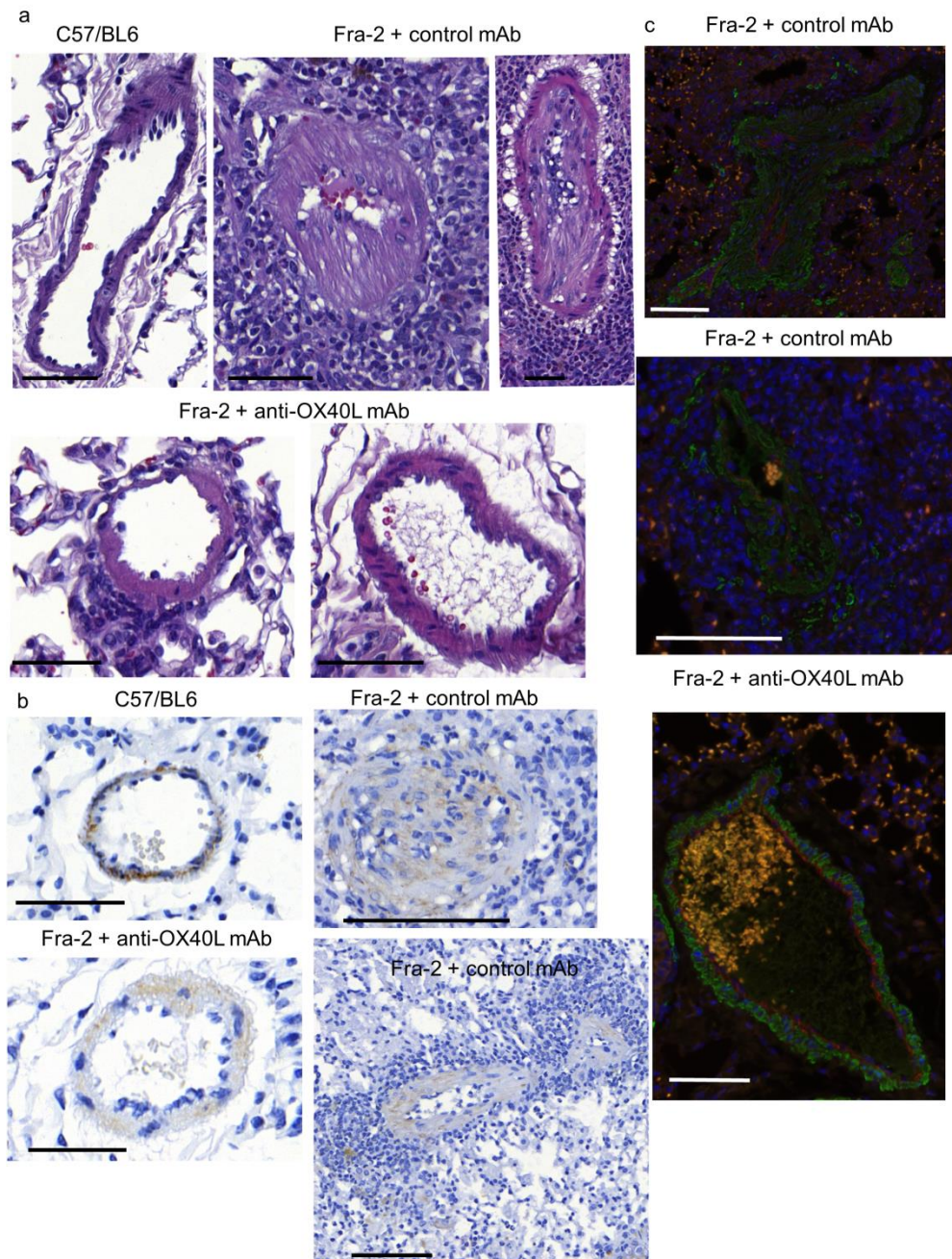
FIGURE 11: Inhibition of OX40L prevents the development of fibrosing alveolitis: histological analysis



(a) Fibrosing alveolitis was significantly higher in Fra-2 mice treated with control IgG (n=7) than in those receiving anti-OX40L mAb and was absent in control C57/BL6 mice. Representative lung sections stained by hematoxylin/eosin are shown: Fra-2 mice treated with control IgG (n=7), Fra-2 mice treated with anti-OX40L monoclonal antibody (n=8) and control C57/BL6 mice receiving control IgG or anti-OX40L monoclonal (n=10). Fibrosis lung score was significantly higher in Fra-2 mice receiving control IgG as compared to Fra-2 mice treated by anti-OX40L monoclonal antibody or control mice. 25 mice were used for these experiments. Bar: 100 μ m. (b) Hydroxyproline content was significantly higher in Fra-2 mice treated with control IgG as compared to those treated with anti-OX40L monoclonal antibody

or control mice. The value obtained in control wildtype mice was defined as equal to 1.0; the other results are normalized to this value. (c) Second harmonic generation showed fibrillar collagen in Fra-2 mice treated with control IgG (in pink), but not in Fra-2 mice receiving anti-OX40L mAb neither in control C57/BL6 mice. 25 mice were used for these experiments. Bar: 50 μm . (d) Second harmonic score were higher in Fra-2 mice receiving control IgG as compared to Fra-2 mice treated by anti-OX40L monoclonal antibody or control mice. 25 mice were used for these experiments. Values are represented by dot blots with means \pm SEM. Statistics: two-sided Mann-Whitney test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

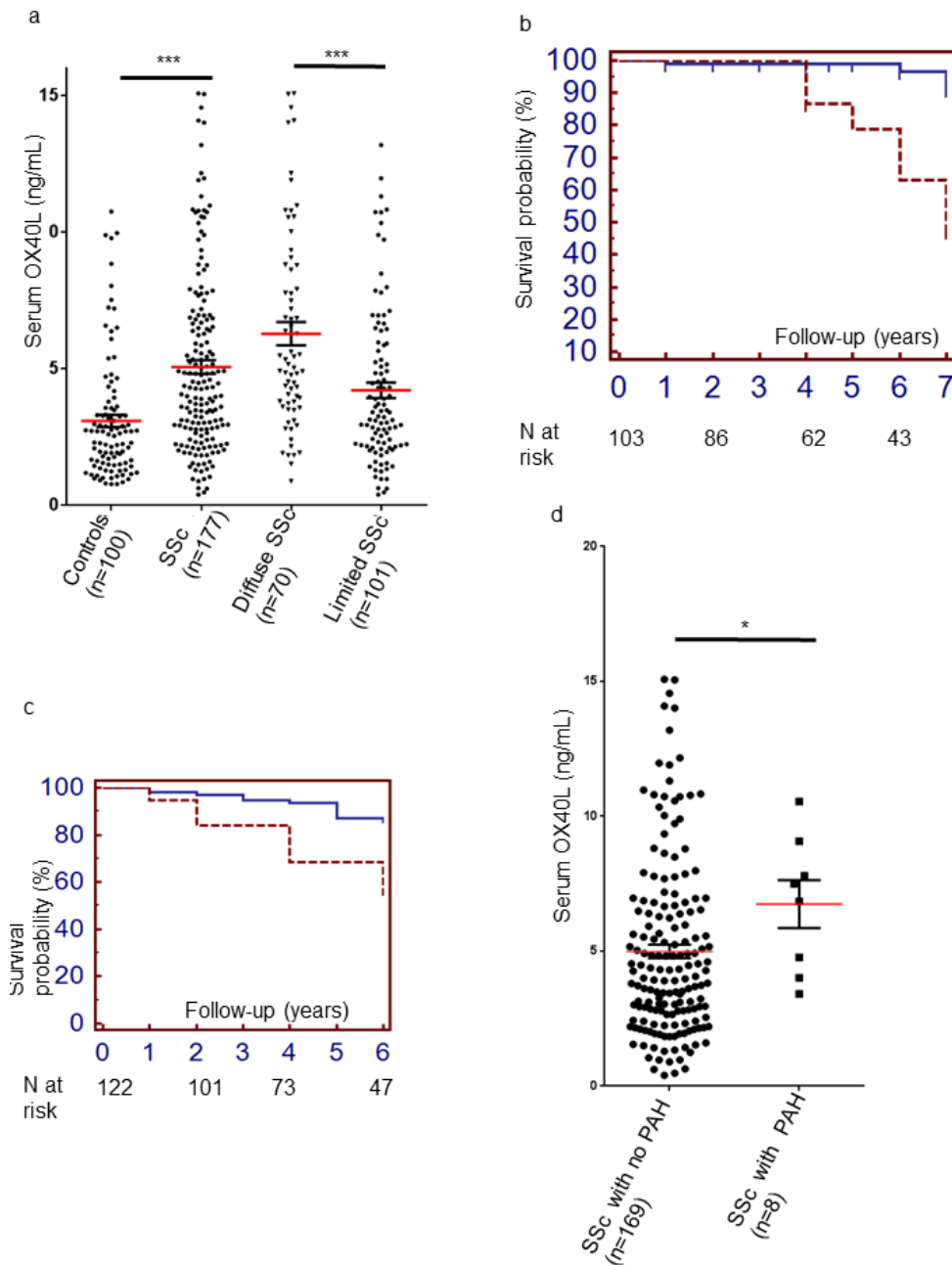
FIGURE 12: Inhibition of OX40L prevents pulmonary arterial hypertension in Fra-2 mice



- (a) Hematoxylin eosin staining showed lung vessel remodeling in Fra-2 mice treated with control antibody with increase in wall thickness and occlusion of pulmonary (two representative pictures are shown: one vessel almost occluded and one completely occluded), which was not observed in wt mice or Fra-2 mice receiving anti-OX40L antibody (two representative pictures are shown: one vessel associated with a mild infiltrate) and one vessel without vasculopathy or inflammatory infiltrate. Bar: 100 μ m.
- (b) Remodeling of the vessel was assessed by immunohistochemistry by staining for α -SMA and was more important in Fra-2 mice receiving control IgG (vessel occluded or almost completely occluded with a massive inflammatory infiltrate on two representative pictures) than in Fra-2 mice treated with anti-OX40L mAb or control mice. 25 mice were used for this experiment. Bar: 100 μ m.

- (c) There was no co-staining for CD31 in red and α -SMA in green in vessel from Fra-2 mice treated with control antibody or anti-OX40L antibody. Vasculopathy in Fra-2 mice receiving control antibody was rather related to prominent proliferation of fibroblasts (marked by α -SMA) than by endothelial-to-mesenchymal transition (no co-expression of CD31 and α -SMA). A massive perivascular infiltrate was noticed (dapi) . Bar: 100 μ m.

Figure 13: Applications to clinical practice: soluble OX40L as a biomarker of fibrosis



(a) Serum OX40L levels were significantly higher in SSc-patients (n=177) as compared to healthy controls (n=100). OX40L was significantly higher in diffuse cutaneous SSc (n=70) than in limited forms (n=101). (b) Kaplan–Meier survival curve for worsening of dermal fibrosis defined by worsening of Rodnan skin score $\geq 10\%$ according to serum level of OX40L at baseline during the follow-up period. The dotted line represents survival probability in patients with high serum levels of OX40L at baseline (concentration ≥ 95 percentile healthy controls, i.e. 8.4370), whereas the solid line represents survival probability in patients with low serum levels of OX40L at baseline (concentration < 95 percentile healthy controls, i.e. 8.4370). In the bottom, the number of patients with SSc at risk can be noticed. (c) Kaplan–Meier survival curve for worsening of lung fibrosis defined by appearance of

fibrosing alveolitis *de novo* or decrease $\geq 10\%$ of forced vital capacity according to serum level of OX40L at baseline during the follow-up period. The dotted line represents survival probability in patients with high serum levels of OX40L at baseline (concentration ≥ 95 percentile healthy controls, i.e. 8.4370), whereas the solid line represents survival probability in patients with low serum levels of OX40L at baseline (concentration < 95 percentile healthy controls, i.e. 8.4370). In the bottom, the number of patients with SSc at risk can be noticed. (d) Serum OX40L levels were significantly higher in SSc-patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) (n=8) as compared to SSc-patients without PAH (n=169).

TABLE 1: Results of the transcriptomic analysis

Interactive Pathway Analysis – Ingenuity Knowledge Base (Genes Only)		
Molecular and cellular functions	Number of differentially expressed genes	p-value
Cellular assembly and organization	28	1.74 10 ⁻⁴
Cellular function and maintenance	20	2.59 10 ⁻⁴
Molecular transport	13	6.60 10 ⁻⁴
Protein trafficking	12	6.60 10 ⁻⁴
Post-translational modification	13	1.47 10 ⁻³
Top canonical pathways		p-value
Sulfite oxidation IV		1.49 10 ⁻²
Androgen biosynthesis		1.80 10 ⁻²
Inhibition of matrix metalloproteases		2.03 10 ⁻²
L-DOPA degradation		2.96 10 ⁻²
Thiosulfate disproportionation III		2.96 10 ⁻²
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)		
Top GSEA- signaling pathway	Enrichment score	p-value
PDGFR → AP-1/MYC	-0.51	<1.10 ⁻⁵
HGFR → AP-1/CREB/MYC	-0.50	<1.10 ⁻⁵
TGFBR → AP-1	-0.49	<1.10 ⁻⁵
Angiopietin → AP-1	-0.47	<1.10 ⁻⁵
Notch → NF-kB	-0.45	<1.10 ⁻⁵
IL1R → NF-kB	-0.44	<1.10 ⁻⁵

A transcriptomic approach was performed to compare genes differentially expressed between ox40l^{+/+} (n=3) and ox40l^{-/-} mice (n=4) submitted to bleomycin injections. Two main approaches were used. First a supervised analysis revealed an upregulation of 5 pathways. Get Set Enrichment Analysis showed an upregulation of genes involved in two main pathways: NFkappaB and AP1 pathways.

CHAPITRE 6 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Discussion

La ScS est une maladie multifactorielle caractérisée par une atteinte polymorphe vasculaire, dysimmunitaire et fibrotique, affectant différents organes (1,485). Malgré les progrès accomplis ces dernières années dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués, la ScS reste une maladie sévère associée à une surmortalité, qui n'a pas baissé ces 40 dernières années (14). Jusqu'à présent, aucun essai thérapeutique n'a permis de démontrer qu'un produit puisse avoir une action anti-fibrosante dans ce contexte.

La physiopathologie de la ScS fait intervenir une combinaison de facteurs environnementaux et de facteurs de susceptibilité génétique. Récemment *TNFSF4* a été identifié comme facteur de susceptibilité génétique à la ScS. *TNFSF4* code pour OX40 ligand (OX40 L). Nous avons voulu déterminer la contribution fonctionnelle d'OX40L au phénotype de la ScS en évaluant l'efficacité d'une thérapie ciblée anti-OX40L dans la ScS, dans différents modèles murins complémentaires de la maladie.

1. Le blocage d'OX40L prévient la fibrose inflammatoire et la vasculopathie

Bloquer OX40-OX40L s'est avéré prometteur dans des modèles précliniques d'encéphalomyélite auto-immune, de polyarthrite rhumatoïde, de colite inflammatoire, de réaction du greffon contre l'hôte et d'asthme (431,434,436,440,454,458,461,481), mais ce traitement n'avait jamais été étudié dans la ScS.

Dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde, l'utilisation d'un anticorps anti-OX40 fab pégylé, bloquant la liaison d'OX40L sur les cellules exprimant OX40, a permis de prévenir l'arthrite induite par le collagène (402). L'utilisation d'une protéine de fusion soluble OX40L:Fc qui se lie à OX40 et promeut l'expression des lymphocytes T exprimant OX40, mais bloque OX40L a également empêché le développement de l'arthrite. Ces résultats suggèrent donc que c'est la voie de signalisation, médiée par OX40L qui promeut l'inflammation pathogénique et l'auto-immunité.

De plus, l'effet d'OX40L semble dépendre du fond génétique C57/BL6, comme cela a été observé dans deux études où l'hyperexpression d'OX40L entraînait respectivement une pneumopathie interstitielle avec stigmates biologiques d'auto-immunité (429) et une HTAP

(469), chez des souris de fond génétique C57/BL6 et non chez des souris de fond génétique BALB/c. Donc, des facteurs génétiques propres au fond C57/BL6 moduleraient la réponse inflammatoire dépendant d'OX40L.

C'est pourquoi, nous avons bloqué OX40L chez des souris de fond génétique C57/BL6.

Nous avons confirmé la contribution d'OX40L à la fibrose inflammatoire observée au cours de la ScS. L'inactivation et l'inhibition d'OX40L ont permis de prévenir la fibrose dermique inflammatoire dans le modèle induit par la bléomycine. L'utilisation d'un anticorps anti-OX40L a même entraîné une régression de la fibrose établie dans ce modèle, ce qui présente un intérêt thérapeutique majeur, puisque la situation en clinique est le plus souvent celle de patients se présentant avec une fibrose déjà établie. Le rôle d'OX40L dans la phase inflammatoire du remodelage matriciel a été conforté dans le modèle de cicatrisation cutanée, puisqu'il existait un retard de cicatrisation à la phase précoce du remodelage à J7 chez les souris *ox40l^{-/-}* ou les souris traitées par l'anticorps anti-OX40L à fortes doses, sans différence à la phase tardive du remodelage avec une cicatrisation obtenue dans des délais similaires dans les différents groupes. En accord avec ces données suggérant un effet du blocage d'OX40L dans la fibrose dermique inflammatoire, le blocage d'OX40L n'a pas eu d'effet dans le modèle génétique *tsk-1*. Ce modèle représente les stades tardifs non inflammatoires de la maladie et est caractérisé par une activation endogène des fibroblastes, indépendante de l'inflammation (149,187,482). Ces données confortent donc l'hypothèse qu'un environnement inflammatoire est nécessaire pour qu'OX40L exerce ses effets pro-fibrotiques.

Même si l'atteinte fibrosante dermique altère le pronostic fonctionnel des patients et est souvent le critère d'évaluation principal dans les essais cliniques, ce sont les atteintes d'organes (fibrose pulmonaire et HTAP) qui grèvent le pronostic vital des malades (21). Notre approche a donc été enrichie par l'utilisation de souris transgéniques *Fra2* qui sont un nouveau modèle de ScS et qui présentent l'avantage d'associer une fibrose pulmonaire inflammatoire de type pneumopathie interstitielle non spécifique (forme la plus couramment observée au cours de la ScS) et une HTAP (176,177). L'effet de l'anticorps anti-OX40L a été remarquable dans ce contexte avec la mise en évidence au scanner et à l'histologie d'une réduction significative de la fibrose pulmonaire et également d'une diminution du remodelage vasculaire et des signes d'HTAP. Ces résultats confortent ceux d'une étude antérieure dans laquelle les souris transgéniques pour OX40L développaient spontanément une atteinte pulmonaire de type pneumopathie interstitielle avec un infiltrat inflammatoire constitué de lymphocytes, polynucléaires neutrophiles et macrophages prédominant dans les septa alvéolaires et en péri-bronchique (429). Ces souris étaient par ailleurs caractérisées par une

auto-immunité avec une expression d'auto-anticorps anti-ADN, anticorps quasiment toujours détectés au cours de la ScS. Dans notre étude, l'aspect observé était également celui d'une pneumopathie interstitielle non spécifique avec un infiltrat inflammatoire marqué et une expression du collagène limitée, prédominant en périvasculaire, comme l'attestent les résultats obtenus en microscopie optique par génération de seconde harmonique. Le développement de cette pneumopathie interstitielle, mimant l'aspect observé au cours de la ScS, a été inhibé de manière quasi-totale par l'utilisation d'un anticorps anti-OX40L.

L'effet du blocage d'Ox40L sur le développement de l'HTAP est concordant avec les données suggérant un rôle d'Ox40L dans la macro et la micro-angiopathie (448,486,487). De plus, dans une étude, les souris transgéniques pour Ox40L, caractérisées par une hyperexpression d'Ox40L, ont développé spontanément des signes d'HTAP avec confirmation au cathétérisme cardiaque droit et à l'histologie (469). Cette HTAP différait de l'HTAP idiopathique, par une infiltration inflammatoire lymphocytaire périvasculaire marquée, comparable à celle qui est observée au cours de la ScS, mais était sévère comme le suggèrent les chiffres de pression artérielle pulmonaire avoisinant les 35 mmHg. Dans notre étude, la vasculopathie était également accompagnée d'un infiltrat inflammatoire périvasculaire majeur et l'HTAP était sévère comme l'atteste la fréquence d'occlusion des vaisseaux (43%) chez les souris traitées par l'anticorps contrôle.

Ainsi, ces données confirment le rôle d'Ox40L dans la pneumopathie interstitielle et dans l'HTAP de la ScS et sont d'une importance considérable puisqu'il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement efficace dans la fibrose pulmonaire (1,488) et que les traitements développés dans l'HTAP sont essentiellement symptomatiques, jouant sur la vasoconstriction (41).

2. Mécanismes d'action d'Ox40L

Notre étude suggère que le blocage d'Ox40L prévient la fibrose par deux mécanismes : (i) en diminuant l'infiltrat inflammatoire et la production de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques et (ii) en inhibant l'activation des fibroblastes.

a) OX40L régule l'infiltrat inflammatoire et la production de cytokines pro-fibrotiques

Nous avons observé que la protection du phénotype fibrosant s'accompagnait d'une diminution de l'infiltrat lymphocytaire T dans la peau lésionnelle des souris ox40l^{-/-} traitées par bléomycine. En accord avec ces résultats, dans les modèles murins d'asthme, de colite inflammatoire, d'encéphalomyélite, de GVHD et d'arthrite où le blocage d'OX40L a été efficace, la protection du phénotype pathogène s'accompagnait d'une diminution de l'infiltrat lymphocytaire T (431,434,436–440).

Chez les souris transgéniques pour OX40L développant une HTAP spontanée, le développement de l'HTAP s'accompagnait d'une diminution des lymphocytes T régulateurs (469). Dans la ScS, les lymphocytes T régulateurs sont diminués et leur fonction est défaillante. L'effet du blocage d'OX40L pourrait donc être également lié à une restauration de la tolérance immune, augmentant le nombre et la fonction des lymphocytes T régulateurs, prévenant le développement de la fibrose inflammatoire. Toutefois, nous n'avons pas étudié le nombre ni la fonction des lymphocytes T régulateurs présents dans le derme et les poumons des souris.

L'effet du blocage d'OX40L pourrait également être médié par une inhibition de l'interaction entre OX40 exprimé par les lymphocytes T et OX40L exprimé par les macrophages et les lymphocytes B (446), puisque les souris ox40l^{-/-}, protégées de la fibrose dermique induite par la bléomycine, présentaient une diminution de l'infiltrat lymphocytaire B et macrophagique.

Cette augmentation de l'infiltrat inflammatoire dans la peau lésionnelle peut être liée à une augmentation de la survie des lymphocytes et macrophages, comme suggéré par les voies de signalisation d'OX40L (398) ou à leur recrutement sur le site de l'inflammation par interaction entre OX40 présent sur les lymphocytes T et OX40L exprimé par les cellules endothéliales activées (en réponse à un stimulus inflammatoire). En effet, il a été montré que les lymphocytes T pouvaient infiltrer les tissus lésionnels au cours de la leucémie à cellules T ou dans des maladies inflammatoires cutanées par liaison entre OX40 présent sur les lymphocytes T activés et OX40L exprimé par les cellules endothéliales activées (404,405,489). Toutefois, les mécanismes responsables de l'infiltrat lymphocytaire dans la peau et régulés par OX40L n'ont pas été étudiés dans ce travail.

La protection du phénotype fibrotique était accompagnée d'une diminution du relargage des cytokines pro-fibrotiques IL-6 et TNF- α . En accord avec ces données, l'interaction OX40-OX40L a entraîné une augmentation de production de TNF- α et d'IL-6 par les cellules

dendritiques activées dans une étude (490) et le blocage de l'interaction par une protéine de fusion OX40-Ig a diminué la production de TNF- α dans des modèles murins de colite inflammatoire (455). De même, dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune, le relargage de l'IL-6 était diminué après invalidation d'OX40L et était augmenté chez les souris transgéniques pour OX40L (432). Le rôle de l'IL-6 dans la ScS est suggéré par plusieurs études : (i) les taux sériques d'IL-6 sont augmentés chez les patients ScS en comparaison à des sujets contrôles et sont corrélés à l'étendue de la fibrose dermique et associés à un pronostic péjoratif (356,357), (ii) *in vitro*, un anticorps anti-IL6, a réduit la production de collagène de type I dans les fibroblastes issus de patients ScS (358), (iii) *in vivo*, les souris invalidées pour l'IL-6 ou traitées par un anticorps anti-IL6 ou vaccinées contre l'IL-6 étaient protégées du développement de la fibrose dermique dans le modèle induit par la bléomycine ou par immunisation contre la topoisomérase de type 1 (358–360). Les données d'une revue suggèrent que l'IL-6 promeut la fibrose par un double effet (pro-inflammatoire et pro-fibrotique stimulant la prolifération des fibroblastes ScS et la production de collagène) (491). Le rôle du TNF- α est plus ambigu. *In vitro*, les études sont contradictoires : toutefois, la majorité met en évidence une diminution de production des constituants de la matrice extracellulaire par les fibroblastes sous l'effet du TNF- α (492). *In vivo*, sa concentration est augmentée dans la peau lésionnelle dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine et l'inhibition du TNF- α par le récepteur soluble (Etanercept) a prévenu le développement de la fibrose dermique dans ce modèle (493). L'hypothèse émise est que le TNF- α aurait un effet pro-inflammatoire activant les cellules inflammatoires à la phase initiale dans les modèles murins de la maladie. Ces cellules inflammatoires sécrèteraient ensuite des médiateurs pro-fibrotiques, responsables de l'activation secondaire des fibroblastes (492). En revanche, chez l'homme, les données suggèrent un effet anti-fibrotique du TNF- α dans la mesure où il a été rapporté une aggravation mortelle de la fibrose pulmonaire au cours de la ScS et de la polyarthrite rhumatoïde chez des patients traités par anti-TNF α (494,495).

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'invalidation d'OX40L sur le relargage de cytokines de type Th2. Le rôle pro-fibrotique des cytokines Th2, telles que l'IL-4 et l'IL10 est bien établi au cours de la ScS (158,182,215–219). Il est habituellement admis que la voie OX40-OX40L promeut la co-stimulation des lymphocytes T vers une voie Th2 (416,417). Cela a été suggéré par plusieurs études dans des modèles murins et primates d'asthme où le blocage d'OX40L était associé à une diminution de la réponse inflammatoire Th2 (418). De même, l'hyperexpression constitutive d'OX40L associée au développement spontané d'une pneumopathie interstitielle et d'une HTAP a été associée à une augmentation des cytokines

Th2, mais aussi Th17 (429,469). Dans notre étude, il y avait une tendance non significative à une diminution de l'IL-17 suite au blocage d'OX40L. Il est bien établi que la polarisation lymphocytaire induite par l'interaction OX40-OX40L dépend de l'environnement cytokinique, de la force de la stimulation par le TCR et de la dose d'antigène (414,419–421). L'environnement cytokinique inflammatoire pourrait donc expliquer l'absence d'effet du blocage d'OX40L sur les cytokines Th2 dans notre étude. Une autre hypothèse pour expliquer l'absence de diminution de cytokines Th2 et la diminution non significative de l'IL-17 dans notre travail peut être que l'augmentation de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-17 était faible et non significative après les injections de bléomycine chez les souris contrôles, ce qui peut limiter la mise en évidence d'une différence entre les souris *ox40l^{+/+}* et les souris *ox40l^{-/-}*.

Enfin, malgré les effets observés en physiologie sur le TGF- β (diminution du TGF- β)(409), nous n'avons pas mis en évidence d'hyperexpression de la voie du TGF- β dans cette étude. En accord avec nos résultats, il n'a pas été rapporté d'effet sur le TGF- β suite au blocage ou à l'hyperexpression d'OX40L dans les différents modèles murins de maladie auto-immune publiés.

b) Action sur les fibroblastes

Même si un effet direct d'OX40L sur les fibroblastes n'a pas pu être démontré dans ce travail, nous avons observé pour la première fois une expression d'OX40L par les fibroblastes. Cette expression était présente sur les fibroblastes dans la peau lésionnelle de patients ScS et également sur les myofibroblastes. Elle a été confirmée *in vitro* sur des fibroblastes dermiques de patients ScS et de témoins sains. Nos données ont suggéré que l'activation de ces fibroblastes via OX40L était médiée par AP1, puisque les myofibroblastes issus de souris *ox40l^{-/-}* soumis aux injections de bléomycine avaient une expression moindre de *c-fos* que ceux des souris *ox40l^{+/+}* traitées par la bléomycine.

Les résultats obtenus dans le modèle Tsk-1 nuancent ces résultats. Le modèle Tsk-1 est un modèle des stades tardifs non inflammatoires de la maladie (149,187,254). Dans ce modèle, les fibroblastes dermiques explants présentent un phénotype pro-fibrotique qui persiste après plusieurs passages *in vitro*. Il n'a pas été observé d'effet de l'inactivation ou de l'inhibition d'OX40L sur la fibrose non inflammatoire du modèle Tsk-1. Ainsi, le blocage d'OX40L ne semble inhiber l'activation des fibroblastes que dans un environnement inflammatoire.

c) Voies de signalisation régulées par OX40L

Nous avons identifié plusieurs voies de signalisation pro-fibrotiques régulées par OX40L dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine: l'inhibition des métalloprotéases matricielles, la voie NFκB et la voie AP-1.

Les métalloprotéases matricielles sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et sont inhibées au cours des processus de fibrose.

La voie NFκB est une voie de signalisation connue d'OX40L (398,413,496). Son rôle dans le processus de fibrose est bien établi. Elle joue un rôle clé dans la régulation de gènes impliqués dans la réaction immune et inflammatoire contribuant à l'activation secondaire des fibroblastes. Par ailleurs, elle semble impliquée dans l'accumulation du CTGF dans les fibroblastes de patients ScS (497).

Comme les données pour les métalloprotéases matricielles et NFκB étaient bien établies dans le cadre de la fibrose, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la voie de signalisation AP1 et avons confirmé l'hyperexpression de cette voie dans le derme des souris *ox40l^{+/+}* en comparaison aux souris *ox40l^{-/-}* après injections de bléomycine. Ces données sont en accord avec l'hyperexpression des ARN messagers de *c-fos* et *c-jun* observée dans les cellules endothéliales activées après liaison d'OX40L (498). Dans notre étude, *c-fos* était exprimé par les lymphocytes T, mais également par les myofibroblastes. Ces résultats suggèrent qu'OX40L pourrait réguler l'inflammation et l'activation fibroblastique par une voie de signalisation dépendante d'AP-1, dans le modèle de fibrose dermique inflammatoire.

3. Les modèles animaux de ScS

Ce travail de thèse permet également de souligner les avantages et limites des modèles animaux dans la ScS et les paramètres à prendre en compte avant d'envisager une étude *in vivo*. Une étape de ce travail de thèse a consisté à étudier l'effet du blocage d'OX40L dans un autre modèle murin complémentaire de ScS : le modèle induit par injections intra-dermiques d'acide hypochloreux (149,267). Cependant, ce modèle n'a pas été induit, ce qui a empêché toute analyse ultérieure. Cela souligne la nécessité de valider les modèles animaux et d'optimiser l'induction des modèles animaux en déterminant notamment quel fond génétique est le plus sensible au modèle considéré. C'est dans cette optique que notre travail 1 a été réalisé. La variabilité des résultats obtenus selon le fond génétique des souris est également

mise en exergue par l'observation de souris transgéniques pour OX40L qui ne développent une atteinte inflammatoire et auto-immune que sur un fond génétique de prédisposition C57/BL6 (429,469). Ainsi, avant toute étude *in vivo*, plusieurs questions doivent être posées :

- quel modèle utiliser ?

- quel fond génétique dois-je utiliser compte-tenu du modèle utilisé, de la cible évaluée (inflammatoire par exemple pour le modèle C57/BL6) et des données de la littérature ? A cette étape, une optimisation du protocole d'induction peut être nécessaire.

- comment évaluer les souris ? Et notamment est-ce que des moyens non-invasifs d'évaluation peuvent être utilisés ? Cela permettra, d'une part de promouvoir le bien-être animal en accord avec la règle des 3 R (471), mais également de mieux évaluer les traitements en déterminant le moment d'évaluation le plus adéquat. C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail 2.

Les limites des modèles animaux de ScS ne reproduisant pas tous les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la maladie (cf article de revue 1), soulignent la nécessité d'évaluer l'effet du blocage d'une potentielle cible thérapeutique dans plusieurs modèles murins complémentaires.

Enfin, la transposition des résultats obtenus dans des modèles murins à la pratique clinique a souvent été soldée par des échecs, mettant en exergue les limites des modèles animaux. Ainsi, les résultats obtenus avec des traitements anti-inflammatoires dans le modèle murin induit par la bléomycine sont en général très positifs, du fait d'un infiltrat dermique inflammatoire majeur dans ce modèle.

Par exemple, les anti-TNF α apparaissaient comme un traitement prometteur de la ScS, puisque les taux de TNF- α sont augmentés dans la peau fibrotique murine et que l'inhibition du TNF- α par le récepteur soluble (Etanercept) a prévenu le développement de la fibrose dermique induite par la bléomycine (493). Cependant, chez l'homme, ces données n'ont pas été confirmées et il a même été rapporté une aggravation mortelle de la fibrose pulmonaire sous anti-TNF α chez des patients atteints de ScS et de polyarthrite rhumatoïde (494,495).

Récemment, les essais portant sur l'imatinib mesylate n'ont pas confirmé les données des modèles murins. Les données obtenues *in vivo* dans des modèles murins étaient très prometteuses avec à la fois une prévention de la fibrose inflammatoire et non inflammatoire mais aussi une guérison de la fibrose établie des souris traitées (499). Ceci a conduit à des essais thérapeutiques préliminaires qui pouvaient laisser espérer une efficacité de l'imatinib mesylate même si la tolérance n'était pas très bonne. Toutefois, dans les essais contrôlés randomisés en double aveugle, l'imatinib mesylate s'est avéré inefficace pour améliorer la fibrose dermique et a été associé à une tolérance médiocre (332,333).

4. Transposition à la recherche clinique : le blocage d'OX40L : un traitement prometteur de la ScS

a) Avantages d'une thérapie ciblée anti-OX40L

Nos résultats démontrent que le blocage d'OX40L prévient le développement de la fibrose dermique, pulmonaire et de l'HTAP inflammatoires dans des modèles murins complémentaires de ScS. Cela a une implication thérapeutique directe puisqu'un anticorps humain monoclonal anti-OX40L est disponible (462). Un avantage du blocage d'OX40L repose sur son mode d'action : le couple OX40-OX40L présente une fenêtre d'expression étroite (399,500). OX40 n'est exprimé que sur les lymphocytes T activés spécifiques d'un antigène et non sur les lymphocytes T naïfs avec une expression restreinte au site inflammatoire. Ainsi, le blocage de l'interaction OX40-OX40L permettrait d'inhiber uniquement les lymphocytes T pathogènes récemment activés en réponse à l'(auto-) antigène et présents sur le site inflammatoire, sans diminuer le pool des autres lymphocytes, contrairement à ce qui est habituellement observé avec les autres traitements immunosuppresseurs conventionnels (402,460,496,500,501). Cet effet ciblé permettant d'éviter une immunosuppression globale a déjà été démontré dans des modèles animaux de pathologies auto-immunes, inflammatoires, allergiques et même infectieuses (398,399,460). Il est donc émis l'hypothèse que ce traitement permettrait de limiter le risque infectieux auquel exposent les autres immunosuppresseurs (502).

b) Etapes préliminaires et limites à l'utilisation d'un anticorps anti-OX40L dans la ScS

Tout d'abord, le moment idéal pour instaurer ce traitement devra être déterminé. Il semblerait que l'expression d'OX40L par les lymphocytes T soit un élément précoce voire initiateur dans le développement de la maladie auto-immune, précédent les signes cliniques, comme l'attestent les données obtenues dans des modèles animaux d'arthrite induite par injection d'adjuvant et d'encéphalomyélite auto-immune (441,442). De plus, dans un modèle de diabète auto-immun, le moment du blocage d'OX40L est apparu comme crucial, puisque le blocage à 6,9 ou 15 semaines après la naissance avait peu d'effets sur la maladie, tandis qu'un traitement instauré à la 12ème semaine a réduit l'incidence du diabète (433).

Par ailleurs, les différences d'expression d'OX40 entre les souris et les hommes incitent à la prudence avant de transposer les résultats obtenus dans des modèles murins à l'homme (414). Par exemple, l'expression d'OX40 est constitutive sur les lymphocytes T régulateurs chez la souris, tandis qu'elle est uniquement inductible chez l'homme.

Enfin, le couple OX40-OX40L est impliqué dans les processus anti-infectieux et joue un rôle dans l'immunité anti-tumorale (503). Les patients avec déficit immunitaire combiné par déficit en OX40 présentent un risque accru de sarcome de Kaposi et de leishmaniose viscérale (504). Ces données soulèvent donc la question du risque infectieux et néoplasique chez les patients recevant un anticorps anti-OX40L. Toutefois, les souris invalidées pour OX40L n'ont pas un risque infectieux, notamment de leishmaniose, accru (505) et cet effet secondaire n'a pas été observé au cours de l'essai clinique évaluant un anticorps anti-OX40L dans l'asthme modéré (462).

La question de l'immunogénicité d'un traitement par anticorps peut également être soulevée avec un risque d'anticorps anti-produit. Cet effet secondaire avait été rapporté au cours du développement d'une protéine de fusion OX40L-Fc (506), mais n'a pas été observé avec l'anticorps anti-OX40L (462). L'alternative serait l'utilisation de petites molécules interférant avec la liaison OX40-OX40L (507).

Enfin, le spectre d'action d'OX40L demeure partiellement connu; ainsi le blocage d'OX40L pourrait exposer à des effets secondaires inattendus. Par exemple, le blocage d'OX40L dans un modèle d'arthrite induite par le collagène a été associé à une réduction de l'ostéoclastogénèse avec, chez les souris invalidées pour OX40L, des os plus fins et plus petits que les souris contrôles (402).

5. Premières expériences en pathologie humaine

Les premières expériences en thérapie humaine ont été obtenues dans l'asthme. Bien que les études pré-cliniques aient montré un effet bénéfique du traitement (418,461), les résultats d'un essai clinique de phase II sont décevants (462).

Dans cette étude, il a été observé un effet pharmacologique du blocage d'OX40L avec une diminution de la concentration sérique en IgE totales et du nombre d'éosinophiles dans les expectorations. Toutefois, il n'y a pas eu d'effet clinique à 4 mois.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cet échec : une sélection inadéquate des patients inclus dans cette étude avec des formes trop modérées et/ou non caractérisées par

une hyperexpression de l'axe OX40-OX40L, une posologie (8 mg/kg à J1 puis 4 mg/kg tous les mois pendant 3 mois), une fréquence ou une durée insuffisantes du traitement.

Enfin, dans certains modèles animaux, la protection complète du phénotype était obtenue uniquement si plusieurs voies de signalisation étaient bloquées, par exemple OX40 et CD28 (508,509) ou OX40 et CD30 (459). Ainsi, peut-être que l'absence d'efficacité de l'anticorps anti-OX40L dans l'asthme est lié à un blocage incomplet des voies de costimulation. Il reste donc à déterminer si dans l'approche en pathologie humaine, il serait nécessaire de bloquer plusieurs voies de co-stimulation de manière simultanée.

II. Perspectives

1. Mécanismes impliqués

Nous avons observé que l'inactivation d'Ox40L et la protection du phénotype fibrosant étaient associées à une diminution de l'infiltrat lymphocytaire T. D'après les données de la littérature, Ox40L joue un rôle dans la survie des lymphocytes T (407,415). Pour mieux préciser si le blocage d'Ox40L est associé à une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T, des immunomarquages pour la caspase 3 clivée identifiant les cellules apoptotiques et le CD3 marquant les lymphocytes T sur des coupes de peau de souris *ox40l^{+/+}* et *ox40l^{-/-}* ayant reçu de la bléomycine seront réalisés. Les cellules doublement marquées correspondront aux lymphocytes T en apoptose. La diminution de prolifération des lymphocytes T pourra également être évaluée par immunomarquage pour le ki67, marqueur de prolifération, et le CD3 (co-marquage).

Le développement d'une HTAP *de novo* chez des souris transgéniques pour Ox40L a été associé à une diminution des lymphocytes T régulateurs (469). L'effet du blocage d'Ox40L sur les lymphocytes T régulateurs sera évalué par des immunomarquages pour le CD3 et Foxp3 sur des coupes de poumon de souris *fra-2* traitées par l'anticorps contrôle ou l'anticorps anti-Ox40L.

En physiologie, il est suggéré que l'interaction Ox40-Ox40L diminue la production de TGF- β . Afin de mieux préciser l'effet du blocage d'Ox40L sur la signalisation dépendante du TGF- β , des marquages pour phosphoSMAD2/3 seront réalisés sur les coupes de peau des souris.

Par ailleurs, l'infiltrat inflammatoire sera également évalué par marquage immunohistochimique dans les poumons des souris fra-2 traitées par anticorps anti-OX40L ou anticorps contrôle afin de mieux caractériser cette inflammation en déterminant le type de cellules impliquées (macrophages, cellules mastocytaires, lymphocytes T ou B). L'expression de l'IL-6, de MCP-1 et de MIF (facteur inhibant la migration des macrophages) sera également évaluée afin de déterminer quels sont les médiateurs impliqués dans le recrutement inflammatoire et modulés par AP-1.

Une étude protéomique des sérums de souris fra-2 pourra également être réalisée afin d'identifier de nouvelles cibles protéiques, différenciellement exprimées entre les souris ayant développé une fibrose pulmonaire et celles n'en ayant pas et entre celles ayant une HTAP et celles n'en ayant pas développé. Cette approche pourrait permettre d'identifier des voies de signalisation régulées par OX40L et impliquées dans le développement de la pneumopathie interstitielle et de l'HTAP. Cette étude permettra également de mettre en évidence de potentiels biomarqueurs de fibrose pulmonaire ou d'HTAP.

L'effet d'OX40L sur l'activation des fibroblastes et la synthèse de collagène devra être précisé. Pour ce faire, le modèle de fibrose induite par la bléomycine pourra être réalisé sur des souris présentant une invalidation sélective d'OX40L dans les fibroblastes. Cette sous-expression sélective pourra être induite par croisement entre des souris recombinantes *colla2-cre-loxP* (avec induction de la recombinaison suite à des injections de tamoxifène) et des souris *ox40l^{-/-}*. L'effet direct d'OX40L sur les fibroblastes sera donc confirmé si ces souris sont protégées de la fibrose induite par la bléomycine.

L'effet d'OX40L sur les fibroblastes sera également évalué *in vitro* dans des co-cultures fibroblastes issus du derme de souris *ox40l^{+/+}* et *ox40l^{-/-}* et lymphocytes T (exprimant donc OX40). La synthèse du collagène en milieu basal et après stimulation par différentes cytokines pro-fibrotiques (TGF- β , IL-6, TNF- α) sera comparée dans ces 2 types de co-culture par PCR quantitative pour l'ARN messager de *coll1a1* et de *coll1a2* et par la technique sircol. L'implication de la voie AP-1 sera précisée par western blot pour c-fos et c-jun.

Afin d'évaluer l'effet d'OX40L sur des fibroblastes humains, des co-cultures de lymphocytes T avec des fibroblastes humains (provenant de lignées) invalidés pour OX40L par transfection d'un SiRNA seront réalisées. La production de collagène, évaluée par PCR du collagène et sircol assay sera comparée à celle de fibroblastes contrôles non transfectés, en conditions basales et après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques. Le rôle de la voie AP-1 pourra également être évalué par western blot pour c-fos et c-jun.

Afin de reproduire au mieux la situation *in vivo*, ces co-cultures de fibroblastes-lymphocytes T seront réalisées en 3 dimensions, pour évaluer les interactions entre OX40 et OX40L exprimé par les fibroblastes incorporés dans une matrice extracellulaire et soumis au stress mécanique.

2. Rôle dans la ScS : évaluation dans d'autres modèles murins complémentaires.

La physiopathologie de la ScS fait intervenir trois mécanismes physiopathologiques principaux : la vasculopathie, la dysimmunité et la fibrose.

Dans notre travail, l'effet sur l'auto-immunité et notamment la production d'anticorps n'a pas été étudié car les souris fra-2 ne constituent pas un modèle d'auto-immunité (149,176,177).

L'effet de l'anticorps anti-OX40L sur l'auto-immunité a été suggéré par plusieurs études : les souris transgéniques pour OX40L ont des taux sériques élevés d'auto-anticorps anti-nucléaires; dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde, l'administration d'un anticorps neutralisant anti-OX40L à des souris déjà immunisées a diminué de manière significative la sévérité de l'arthrite induite par le collagène ainsi que le taux d'anticorps spécifiques (402,436). Cet effet a également été observé dans un modèle murin de syndrome IPEX (459). Le rôle de l'interaction OX40-OX40L sur la production d'auto-anticorps a également été souligné dans le lupus, où il est suggéré que l'axe OX40-OX40L constituerait une boucle d'amplification pour la genèse d'auto-anticorps (446). D'autres études pré-cliniques sur des modèles murins complémentaires de ScS présentant une auto-immunité devront être réalisées. On sait que l'effet pro-inflammatoire et auto-immun d'OX40L est obtenu sur des souris de fond génétique C57/BL6 (429,469). L'effet du blocage d'OX40L sur l'auto-immunité devra donc être évalué dans un modèle murin mimant l'auto-immunité de la ScS et induit sur un fond génétique C57/BL6. Le modèle induit par les injections d'acide hypochloreux habituellement réalisé sur des souris de fond génétique BALB/c n'apparaît donc pas comme un modèle optimal pour cette étude. Le modèle d'immunisation contre la topoisomérase I, réalisé sur un fond génétique C57/BL6, apparaît comme pertinent dans ce contexte (510). Ce modèle présente comme intérêt majeur d'associer une atteinte fibrosante et une auto-immunité avec production d'anticorps anti-topoisomérase I. Ces souris miment donc le phénotype sévère de la ScS : forme cutanée diffuse avec anticorps anti-topoisomérase I et fibrose pulmonaire, forme de ScS associée à un pronostic péjoratif et un risque de mortalité augmenté. Par ailleurs, ce modèle est caractérisé par une augmentation de la production d'IL-

17 avec une augmentation des lymphocytes T Th2 et Th17 dans le lavage broncho-alvéolaire des souris immunisées. Les souris transgéniques pour OX40L, développant spontanément une pneumopathie interstitielle et une HTAP, étaient caractérisées par une augmentation des cytokines Th2 et Th17 (469,511). L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-OX40L dans ce modèle permettra donc de mieux préciser l'effet du blocage d'Ox40L sur la production de cytokines Th2 et Th17.

Par ailleurs, l'atteinte cardiaque est une cause majeure de décès au cours de la ScS. Nous n'avons pas observé d'atteinte myocardique chez nos souris fra-2, contrairement à une étude préliminaire (396). Le blocage d'Ox40L pourra être évalué dans le modèle de souris invalidées pour le récepteur activateur plasminogène type urokinase (uPAR) (179,180) qui est le seul modèle murin de ScS (excepté fra-2) à présenter une cardiopathie mimant celle observée au cours de la ScS avec fibrose myocardique et apoptose endothéliale (180). Ces souris ont un fond génétique C57/BL6.

3. Evaluation du blocage d'Ox40L dans d'autres maladies fibrosantes

Il est désormais bien établi que les maladies fibrosantes présentent des mécanismes physiopathologiques communs, avec une part inflammatoire probablement initiale et une activation secondaire des cellules mésenchymateuses en myofibroblastes, produisant de grandes quantités de matrice extracellulaire avec pour résultante la fibrose tissulaire (502).

Afin de préciser le rôle joué par Ox40-Ox40L dans la fibrose, l'anticorps anti-Ox40L sera évalué dans d'autres modèles expérimentaux de fibrose touchant d'autres organes. Le premier modèle étudié sera un modèle murin de cirrhose biliaire primitive, puisque la ScS et la cirrhose biliaire primitive présentent la particularité d'être deux maladies auto-immunes fibrosantes, que les patients ScS ont un risque accru de développer une cirrhose biliaire primitive (17) et que ces deux maladies présentent un fond génétique commun (512). Ceci suggère donc l'existence de mécanismes physiopathologiques communs à ces deux maladies. Toutefois, *TNFSF4* n'a pas été identifié comme facteur de susceptibilité génétique pour la cirrhose biliaire primitive dans une étude gène candidat préliminaire (513).

L'anticorps anti-Ox40L sera évalué sur un modèle validé de cirrhose biliaire primitive, induit sur un fond génétique C57/BL6, le modèle d'immunisation par l'acide 2-octynoïque couplé à la sérum albumine qui est caractérisé par une inflammation portale associée à la production à titre élevé d'auto-anticorps anti-mitochondries (514). Par ailleurs, un effet du blocage

d'OX40L dans ce modèle peut être attendu car l'utilisation du CTLA4-Ig, bloquant la co-stimulation du lymphocyte T, a permis de prévenir mais aussi de faire régresser la cirrhose biliaire primitive établie dans ce modèle.

4. Perspectives sur le plan thérapeutique

Afin de transposer nos résultats à la recherche clinique, un essai « proof-of-concept » de l'anticorps anti-OX40L dans la ScS pourra être réalisé. Il s'agira d'un essai randomisé, en double aveugle, contrôlé contre placebo incluant des formes sévères (formes cutanées diffuses) et précoces de ScS, dans la mesure où OX40L est impliqué dans la phase inflammatoire de la fibrose.

Les critères d'inclusion seront des formes cutanées diffuses selon la classification Leroy (3), un score modifié de Rodnan >14 à l'inclusion et une maladie évoluant depuis moins de 3 ans. Les patients ne devront pas recevoir d'autre traitement immunosuppresseur ; une dose stable de corticoïdes sera tolérée. L'anticorps sera administré selon les mêmes modalités que dans l'essai thérapeutique sur l'asthme (462), à savoir 8mg/kg à J1 par voie intraveineuse puis par perfusions mensuelles à la dose de 4mg/kg. Un placebo sera administré par voie intraveineuse dans le groupe contrôle, selon les mêmes modalités.

Le critère principal de jugement sera le changement du score cutané de Rodnan à 6 mois. Des critères secondaires seront également évalués: progression sur le plan pulmonaire définie par une diminution de capacité vitale forcée de plus de 10%, progression sur le plan cutané définie par une augmentation du score de Rodnan de plus de 25%, survenue d'une atteinte d'organe sévère (crise rénale sclérodermique, atteinte cardiaque *de novo* avec dysfonction ventriculaire gauche inférieure à 50%, développement d'une HTAP *de novo* confirmée au cathétérisme cardiaque droit, atteinte intestinale nécessitant une hospitalisation ou une nutrition parentérale, atteinte articulaire sévère avec gonflement de plus de 6 articulations), survenue d'un ulcère digital, effet sur le syndrome de Raynaud, scores de qualité de vie, paramètres biologiques de l'inflammation et taux sériques d'OX40L à baseline et à 6 mois.

La tolérance sera évaluée en recueillant les effets secondaires cliniques et une surveillance biologique standard sera effectuée. Le suivi sera mensuel.

Au minimum, 35 patients devront être inclus par groupe pour espérer mettre en évidence une différence de 5 points dans le score de Rodnan avec une puissance de 80% et un risque alpha de 0,025.

Ainsi, cette étude « proof-of-concept » permettra d'évaluer l'effet du blocage d'OX40L à court terme dans la ScS et également de déterminer si un taux sérique élevé à l'inclusion d'OX40L soluble peut être prédictif d'une réponse thérapeutique.

D'autres études à long terme pourront ensuite être réalisées, en évaluant notamment l'intérêt de traitements combinés ciblant plusieurs aspects de la maladie, comme un traitement par anticorps anti-OX40L associé à un traitement inhibant le remodelage matriciel, comme les inhibiteurs de tyrosine kinases.

5. Perspectives sur le plan physiopathologique

Nos résultats renforcent l'idée que la phase inflammatoire dysimmunitaire joue un rôle clé dans le développement de la fibrose.

Malgré ces progrès, les avancées dans la connaissance de la ScS sont limitées par plusieurs facteurs : (i) le caractère orphelin de cette maladie, (ii) la diversité des formes cliniques avec des atteintes et une sévérité de la maladie variables selon les patients. Cela rend difficile la constitution d'un groupe de patients homogènes, nécessaire à l'identification des facteurs génétiques impliqués dans le développement d'un phénotype précis, (iii) la difficulté à identifier les facteurs environnementaux, (iv) le caractère multigénique de la maladie avec plusieurs facteurs de susceptibilité génétique, ayant chacun un poids faible et (v) l'imperfection des modèles animaux de la maladie ne reproduisant pas toutes les caractéristiques de la maladie.

La contribution fonctionnelle d'OX40L à différentes maladies auto-immunes avec différents phénotypes cliniques a déjà été démontrée *in vivo* (402,431,434,436,440,462). Donc un même facteur de susceptibilité génétique est impliqué dans la survenue de maladies très diverses, avec des phénotypes variés. Cela soulève la question du rôle des facteurs environnementaux, de l'interaction gène-environnement et de la combinaison des facteurs de susceptibilité génétique entraînant le développement d'une maladie auto-immune, plutôt qu'une autre.

CONCLUSION

La ScS est une maladie systémique auto-immune orpheline. Elle est caractérisée par une atteinte vasculaire, une atteinte inflammatoire auto-immune et une fibrose touchant la peau et les organes internes. Il s'agit d'une maladie sévère associée à une surmortalité et il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement efficace pour prévenir ou guérir la fibrose irréversible. Une meilleure connaissance de la physiopathologie de la maladie avec mise en évidence du rôle clé de la phase inflammatoire dysimmunitaire et les progrès récents accomplis dans le domaine de l'immunorhumatologie incitent au développement de thérapies ciblées dans la ScS.

Nous nous sommes intéressés à une thérapie anti-OX40L, qui est impliqué dans les voies de co-stimulation du lymphocyte T, pour plusieurs raisons : *TNFSF4* codant pour OX40L est un facteur de susceptibilité génétique pour la ScS, le blocage d'OX40L a montré son efficacité dans d'autres modèles pré-cliniques de maladies auto-immunes et OX40L présente l'avantage d'être spécifique de l'antigène pathogène et d'avoir une fenêtre d'expression étroite dans le temps et restreinte au site inflammatoire, évitant ainsi de dépleter l'ensemble du pool lymphocytaire. Le blocage de cette voie pourrait donc entraîner moins de risques infectieux que les autres traitements immunosuppresseurs. Une première partie de ce travail a consisté en l'optimisation des méthodes d'induction et d'évaluation du modèle murin de fibrose dermique induite par la bléomycine, pré-requis nécessaire à l'évaluation d'un traitement potentiel de la ScS. L'étude pré-clinique a ensuite consisté à évaluer l'efficacité d'une thérapie ciblée anti-OX40L dans des modèles murins complémentaires de ScS, reproduisant ensemble les différents mécanismes physiopathologiques de la ScS. Nous avons montré que le blocage d'OX40L permettait de prévenir la fibrose inflammatoire touchant la peau et le poumon, ainsi que l'atteinte vasculaire observée au cours de la ScS. Ainsi, ce travail souligne le rôle de la phase inflammatoire dans la physiopathologie de la ScS et l'intérêt de l'immunothérapie anti-OX40L dans le traitement de la ScS et des maladies fibrosantes.

EXTENDED REPORT

A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study

Muriel Elhai,¹ Jérôme Avouac,¹ Ulrich A Walker,² Marco Matucci-Cerinic,³ Gabriela Riemekasten,⁴ Paolo Airò,⁵ Eric Hachulla,⁶ Gabriele Valentini,⁷ Patricia E Carreira,⁸ Franco Cozzi,⁹ Alexandra Balbir Gurman,¹⁰ Yolanda Braun-Moscovici,¹⁰ Nemanja Damjanov,¹¹ Lidia P Ananieva,¹² Raffaella Scorza,¹³ Sergio Jimenez,¹⁴ Joanna Busquets,¹⁴ Mengtao Li,¹⁵ Ulf Müller-Ladner,¹⁶ André Kahan,¹ Oliver Distler,¹⁷ Yannick Allanore,¹ EUSTAR co-authors

Handling editor Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206386>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr Yannick Allanore,
Paris Descartes University,
Rheumatology A Department,
Cochin Hospital, 27 rue du
Faubourg Saint Jacques,
Paris 75014, France;
yannick.allanore@cch.aphp.fr

Received 30 July 2014
Revised 20 September 2014
Accepted 5 October 2014

ABSTRACT

Objectives In agreement with other autoimmune diseases, systemic sclerosis (SSc) is associated with a strong sex bias. However, unlike lupus, the effects of sex on disease phenotype and prognosis are poorly known. Therefore, we aimed to determine sex effects on outcomes.

Method We performed a prospective observational study using the latest 2013 data extract from the EULAR scleroderma trials and research (EUSTAR) cohort. We looked at (i) sex influence on disease characteristics at baseline and (ii) then focused on patients with at least 2 years of follow-up to estimate the effects of sex on disease progression and survival.

Results 9182 patients with SSc were available (1321 men) for the baseline analyses. In multivariate analysis, male sex was independently associated with a higher risk of diffuse cutaneous subtype (OR: 1.68, (1.45 to 1.94); $p < 0.001$), a higher frequency of digital ulcers (OR: 1.28 (1.11 to 1.47); $p < 0.001$) and pulmonary hypertension (OR: 3.01 (1.47 to 6.20); $p < 0.003$). In the longitudinal analysis ($n = 4499$), after a mean follow-up of 4.9 (± 2.7) years, male sex was predictive of new onset of pulmonary hypertension (HR: 2.66 (1.32 to 5.36); $p = 0.006$) and heart failure (HR: 2.22 (1.06 to 4.63); $p = 0.035$). 908 deaths were recorded, male sex predicted deaths of all origins (HR: 1.48 (1.19 to 1.84); $p < 0.001$), but did not significantly account for SSc-related deaths.

Conclusions Although more common in women, SSc appears as strikingly more severe in men. Our results obtained through the largest worldwide database demonstrate a higher risk of severe cardiovascular involvement in men. These results raise the point of including sex in the management and the decision-making process.

INTRODUCTION

Autoimmune diseases include more than 70 different disorders, affecting over 5% of the population of the Western countries. They are a well-known cause of morbidity and mortality.¹ One of the major shared features among most autoimmune diseases is the predominance of women, with >80%

of affected individuals being women.¹ Even though the female predisposition has been known for a long time, the mechanisms by which sex influences disease expression remain unknown. A better understanding of such effects could help towards a better stratification of the factors leading to a wide range of clinical manifestations, particularly identifying cases more likely to progress or to present severe damages and to develop novel targeted therapies and ultimately personalised medicine.¹⁻³

Systemic sclerosis (SSc) is a complex multiorgan disease affecting the immune system, the microvascular system and the connective tissue.⁴⁻⁵ In agreement with other autoimmune diseases, SSc is associated with a strong sex bias.⁶ The various available worldwide cohorts usually report a female predominance with between four and nine affected women for one man.⁷⁻¹¹ However, data about the effects of sex on disease characteristics and outcomes are scarce. The very few published data were mainly obtained in non-European patients (North American or Japanese) and revealed conflicting results regarding the impact of sex on disease severity and survival.¹²⁻¹⁷ So far, large epidemiological studies are missing, particularly in European populations. Two independent studies, each based on about 1000 European patients, suggested that male gender could be a risk factor for mortality,^{8, 18} but data were provided on distinct disease manifestations. In another autoimmune disease, systemic lupus erythematosus (SLE), large prospective data have well documented that male patients have more often a severe disease and greater organ progression than female patients.¹⁹⁻²² Whether a similar effect occurs in SSc remains unknown. Therefore, we aimed (i) to clarify the impact of sex on SSc phenotype: time of occurrence, autoantibodies and organ involvements and (ii) to investigate the impact of sex on disease outcomes including severe damages and mortality, in a large European population. This is now made possible by the implementation of the systematic longitudinal follow-up of patients with SSc included in the EULAR scleroderma trials and research (EUSTAR) registry. Based on annual visits, on a prospective

To cite: Elhai M, Avouac J, Walker UA, et al. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2014-206386

Clinical and epidemiological research

manner, this large database provides a powerful tool to investigate prognostic factors.

METHODS

All data for patients registered in the EUSTAR database as of November 2013 were exported.

In all, 9182 patients, fulfilling the 2013 American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism (ACR/ EULAR) criteria for SSc, were available for baseline analyses. We analysed the baseline and follow-up visit data using the pre-defined annual data collection protocol. We also looked at difference in sex bias according to age at disease onset by dividing the cohort in decades (disease onset <30 years, between 30 and 40, 40–50, 50–60 and >60 years).

Impact of sex on phenotype at baseline

We looked at sex influence on age at disease onset, disease subtype and disease phenotype at baseline. We also compared nailfold capillaroscopic patterns (ie, early, active and late pattern) between men and women.^{2,3}

Impact of sex on disease outcomes

For the patients with follow-up, we focused on those having at least 2 years of follow-up after baseline to estimate the predictive value of sex on disease outcomes including mortality and disease progression. For mortality, analysis was based on the whole cohort (n=9182). Causes of death were separated in SSc related and SSc unrelated.

For disease progression, we focused on severe organ involvement (new digital ulcers (DU)), new onset of pre-capillary pulmonary hypertension (PH) on right heart catheterisation, new onset of reduction of the left ventricular ejection fraction (LVEF) to below 50% as assessed by echocardiography, new occurrence of scleroderma renal crisis (SRC), new onset or worsening of pulmonary fibrosis on X-rays and/or high-resolution CT (HRCT) and deterioration of lung volume ($\geq 10\%$ of forced vital capacity (FVC) during follow-up).

Statistical analysis

A multivariate stepwise logistic regression analysis was performed with calculation of OR estimates and 95% CIs. We applied Bonferroni correction for multiple comparisons (adjusted probability value=0.003) at baseline.

Predictors of disease progression were evaluated by univariate and multivariate Cox proportional hazards models and summarised as HRs and 95% CI. A p value <0.05 was considered statistically significant in the multivariate Cox models.

Further details are provided in online supplementary materials.

RESULTS

The study began at entry to EUSTAR database. In all, 1321/9182 (14.4%) patients with SSc were men and 4756/5260 (90.4%) were white patients. The sex ratio was six women affected for one man. There were 3359/9149 (36.7%) diffuse cutaneous forms. In diffuse cutaneous forms, the sex ratio women/men was 4:1, whereas it was 9:1 in limited cutaneous subtypes. Sex bias was similar whatever age at disease onset, with a sex ratio women/men respectively equal to 8:1 before 30 years, 6:1 between 30 and 60 years and 5:1 after 60 years (figure 1).

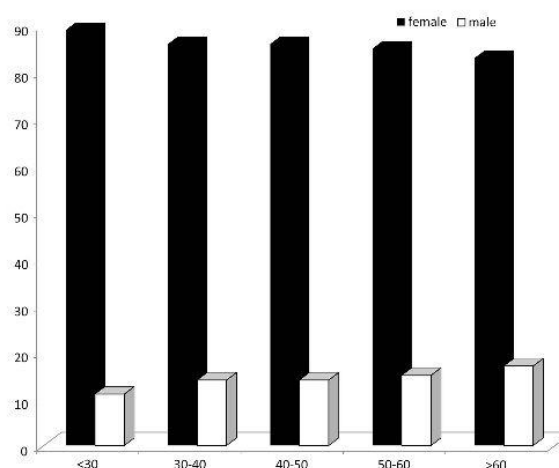


Figure 1 Sex bias according to age at disease onset. In abscissa, there are different ages at disease onset, whereas in ordinate, we can find incidence of disease in per cent. The percentage of women was 89 in the group with disease onset below 30 years, 86 in both 30–40 years and 40–50 years, 85 in the group with disease onset between 50 and 60 years and 83 in the group with disease onset after 60 years.

Disease characteristics at baseline

At baseline, mean age (\pm SD) was 54.3 (13.9) years, whereas mean disease duration (\pm SD) was 8.5 (9.0) years. Lung fibrosis was detected in 3507/8574 patients, with a diagnosis based on HRCT in 2659 patients (1190 patients had lung fibrosis on HRCT) and on X-rays for the remaining 2915 patients (2317 with lung fibrosis). Right heart catheterisation had been performed in 195 patients (2% of the cohort), revealing pre-capillary PH in 54 patients. However, as right heart catheterisation was only performed in patients with a suspicion of PH, we considered the entire cohort to estimate prevalence of PH.

In univariate analysis, a large number of characteristics were associated with male sex. There was no high association between variables (Cramer's V <0.6).

In multivariate analysis, only variables with >70% of the data available were included. In the multivariate model, adjusted on age, disease duration and anti-Scl70 antibodies, male sex was independently associated with a more severe phenotype as reflected by a higher risk of diffuse cutaneous form (OR: 1.68; 95% CI (1.45 to 1.94), $p < 0.001$), a more active disease (Valentini score ≥ 3) (OR: 1.39 (1.13 to 1.70), $p < 0.003$) and a higher risk of creatine kinase elevation (OR: 1.93 (1.58 to 2.36), $p < 0.001$). Men were also characterised by a more severe vascular phenotype with an independent association with DU (OR: 1.28 (1.11 to 1.47), $p < 0.001$) and PH (OR: 3.01 (1.47 to 6.20), $p < 0.003$). Women had higher frequencies of anticentromere antibodies (ACA) positivity and of gastrointestinal involvement. Further details are provided in table 1.

Concerning nailfold capillaroscopy results (information available for 20% of the cohort), 264/305 (86.6%) men and 1411/1559 (90.5%) women had a scleroderma pattern ($p < 0.05$). Women displayed more frequently an early pattern (279/1085 (25.7%) vs 40/210 (90.5%); $p < 0.05$), whereas men were characterised by an active pattern (103/210 (49.0%) vs 458/1085 (42.2%); $p < 0.05$). There was no significant difference regarding the late pattern (67/210 (31.9%) vs 348/1085 (32.1%); $p = \text{NS}$) (information missing in 54 men and 326 women). After adjusting for disease duration, sex was not associated with a capillaroscopic pattern.

Table 1 Results of the univariate and multivariate analyses (adjusted on age, disease duration and anti-Scl70 antibodies) comparing men and women with SSc at baseline (n=9182 patients)

Characteristics	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Men	Women	p Value	N available data (%)	OR, 95% CI	p Value*
Age at disease onset (years) (mean (SD)) (n available)	47.1 (14.2) (1153)	45.7 (14.2) (6810)	0.002	7963 (86.7%)		NS
Age (years) (mean (SD)) (n available)	52.7 (13.8) (1319)	54.5 (13.9) (7858)	<0.001	9177 (99.9%)		NS
Disease duration (years) (mean (SD)) (n available)	5.1 (6.5) (1152)	8.1 (8.2) (6808)	<0.001	7960 (86.7%)		NS
Diffuse cutaneous subtype	721/1317 (54.7%)	2638/7832 (33.7%)	<0.001	9149 (99.6%)	1.68 (1.45 to 1.94)	<0.001
Modified Rodnan skin score ≥ 14 †	274/681 (40.2%)	1327/4531 (29.3%)	<0.001	5212 (56.8%)		
Raynaud's phenomenon	1253/1305 (96.0%)	7509/7781 (96.5%)	NS	9086 (98.9%)		
Scleroderma puffy fingers	296/657 (45.0%)	1450/3385 (42.8%)	0.314	4042 (44.0%)		
ACA antibodies	195/1248 (15.6%)	2647/7748 (34.2%)	<0.001	8996 (98.0%)	0.45 (0.37 to 0.54)	<0.001
Anti-Scl70+ antibodies	573/1247 (46.0%)	2540/7367 (34.5%)	<0.001			
Valentini score ≥ 3 ^{2,4}	221/1321 (16.7%)	740/7861 (9.4%)	<0.001	9182 (100%)	1.39 (1.13 to 1.70)	<0.003
CRP elevation†	200/622 (32.1%)	643/3196 (20.1%)	<0.001	3818 (41.6%)		
Oesophageal symptoms	791/1314 (60.2%)	5230/7822 (66.9%)	<0.001	9136 (99.5%)	0.80 (0.69 to 0.93)	<0.003
Stomach symptoms	255/1305 (19.5%)	1909/7792 (24.5%)	<0.001	9097 (99.1%)	0.74 (0.61 to 0.88)	<0.003
Intestinal symptoms	239/1310 (18.2%)	1935/7804 (24.8%)	<0.001	9114 (99.3%)	0.68 (0.57 to 0.82)	<0.001
Joint synovitis	205/1312 (15.6%)	1208/7791 (15.5%)	0.944	9103 (99.1%)		
Joint contracture	487/1310 (37.2%)	2368/7788 (30.4%)	<0.001	9098 (99.1%)		NS
Tendon friction rubs	178/1305 (13.6%)	679/7748 (8.8%)	<0.001	9053 (98.6%)		NS
Muscle weakness	352/1312 (26.8%)	1793/7763 (23.1%)	0.004	9075 (98.8%)		NS
Muscle atrophy	179/1306 (13.7%)	868/7748 (11.2%)	0.010	9054 (98.6%)		NS
CK elevation	193/1238 (15.6%)	547/7386 (7.4%)	<0.001	8724 (95.0%)	1.93 (1.58 to 2.36)	<0.001
Digital ulcers	535/1304 (41.0%)	2649/7774 (34.1%)	<0.001	9078 (98.9%)	1.28 (1.11 to 1.47)	<0.001
Scleroderma renal crisis	45/1310 (3.4%)	147/7796 (1.9%)	<0.001	9106 (99.2%)		NS
Proteinuria	122/1238 (9.8%)	389/7467 (5.2%)	<0.001	8705 (94.8%)	1.54 (1.21 to 1.97)	<0.001
LVEF<50%†	55/797 (6.9%)	133/4733 (2.8%)	<0.001	5530 (60.2%)		
Pericarditis	39/521 (7.5%)	174/2727 (6.4%)	NS	3248 (35.4%)		
Diastolic dysfunction	222/1204 (18.4%)	1253/7193 (17.4%)	NS	8397 (91.4%)		
Pulmonary hypertension	16/1321 (1.2%)	38/7861 (0.5%)	0.003	9182 (100%)	3.01 (1.47 to 6.20)	<0.003
Lung fibrosis	603/1231 (49.0%)	2904/7343 (39.5%)	<0.001	8574 (93.4%)		NS
Dyspnoea class III or IV	80/598 (13.4%)	355/3145 (11.3%)	NS	3743 (40.8%)		
DLCO<60†	387/974 (39.7%)	1631/5233 (31.2%)	<0.001	6207 (67.6%)		
FVC<70†	97/537 (18.1%)	357/2771 (12.9%)	0.002	3308 (36.0%)		
Arterial hypertension	287/1312 (21.9%)	1630/7811 (20.9%)	NS	9123 (99.4%)		

Results are presented as number/number of available data (%) unless stated otherwise.

Only variables with >70% of the data available were entered in multivariate analysis.

*p: significance after Bonferroni correction was obtained for a p value <0.003.

†Variables not entered in the multivariate model since the number of available data concerned <70% of the cohort.

ACA, anticentromere antibodies; disease was active if the Valentini score was ≥ 3 ; CK, creatine kinase; CRP, C-reactive protein; DLCO, carbon monoxide diffusing capacity test; FVC, forced vital capacity; LVEF, left ventricular ejection fraction; pulmonary hypertension was diagnosed on right heart catheterisation; lung fibrosis was considered if present on X-rays and/or high-resolution CT; NS, not significant; SSc, systemic sclerosis.

Clinical and epidemiological research

Impact of sex on disease outcomes

Follow-up data

In all, 4499/9182 (49.0%) patients with SSc had a recorded follow-up visit at least 2 years after inclusion. Among them, there were 652 men (14.5%) and 3847 women, resulting in a sex ratio of six women affected for one man. There were 1658/4485 (40.0%) diffuse cutaneous forms. After a mean follow-up of 4.9 (2.7) years, mean age was 58.9 (13.5) years and mean disease duration was 12.7 (8.0) years.

The sample had sufficient power for detecting impact on studied outcomes (see online supplementary table S1). Variables tested in univariate Cox proportional models were those with more than 70% of the data available in the follow-up cohort, resulting in 25 variables tested and four excluded (ie, C-reactive protein elevation, modified Rodnan skin score, LVEF below 50% and FVC below 70%). There was no significant association (Cramer's $V < 0.60$) between all the variables tested.

Organ involvements

In univariate Cox proportional models, male sex was not predictive of either occurrence of new DU or lung progression during the follow-up.

For new onset of PH, we excluded patients with PH at baseline (ie, 22 patients). New occurrence of PH during the follow-up was recorded in 71/4477 (1.6% of the cohort) (right heart catheterisation was performed in 96 patients). In the multivariate analysis, male sex appeared as a predictor of new onset of PH during the follow-up (HR: 2.66 (1.32 to 5.36); $p = 0.006$) together with carbon monoxide diffusing capacity test (DLCO) below 60% predicted (table 2).

For cardiac progression, we excluded patients with previous reduction of the LVEF to below 50%, that is, 126 patients. New onset of reduction of LVEF was observed in 41/2784 (1.5%) (data available in 63.7% of the cohort). In the multivariate model, male sex was independently predictive of heart dysfunction (HR: 2.22 (1.06 to 4.63); $p = 0.035$) (table 3).

In univariate Cox proportional model, male sex was predictive of new onset of SRC, but not in multivariate Cox proportional model. Further information is provided in online supplementary information.

Mortality

Overall, 908 deaths were recorded (217 (33.1%) men vs 691 (18.0%) women; $p < 0.001$). Men died younger than women (60.4 (13.1) years vs 63.9 (13.6) years; $p < 0.001$) and their disease duration was shorter at death (8.6 (7.9) vs 12.3 (9.3) years; $p < 0.001$) (information available respectively for 908 and 816 dead patients). Death was considered to be SSc-related in 445/665 cases (cause of the death not provided in 243 patients): 115/165 (69.7%) men and 330/500 (66.0%) women; $p = 0.44$. The mean time to death after study inclusion was 2.5 ± 2.2 years. The Kaplan-Meier survival curve displayed a higher survival probability in women compared with men (figure 2A). In multivariate Cox proportional hazard model adjusted on age, disease duration, diffuse cutaneous subtype and positivity of anti-Scl70 antibodies, male sex was identified as an independent predictor of death (HR: 1.48 (1.19 to 1.84); $p < 0.001$). Other independent predictors were musculoskeletal involvement and severe organ involvements (ie, DU, PH and lung fibrosis) (table 4).

We then focused on SSc-related deaths and observed no significant difference between men and women (figure 2B). Independent predictors for SSc-related mortality were an active

Table 2 Results of the multivariate Cox proportional model for predictors of new onset of pulmonary hypertension during the follow-up (adjusted on age, disease duration, diffuse cutaneous subtype and positivity of anti-Scl70 antibodies)

Predictors (at baseline)	p Multivariate	HR, 95% CI
Male sex	0.006	2.66 (1.32 to 5.36)
DLCO <60%	<0.001	8.96 (4.11 to 19.53)
Lung fibrosis	NS	
Muscle weakness	NS	
Oesophageal symptoms	NS	
Arterial hypertension	NS	

Pulmonary hypertension was diagnosed on right heart catheterisation; predictors were identified in univariate Cox proportional model with a p value < 0.1; DLCO, carbon monoxide diffusing capacity test; lung fibrosis was considered if present on X-rays and/or high-resolution CT; NS, not significant.

disease, muscle weakness, DLCO below 60% and proteinuria at baseline (see online supplementary table S2).

DISCUSSION

In this study, we analysed the impact of sex on SSc, taking advantage of the largest series of (European) patients with SSc ever reported. Our main results are: (i) sex ratio (women/men) in SSc is about 6:1 whatever age at disease onset; (ii) men with SSc have a more severe phenotype and (iii) the prognosis of SSc is worse in men with an increased risk of occurrence of cardiovascular disease (PH and heart dysfunction).

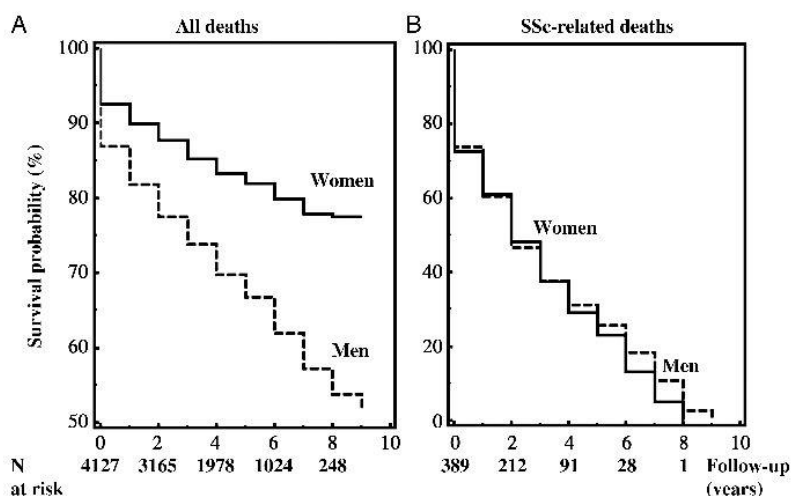
It was already well documented that SSc was associated with a strong female predominance. Our results were concordant with literature data with a sex ratio equal to six affected women for one man.⁷⁻¹¹ It has been suggested that the sex ratio in SSc could be higher in the childbearing years and decreased during the postmenopausal years.²⁵ This was also demonstrated in other autoimmune diseases, such as SLE and rheumatoid arthritis.²⁶⁻²⁸ We did not observe any difference in sex bias according to age at disease onset, suggesting that the female hormonal milieu and the pregnancy-related events were not responsible for this difference in disease susceptibility.²⁹ Other hypotheses have been proposed to explain this sex imbalance in

Table 3 Results of the multivariate Cox proportional model for predictors of new occurrence heart dysfunction during the follow-up (adjusted on age, disease duration, diffuse cutaneous subtype and anti-Scl70 antibodies)

Predictors (at baseline)	p Multivariate	HR, 95% CI
Male sex	0.035	2.22 (1.06 to 4.63)
Valentini score ≥ 3	0.011	3.49 (1.34 to 9.07)
Tendon friction rubs	NS	
Muscle weakness	NS	
Joint contracture	NS	
Joint synovitis	<0.001	3.31 (1.71 to 6.40)
CK elevation	0.017	2.64 (1.20 to 5.81)
Lung fibrosis	NS	
Pulmonary hypertension	0.010	14.40 (1.91 to 108.71)

Heart dysfunction was defined as left ventricular ejection fraction below 50% predicted. Predictors were identified in univariate Cox proportional model with a p value < 0.1. CK, creatine kinase; lung fibrosis was considered if present on X-rays and/or high-resolution CT; pulmonary hypertension was diagnosed on right heart catheterisation; NS, not significant; disease was active if the Valentini score was ≥ 3 .

Figure 2 Kaplan–Meier survival for all deaths (A) and systemic sclerosis (SSc)-related (B) deaths according to sex during the follow-up period. The dotted line represents survival probability in men, whereas the solid line represents survival probability in women. In the bottom, the number of patients with SSc at risk can be noticed.



autoimmune diseases, such as sex-specific environmental exposure, foetal microchimerism, skewing in X-chromosome inactivation patterns and X-linked genetic susceptibility risk factors.^{6 30 31} This latter factor is supported by a reproducible association between a sex chromosome gene *IRAK1* and SSc in two independent studies.^{31 32}

In this study, we showed that the disease was strikingly more severe in men, as reflected by an independent association with the diffuse cutaneous subtype, an active disease assessed by Valentini score and with creatine kinase elevation. Conversely, women were characterised by ACA antibodies positivity and a

more frequent gastrointestinal involvement. Our results confirm and extend previous studies, reporting a higher frequency of ACA antibodies in women and a higher risk of diffuse cutaneous forms in men.^{12 15 33}

Our group previously reported that women with SSc were characterised by polyautoimmunity, ACA positivity and limited cutaneous subtype.^{34 35} However, prevalence of polyautoimmunity could not be assessed in the present study because this information was available only in a small proportion of patients.

Our study was the first to rigorously demonstrate that men have a more severe vasculopathy. Indeed, male sex was independently associated with both DU and PH at baseline.

A previous study suggested a higher frequency of DU in men in line with our results.¹⁶ However, the sample size and the lack of multivariate analysis in this report could not allow firm conclusions. Herein, we could confirm that male patients have more frequently DU at baseline using multivariate analysis (OR: 1.28 (1.11 to 1.47), $p < 0.001$). However, our prospective analysis failed to demonstrate any association between new occurrence of DU and sex during the follow-up.

Strengthening the relationships between male sex and vasculopathy, male sex was identified as an independent predictor of new occurrence of PH and heart dysfunction during the follow-up, with HR equal to 2.66 and 2.22, respectively. In a previous study, male sex was independently associated with PH assessed by echocardiography.³³ However, this study was biased because PH was not confirmed by right heart catheterisation, which is the gold standard for the diagnosis. Our study is the first to demonstrate that male sex is independently associated with PH, but is also predictive of new occurrence of PH during the follow-up, with a stringent definition of PH. It is of interest to notice that usually idiopathic pulmonary arterial hypertension occurs more frequently in women.³⁶ This underlines the specificity of SSc-PH characterised by higher prevalence and incidence in men.

Men were characterised by an active pattern at nailfold capillaroscopy and women by the early one. Some studies suggest that the active pattern is at higher risk of severe peripheral vascular involvement than the early one, which is in accordance with our results.³⁷ However, we did not succeed to demonstrate any association after adjusting for disease duration, probably because of the small size of the sample.

Table 4 Results of the multivariate Cox proportional model for predictors of all causes of death (adjusted on age, disease duration, diffuse cutaneous subtype and anti-Scl70 antibodies)

Predictors (at baseline)	p Multivariate	HR, 95% CI
Male sex	<0.001	1.48 (1.19 to 1.84)
ACA antibodies	NS	
Valentini score ≥ 3	NS	
Tendon friction rubs	NS	
Muscle weakness	0.019	1.31 (1.05 to 1.63)
Muscle atrophy	0.013	1.40 (1.08 to 1.82)
CK elevation	NS	
Joint contracture	0.015	1.29 (1.05 to 1.57)
Joint synovitis	NS	
Digital ulcers	0.003	1.34 (1.11 to 1.62)
Scleroderma renal crisis	NS	
Proteinuria	<0.001	1.93 (1.44 to 2.60)
Pulmonary hypertension	0.010	2.56 (1.26 to 5.20)
DLCO <60%	<0.001	2.61 (2.12 to 3.22)
Lung fibrosis	0.002	1.39 (1.13 to 1.71)
Oesophageal symptoms	NS	
Stomach symptoms	NS	
Intestinal symptoms	0.006	1.34 (1.09 to 1.66)
Arterial hypertension	NS	

Predictors were identified in univariate Cox proportional model as predictors of death with a p value < 0.1.

ACA, anticentromere antibodies; disease was active if the Valentini score was ≥ 3 ; CK, creatine kinase; pulmonary hypertension was diagnosed on right heart catheterisation; DLCO, carbon monoxide diffusing capacity test; lung fibrosis was considered if present on X-rays and/or high-resolution CT; NS, not significant.

Clinical and epidemiological research

A previous study in EUSTAR cohort reported that male sex was independently associated with left ventricular dysfunction.³⁸ Herein, male sex was identified as an independent predictor of new occurrence of heart dysfunction during the follow-up. These results are of major interest since PH and heart dysfunction are the leading causes of death in SSc³⁹ and herein we show, for the first time, in a prospective study, that male sex is predictive of these two life-threatening outcomes. Note that we could not assess the association of heart dysfunction and outcome during the follow-up or male sex at baseline because LVEF was available for <70% of the cohort. Another critical issue is survival in SSc.⁴⁰ We herein observed that male sex was independently predictive of death. This is concordant with few previous cohort studies reporting a better survival for female patients.^{8 12 14 16 41} In a preliminary EUSTAR study, male sex appeared as a risk factor to predict mortality.¹⁸ Our results obtained through the largest worldwide database confirmed these data by showing a higher mortality in affected men with 1.8-fold more deaths in men compared with women. However, when we stratified on SSc-related mortality, there was no significant difference between men and women. Several hypotheses might be driven to explain this discrepancy. First, this difference might be related to the inherent difference between men and women regarding SSc-unrelated mortality.⁴² This underlines the bias of considering all deaths instead of SSc-related deaths to estimate the impact of sex on mortality. In the same way, observational studies, which used the standardised mortality ratio, adjusted on sex and age, did not find any difference between men and women or suggested an increased risk of death among women.^{9 43–45} However, the mean follow-up (5 years) might be too short to allow an accurate detection of predictive factors of death and SSc-related deaths. With this follow-up, we observed that severe organ involvements were more prevalent in men, but deaths related to these organ involvements might occur several years later.

Our study should be interpreted within some limitations: first, the exact cause of death could not be analysed because these data were not available. Furthermore, we could not perform adjustment for comorbidities, except arterial hypertension, which was as prevalent in men and women (table 1). Moreover, despite all the efforts made by EUSTAR to homogenise the care of patients with SSc, the participation of several centres might have introduced some heterogeneity in their assessment and some factors could not be included in the analysis because of missing values. Finally, our findings appear as robust in white Europeans but might not be applied generally to other ethnicities.

However, our study has several strengths: data were derived from a large, multicentre cohort, with an extensive list of clinical, laboratory and diagnostic parameters. Furthermore, unlike previous retrospective and cross-sectional clinical studies, our data collection was prospective to identify the impact of sex on disease progression and outcomes. In addition, most of the variables were available for more than 80%–90% of the cohort and thus analysed in our different multivariate models, which confirm the robustness of our study (table 1). Finally, in contrast to previous studies, we used the new ACR/EULAR classification allowing increasing the number of patients included and the representativeness of our cohort.

Novelty in our analysis lies on the identification of a more severe vasculopathy in men. The mechanisms that explain these discrepancies are still unknown and very challenging.

Our results suggest taking sex into account (i) for the patient management with a particular attention to vascular

manifestations in men, (ii) for the analysis of drug effects in clinical trials and (iii) may open new avenues for SSc research, which needs to evaluate both genetic and environmental influences according to sex. Stratification or adjustment according to sex should allow identifying which therapeutic strategy has the greatest benefit for men and women, leading to the development of sex-tailored treatment regimens, as it has been recently demonstrated in depression and hepatitis C.^{46 47}

Author affiliations

¹Department of Rheumatology A, Paris Descartes University, Cochin Hospital, Paris, France

²Department of Rheumatology, Basel University, Unispital Basel, Basel, Switzerland

³Department of Experimental and Clinical Medicine, Section of Internal Medicine and Division of Rheumatology, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi (AOU), University of Florence, Florence, Italy

⁴Department of Rheumatology, Charité University Hospital, Berlin, German Rheumatism Research Centre Berlin (DRFZ), a Leibniz institute, Berlin, Germany

⁵UO Reumatologia ed Immunologia Clinica Spedali Civili Brescia, Brescia, Italy

⁶Department of Internal Medicine, Hôpital Claude Huriez, University Lille Nord-de-France, Lille cedex, France

⁷Department of Clinical and Experimental Medicine "F-Magrassi" II, Naples, Italy

⁸Servicio de Reumatología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁹Rheumatology Unit, Department of Medicine—DIMED, University of Padova, Padova, Italy

¹⁰B. Shine Department of Rheumatology, Rambam Health Care Campus, Rappaport Faculty of Medicine, Technion—Institute of Technology, Haifa, Israel

¹¹Institute of Rheumatology, University of Belgrade Medical School, Belgrade, Serbia

¹²Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Science, Moscow, Russia

¹³U.O. Immunologia Clinica—Centro di Riferimento per le Malattie Autoimmuni Sistemiche, Milano, Italy

¹⁴Scleroderma Center of Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania, USA

¹⁵Department of Rheumatology, Peking Union Medical College Hospital (West Campus), Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, China

¹⁶Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Justus-Liebig University Giessen, Kerckhoff Clinic, Bad Nauheim, Germany

¹⁷Department of Rheumatology, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

Acknowledgements EUSTAR acknowledges the unconditional support that EULAR has provided in the past for the maintenance of the EUSTAR database.

Collaborators Serena Guiducci; Alan Tyndall; Giovanni Lapadula; Florenzo Iannone; Radim Becvar; Stanislaw Sierakowski; Otylia Kowal Bielecka; Maurizio Cutolo; Alberto Sulli; Giovanna Cuomo; Serena Vettori; Simona Rednic; Ileana Nicoara; P. Vlachoyiannopoulos; C. Montecucco; Roberto Caporali; Srdan Novak; László Cziráj; Cecilia Varju; Carlo Chizzolini; Eugene J. Kucharz; Anna Kotulska; Magdalena Kopec-Medrek; Malgorzata Widuchowska; Blaz Rozman; Carmel Mallia; Bernard Coleiro; Armando Gabrielli; Dominique Farge; Adrian Hij; Roger Hesselstrand; Agneta Scheja; Frank Wollheim; Duska Martinovic; M. Govoni; Andrea Lo Monaco; Nicolas Hunzelmann; Raffaele Pellerito; Lisa Maria Bambara; Paola Caramaschi; Carol Black; Christopher Denton; Jörg Henes; Vera Ortiz Santamaria; Stefan Heitmann; Dorota Krasowska; Matthias Seidel; Mara Oleszowsky; Harald Burkhardt; Andrea Himsel; Maria J. Salvador; Bojana Stamenkovic; Aleksandra Stankovic; Mohammed Tikly; Maya N. Starovoytova; Merete Engelhart; Gitte Strauss; Henrik Nielsen; Kirsten Damgaard; Gabriella Szücs; Antonio Zea Mendoza; Carlos de la Puente Bujidos; Walter A. Sifuentes Giraldo; Øyvind Midtvedt; Torhild Garen; David Launay; Guido Valesini; Valeria Riccieri; Ruxandra Maria Ionescu; Daniela Opris; Laura Groseanu; Fredrick M. Wigley; Carmen M. Mihai; Roxana Sfrnt Cornateanu; Razvan Ionitescu; Ana Maria Ghergh; Marilena Gorga; Rucsandra Dobrota; Mihai Bojinca; Georg Schett; Jörg HW Distler; Pierluigi Meroni; Silvana Zeni; Luc Mouthon; Filip De Keyser; Vanessa Smith; Francesco P. Cantatore; Ada Corrado; Susanne Ullman; Line Iversen; Maria R. Pozzi; Kilian Eyerich; Rüdiger Hein; Elisabeth Knott; Jacek Szechinski; Piotr Wiland; Magdalena Szymka-Kaczmarek; Renata Sokolik; Ewa Morgiel; Brigitte Krummel-Lorenz; Petra Saar; Martin Aringer; Claudia Günther; Branimir Anic; Marko Baresic; Miroslav Mayer; Sebastião C. Radominski; Carolina de Souza Müller; Valderilio F. Azevedo; Svetlana Agachi; Liliana Groppa; Lealea Chiaburu; Eugen Ruseu; Thierry Zenone; Simon Stebbings; John Highton; Lisa Stamp; Peter Chapman; Murray Baron; John O'Donnell; Kamal Solanki; Alan Doube; Douglas Veale; Marie O'Rourke; Esthela Loyo; Edoardo Rosato; Simonetta Pisarri; Cristina-Mihaela Tanaseanu; Monica Popescu; Alina Dumitrascu; Isabela Tiglea; Rodica Chiriac; Codrina Ancuta; Daniel E. Furst; Suzanne Kafaja; Paloma Garcia de la Peña Lefebvre; Silvia Rodriguez Rubio; Marta Valero Expósito; Jean Sibilia; Emmanuel Chatelus; Jacques Eric Gottenberg; Hélène Chiffot; Ira Litinsky; Algirdas Venalis; Irena Butrimiene; Paulius Venalis; Rita Ruginiene; Diana Karpec; Eduardo Kerzberg; Fabiana Montoya; Vanesa Cosentino.

Contributors Study conception and design: ME, JA, OD and YA. Acquisition of data: ME, JA, UAW, MM-C, GR, PA, EH, GV, PEC, FC, ABG, YB-M, ND, LPA, RS, SJ, JB, ML, UM-L, AK, OD and YA. Analysis and interpretation of data: ME, JA, UAW, MM-C, GR, PA, EH, GV, PEC, FC, ABG, YB-M, ND, LPA, RS, SJ, JB, ML, UM-L, AK, OD and YA. All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published.

Competing interests OD has/had consultancy relationship and/or has received research funding in the area of systemic sclerosis and related conditions from Actelion, Pfizer, Ergonex, BMS, Sanofi-Aventis, United BioSource Corporation, Roche/Genentech, Medac, Biovitrium, Boehringer Ingelheim Pharma, Novartis, 4 D Science, Active Biotec, Bayer-Schering, Sinoxa, Serodapharm, EpiPharm and Biogen.

Patient consent Obtained.

Ethics approval Paris CPP Ile de France 3.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Moroni L, Bianchi I, Leo A. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2012;11:A386–92.
- Abbate R, Mannucci E, Cioni G, et al. Diabetes and sex: from pathophysiology to personalized medicine. *Intern Emerg Med* 2012;7(Suppl 3):S215–19.
- Miller VM. Why are sex and gender important to basic physiology and translational and individualized medicine? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;306:H781–8.
- Allanore Y, Avouac J, Kahan A. Systemic sclerosis: an update in 2008. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2008;75:650–5.
- Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009;360:1989–2003.
- Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001;2:777–80.
- Meier FMP, Frommer KW, Dinsler R, et al. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1355–60.
- Ferri C, Valentini G, Cozzi F, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:139–53.
- Jacobsen S, Halberg P, Ullman S. Mortality and causes of death of 344 Danish patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Br J Rheumatol* 1998;37:750–5.
- Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:165–70.
- Scusell-Lonzetti L, Joyal F, Raynaud J-P, et al. 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)* 2002;81:154–67.
- Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003;48:2246–55.
- Nashid M, Khanna PP, Furst DE, et al. Gender and ethnicity differences in patients with diffuse systemic sclerosis—analysis from three large randomized clinical trials. *Rheumatol Oxf Engl* 2011;50:335–42.
- Hashimoto A, Teijima S, Tono T, et al. Predictors of survival and causes of death in Japanese patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2011;38:1931–9.
- Al-Dhaher FF, Pope JE, Ouimet JM. Determinants of morbidity and mortality of systemic sclerosis in Canada. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:269–77.
- Panopoulos ST, Bourmia V-K, Sfikakis PP. Is vasculopathy associated with systemic sclerosis more severe in men? *J Rheumatol* 2013;40:46–51.
- Simeón CP, Castro-Guardiola A, Fonollosa V, et al. Systemic sclerosis in men: clinical and immunological differences. *Br J Rheumatol* 1996;35:910–11.
- Fransen J, Popa-Diaconu D, Hesselstrand R, et al. Clinical prediction of 5-year survival in systemic sclerosis: validation of a simple prognostic model in EUSTAR centres. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1788–92.
- Schwartzman-Morris J, Putterman C. Gender differences in the pathogenesis and outcome of lupus and of lupus nephritis. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:604892.
- Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, et al. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:257–68.
- Molina JF, Drenkard C, Molina J, et al. Systemic lupus erythematosus in males. A study of 107 Latin American patients. *Medicine (Baltimore)* 1996;75:124–30.
- Andrade RM, Alarcón GS, Fernández M, et al. Accelerated damage accrual among men with systemic lupus erythematosus: XLIV. Results from a multiethnic US cohort. *Arthritis Rheum* 2007;56:622–30.
- Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, et al. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000;27:155–60.
- Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, et al. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis* 2001;60:592–8.
- Steen VD, Oddis CV, Conte CG, et al. Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963–1982. *Arthritis Rheum* 1997;40:441–5.
- Ho CT, Mok CC, Lau CS, et al. Late onset systemic lupus erythematosus in southern Chinese. *Ann Rheum Dis* 1998;57:437–40.
- Boddaert J, Huong DLT, Amoura Z, et al. Late-onset systemic lupus erythematosus: a personal series of 47 patients and pooled analysis of 714 cases in the literature. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:348–59.
- Sammaritano LR. Menopause in patients with autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2012;11:A430–436.
- Chiffot H, Fautrel B, Sordet C, et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 2008;37:223–35.
- Selmi C. The X in sex: how autoimmune diseases revolve around sex chromosomes. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22:913–22.
- Dieudé P, Bouaziz M, Guedj M, et al. Evidence of the contribution of the X chromosome to systemic sclerosis susceptibility: association with the functional IRAK1 196Phe/532Ser haplotype. *Arthritis Rheum* 2011;63:3979–87.
- Carmona FD, Cénit MC, Diaz-Gallo L-M, et al. New insight on the Xq28 association with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:2032–8.
- Nguyen C, Bèzezné A, Baubet T, et al. Association of gender with clinical expression, quality of life, disability, and depression and anxiety in patients with systemic sclerosis. *PLoS One* 2011;6:e17551.
- Elhai M, Avouac J, Kahan A, et al. Systemic sclerosis at the crossroad of polyautoimmunity. *Autoimmun Rev* 2013;12:1052–7.
- Avouac J, Airo P, Dieude P, et al. Associated autoimmune diseases in systemic sclerosis define a subset of patients with milder disease: results from 2 large cohorts of European Caucasian patients. *J Rheumatol* 2010;37:608–14.
- Dempsey Y, MacLean MR. The influence of gender on the development of pulmonary arterial hypertension. *Exp Physiol* 2013;98:1257–61.
- Smith V, Decuman S, Sulli A, et al. Do worsening scleroderma capillaroscopic patterns predict future severe organ involvement? a pilot study. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1636–9.
- Allanore Y, Meune C, Vonk MC, et al. Prevalence and factors associated with left ventricular dysfunction in the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) database of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:218–21.
- Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1809–15.
- Elhai M, Meune C, Avouac J, et al. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatol Oxf Engl* 2012;51:1017–26.
- Sampaio-Barros PD, Bortoluzzo AB, Marangoni RG, et al. Survival, causes of death, and prognostic factors in systemic sclerosis: analysis of 947 Brazilian patients. *J Rheumatol* 2012;39:1971–8.
- Bobak M. Relative and absolute gender gap in all-cause mortality in Europe and the contribution of smoking. *Eur J Epidemiol* 2003;18:15–18.
- Bryan C, Howard Y, Brennan P, et al. Survival following the onset of scleroderma: results from a retrospective inception cohort study of the UK patient population. *Br J Rheumatol* 1996;35:1122–6.
- Hesselstrand R, Scheja A, Akesson A. Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis* 1998;57:682–6.
- Geirsson AJ, Wollheim FA, Akesson A. Disease severity of 100 patients with systemic sclerosis over a period of 14 years: using a modified Madsen scale. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1117–22.
- Kornstein SG, Schatzberg AF, Thase ME, et al. Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. *Am J Psychiatry* 2000;157:1445–52.
- Narciso-Schiavon JL, Schiavon L de L, Carvalho-Filho RJ, et al. Gender influence on treatment of chronic hepatitis C genotype 1. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010;43:217–23.

Collaborators of the EUSTAR centres (numerical order of centers):

Serena Guiducci (3); Alan Tyndall (18); Giovanni Lapadula (19); Florenzo Iannone (19); Radim Becvar (20); Stanislaw Sierakowsky (21); Otylia Kowal Bielecka (21); Maurizio Cutolo (22); Alberto Sulli (22); Giovanna Cuomo (7); Serena Vettori (7); Simona Rednic (23); Ileana Nicoara (23); P. Vlachoyiannopoulos (24); C. Montecucco (25); Roberto Caporali (25); Srdan Novak (26); László Czirják (27); Cecilia Varju (27); Carlo Chizzolini (28); Eugene J. Kucharz (29); Anna Kotulska (29); Magdalena Kopec-Medrek (29); Malgorzata Widuchowska (29); Blaz Rozman (30); Carmel Mallia (31); Bernard Coleiro (31); Armando Gabrielli (32); Dominique Farge (33); Adrian Hij (33); Roger Hesselstrand (34); Agneta Scheja (34); Frank Wollheim (34); Duska Martinovic (35); M. Govoni (35); Andrea Lo Monaco (36); Nicolas Hunzelmann (37); Raffaele Pellerito (38); Lisa Maria Bambara (39); Paola Caramaschi (39); Carol Black (40); Christopher Denton (40); Jörg Henes (41); Vera Ortiz Santamaria (42); Stefan Heitmann (43); Dorota Krasowska (44); Matthias Seidel (45); Mara Oleszowsky (45); Harald Burkhardt (46); Andrea Himsel (46); Maria J. Salvador (47); Bojana Stamenkovic (48); Aleksandra Stankovic (48); Mohammed Tikly (49); Maya N. Starovoytova (50); Merete Engelhart (51); Gitte Strauss (51); Henrik Nielsen (51); Kirsten Damgaard (51); Gabriella Szücs(52); Antonio Zea Mendoza (52); Carlos de la Puente Buijdos (53); Walter A. Sifuentes Giraldo (53); Øyvind Midtvedt (54); Torhild Garen (54); David Launay (6); Guido Valesini (55); Valeria Ricciari (55); Ruxandra Maria Ionescu (56); Daniela Opris (56); Laura Groseanu (56); Fredrick M. Wigley (57); Carmen M. Mihai (58); Roxana Sfrent Cornateanu (58); Razvan Ionitescu (58); Ana Maria Gherghe (58); Marilena Gorga (58); Rucsandra Dobrota (58); Mihai Bojinca (58) ; Georg Schett (59); Jörg HW Distler (59); Pierluigi Meroni (60); Silvana Zeni (60); Luc Mouthon (61); Filip De Keyser (62); Vanessa Smith (62); Francesco P. Cantatore (63); Ada Corrado (63); Susanne Ullman (64); Line Iversen (64); Maria R. Pozzi (65); Kilian Eyerich (66); Rüdiger Hein (66); Elisabeth Knott

(66); Jacek Szechinski (67); Piotr Wiland (67); Magdalena Szmyrka-Kaczmarek (67); Renata Sokolik (67); Ewa Morgiel (67); Brigitte Krummel-Lorenz (68); Petra Saar (69); Martin Aringer (69); Claudia Günther (69); Branimir Anic (70); Marko Baresic (70); Miroslav Mayer (70); Sebastião C. Radominski (71); Carolina de Souza Müller (71); Valderilio F. Azevedo (71); Svetlana Agachi (72); Liliana Groppa (72); Lealea Chiaburu (72); Eugen Russu (72); Thierry Zenone (73); Simon Stebbings (74); John Highton (74); Lisa Stamp (75); Peter Chapman (75); Murray Baron (76); John O'Donnell (76); Kamal Solanki (77); Alan Doube (77); Douglas Veale (78); Marie O'Rourke (78); Esthela Loyo (79); Edoardo Rosato (80); Simonetta Pisarri (81); Cristina-Mihaela Tanaseanu (82); Monica Popescu (82); Alina Dumitrascu (82); Isabela Tiglea (82); Rodica Chirieac (82); Codrina Ancuta (82); Daniel E. Furst (83); Suzanne Kafaja (83); Paloma García de la Peña Lefebvre (84); Silvia Rodriguez Rubio (84); Marta Valero Exposito (84); Jean Sibia (85); Emmanuel Chatelus (85); Jacques Eric Gottenberg (85); Hélène Chiffot (85); Ira Litinsky (86); Algirdas Venalis (87); Irena Butrimiene (87); Paulius Venalis (87); Rita Ruginiene (87); Diana Karpec (87); Eduardo Kerzberg (88); Fabiana Montoya (88); Vanesa Cosentino (88).

(3) Department of Experimental and Clinical Medicine, Section of Internal Medicine and Division of Rheumatology, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi (AOUC), University of Florence, Florence, Italy, (7) Department of Clinical and Experimental Medicine "F-Magrassi" II, Naples, Italy, (18) Department of Rheumatology, University Hospital Basel, Switzerland, (19) Rheumatology Unit-DiMIMP, School of Medicine University of Bari, Italy, (20) Institute of Rheumatology, 1st Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic, (21) Department of Rheumatology and Internal Diseases, Medical University of Bialystok, Poland, (22) Research Laboratory and Division of Rheumatology Department of Internal Medicine, University of Genova, Italy, (23) Department of Rheumatology, University

of Medicine & Pharmacy "Iuliu Hatieganu" Cluj, Cluj-Napoca, Romania, (24) Department of Pathophysiology, Medical School, National University of Athens, Greece, (25) Unità Operativa e Cattedra di Reumatologia, IRCCS Policlinico S Matteo, Pavia, Italy, (26) Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Internal Medicine, KBC Rijeka, Croatia, (27) Department of Immunology and Rheumatology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Hungary, (28) Department of Immunology and Allergy, University Hospital, Geneva, Switzerland, (29) Department of Internal Medicine and Rheumatology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland, (30) University Medical Center Ljubljana, Division of Internal Medicine, Department of Rheumatology, Ljubljana, Slovenia, (31) "Stella Maris", Balzan, Malta, (32) Istituto di Clinica Medica Generale, Ematologia ed Immunologia Clinica, Università Politecnica delle Marche Polo Didattico, University of Ancona, Italy, (33) Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; Saint-Louis Hospital; Internal Medicine and Vascular Disease Unit ; INSERM UMRS 1160; Paris 7 Diderot University, Sorbonne Paris Cité, 1 avenue Claude-Vellefaux, 75010 Paris, France, (34) Department of Rheumatology, Lund University Hospital, Sweden, (35) Department of Internal Medicine, Clinical Hospital of Split, Croatia, (36) Department of Clinical and Experimental Medicine, Rheumatology Unit, University of Ferrara, Italy, (37) Department of Dermatology, University Hospital Cologne, Germany, (38) Ospedale Mauriziano, Centro di Reumatologia, Torino, Italy, (39) Università degli Studi di Verona, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Reumatologia-Medicina Interna B, Policlinico GB Rossi, Verona, Italy, (40) Centre for Rheumatology, Royal Free and University College London Medical School, London, United Kingdom, (41) Medizinische Universitätsklinik, Abt. II (Onkologie, Hämatologie, Rheumatologie, Immunologie, Pulmonologie), Tübingen, Germany, (42) Rheumatology Granollers General Hospital, Barcelona, Spain, (43) Department of Rheumatology, Marienhospital Stuttgart, Germany, (44) Department of Dermatology, Medical University of Lublin, Poland, (45)

Medizinische Universitäts-Poliklinik, Department of Rheumatology, Bonn, Germany, (46) Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität, Medizinische Klinik III, Rheumatologische Ambulanz, Frankfurt am Main, Germany, (47) Rheumatology Department, Hospitais da Universidade, Coimbra, Portugal, (48) Institute for Prevention, Treatment and Rehabilitation of Rheumatic and Cardiovascular Diseases, Niska Banja, Serbia and Montenegro, (49) Rheumatology Unit, Department of Medicine Chris Hani Haragwanath, Hospital and University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, (50) Institute of Rheumatology, 1st Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic, (51) Department of Rheumatology, University Hospital of Gentofte, Hellerup, Denmark, (52) Third Department of Medicine, Rheumatology Division, University of Debrecen, Medical Center, Debrecen, Hungary, (53) Servicio de Reumatología, Hospital Ramon Y Cajal, Madrid, Spain, (54) Department of Rheumatology, Rikshospitalet University Hospital, Oslo, Norway, (55) Department of Internal Medicine and Medical Specialities, "Sapienza" University of Rome, Italy, (56) Department of Rheumatology - St. Maria Hospital, Carol Davila, University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania, (57) Johns Hopkins University, Division of Rheumatology, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA, (58) Department of Internal Medicine and Rheumatology Clinic, Ion Cantacuzino Clinical Hospital, Bucharest, Romania, (59) Department of Internal Medicine 3, University Hospital Erlangen, Germany, (60) Dipartimento e Cattedra di Reumatologia, Università degli Studi di Milano, Istituto Ortopedico "Gaetano Pini", Milano, Italy, (61) Department of Internal Medicine, Hôpital Cochin, Paris, France, (62) University of Ghent, Department of Rheumatology, Gent, Belgium, (63) U.O. Reumatologia-Università degli Studi di Foggia, Ospedale "Col. D'Avanzo", Foggia, Italy, (64) University Hospital of Copenhagen, Department of Dermatology D-40, S-Bispebjerg Hospital, Copenhagen, Denmark, (65) Dipartimento di Medicina, Ospedale San Gerardo, Monza, Italy, (66) Department of Dermatology and Allergy

of the TU Munich, Germany, (67) Department of Rheumatology and Internal Diseases, Wroclaw University of Medicine, Wroclaw, Poland, (68) Endokrinologikum Frankfurt, Germany, (69) Division of Rheumatology, Department of Medicine III/Department of Dermatology, University Medical Center Carl Gustav Carus, Technical University of Dresden, Germany, (70) University Hospital Centre Zagreb, Division of Clinical Immunology and Rheumatology, Department of Medicine, Zagreb, Croatia, (71) Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - Paraná, Brasil, (72) Municipal Centres of Research in Scleroderma, Hospital "Sacred Trinity", Department of Rheumatology, Chisinau, Republic of Moldova, (73) Department of Medicine, Unit of Internal Medicine, Valence cedex 9, France, (74) Dunedin School of Medicine, Dunedin, New Zealand, (75) Department of Medicine, University of Otago, Christchurch, New Zealand, (76) Murray Baron, McGill University, Jewish General Hospital, Montreal, Quebec, Canada, (77) Waikato University Hospital, Rheumatology Unit, Hamilton City, New Zealand, (78) Department of Rheumatology, Bone and Joint Unit, St. Vincent's University Hospital, Dublin, Ireland, (79) Reumatologia e Immunologia Clinica, Hospital Regional Universitario Jose Ma Cabral y Baez, Clinica Corominas, Santiago, Dominican Republic, (80) Centro per la Sclerosi Sistemica - Dipartimento di Medicina Clinica, Università La Sapienza, Policlinico Umberto I, Roma, Italy, (81) Clinical Emergency Hospital St. Pantelimon, Bucharest, Romania, (82) Division of Rheumatology & Rehabilitation GR.T.Popa, Center for Biomedical Research, European Center for Translational Research-"GR.T.Popa" University of Medicine and Pharmacy, Rehabilitation Hospital, Iasi, Romania, (83) Division of Rheumatology, Department of Medicine, University of California at Los Angeles, Rehab Center, Los Angeles, USA, (84) Hospital Universitario Madrid Norte Sancharro, Madrid, Spain, (85) University Hospital of Strasbourg-Department of Rheumatology, Hôpital de Hautepierre, Service de Rhumatologie, Strasbourg Cedex, France, (86) Department of Rheumatology, Tel-Aviv Sourasky Medical

Center, Tel-Aviv, Israel, (87) State Research Institute for Innovative Medicine, Vilnius University, Vilnius, Lithuania, (88) Osteoarticular Diseases and Osteoporosis Centre, Pharmacology and Clinical Pharmacological Research Centre, School of medicine - University of Buenos Aires, Rheumatology and Collagenopathies Department, Ramos Mejía Hospital, Buenos Aires, Argentina

SUPPLEMENTARY MATERIALS:

In November 2013, 10'928 patients from 120 centres were included in the EUSTAR database. Patients were retrospectively classified as responding to 2013 ACR/EULAR criteria for SSc or not, despite information regarding telangiectasia missing in most of them. In all, 9185 fulfilled the 2013 ACR/EULAR criteria for SSc. Only patients responding to the 2013 ACR/EULAR classification criteria for SSc were included in the present analysis [1]. In all, 9185 fulfilled the 2013 ACR/EULAR criteria for SSc. Information related to sex was missing in three patients, who were excluded from the analysis; therefore the sample size was of 9182 for baseline analysis. The structure of the database, the minimum essential data set (MEDS), and the inclusion criteria have been previously described in details [2–6]. Each participating centre obtained approval of the local ethics committee and all registered patients gave informed consent.

Impact of sex on phenotype at baseline

We looked at sex influence on age at disease onset, disease subtype (limited or diffuse SSc according to Leroy's criteria [7]), disease phenotype looking in particular at organ involvement, auto-antibodies (presence of anti-centromere (ACA) and anti-topoisomerase-I (anti-Scl-70) antibodies). Pulmonary hypertension (PH) was defined by pre-capillary pulmonary hypertension on right heart catheterization (resting mean pulmonary artery

pressure ≥ 25 mmHg together with a pulmonary capillary wedge pressure of ≤ 15 mmHg) [8,9]. For interstitial lung disease, we considered the presence of pulmonary fibrosis on X-rays and/or high resolution (HR) computed tomography (CT). The disease was considered as active if the Valentini score was ≥ 3 [10].

Impact of sex on disease outcomes

Patients with active digital ulcer (DU), PH confirmed on right heart catheterization, reduction of the left ventricular ejection fraction (LVEF) to below 50% as assessed by echocardiography and scleroderma renal crisis (SRC) at baseline were excluded from the analyses of respectively peripheral vascular worsening, lung vascular, cardiac and renal progressions. Peripheral vascular worsening was defined by new DU, which had to be distal to, or at, proximal interphalangeal joints and not thought to be due to trauma. Lung vascular progression was defined as the new onset of pre-capillary pulmonary hypertension on right heart catheterization. Cardiac progression was defined as the new onset of reduction of the LVEF to below 50% as assessed by echocardiography. Renal progression was defined by the new occurrence of SRC. Interstitial lung disease progression was defined as apparition or worsening of pulmonary fibrosis on X-rays and/or high HRCT and the deterioration of lung volume ($\geq 10\%$ of FVC) during the follow-up.

Statistical analysis

All data analyses were performed using MedCalc v11.4.4 and XL STAT v2013.6.02. Data were presented as mean (standard deviations (S.D.)) for continuous variables and numbers (percentages) for categorical variables. Data at baseline were statistically analysed using chi-square tests for differences in frequency and the Student's t-test for comparison between two normally distributed continuous variables. The relationship between baseline nominal variables was measured by the Cramer's V test. Variables identified by univariate analysis as

having a p value < 0.10 were included in the multivariate model. Variables with a high association (Cramer's V > 0.60) and with less than 70% of available data were not entered in the different multivariate models.

To note, heart dysfunction was not entered in the different multivariate models as an independent parameter since it was not available for >70% of the cohort. However, we assessed the association of different independent parameters (with more than 70% of the data available) with this outcome (i.e. new occurrence of heart dysfunction).

XLSTAT-Power was used to estimate the power observations associated with Cox regression model. Statistical power of this sample has been determined, taking into account our sample size, a type I error of 5% and the observed frequency of each outcome. Survival was also analysed by Kaplan Meyer survival technique.

SUPPLEMENTARY RESULTS:

At baseline, among patients with pulmonary hypertension (PH) (n=54), 5/41 (12.2%) with available data had PH secondary to lung fibrosis (FVC < 70%).

Impact of sex on organ involvements:

For new onset of DU, we excluded patients with DU at baseline (1651 patients). New onset of DU was noticed in 479/2580 (18.6%) patients (data missing in 268 patients, i.e. 6.0% of the patients).

SRC was recorded at baseline in 89 patients. New occurrence of SRC was recorded in 45/4114 (1.1%) patients (data available in 93.3% of the cohort).

Lung fibrosis was diagnosed at follow-up in 560 patients (492 by HCRT and 68 by X-rays). Interstitial lung disease progression was recorded in 105/1194 patients (data missing in 3305 patients).

In the follow-up, 71 developed PH. Among them, 19/57 (33.3%) with available data had pulmonary hypertension secondary to lung fibrosis.

Supplementary Table 1: Statistical power of the study sample, determined taking into account the sample size, a type 1 error of 5% and the observed frequency of each outcome

Outcome	Sample size	Type one error	Observed frequency (%)	Power
Mortality	4499	5%	20	1
Occurrence of new digital ulcer	2580		19	1
Occurrence of precapillary pulmonary hypertension	4477		2	1
Occurrence of reduction of left ventricular ejection fraction	2847		3	1
Occurrence of scleroderma renal crisis	4114		1	1
Interstitial lung disease progression	1194		9	1

Supplementary Table 2: Results of the multivariate Cox proportional model for predictors of SSc-related death (adjusted on age, disease duration, diffuse cutaneous subtype and positivity of anti-Scl70 antibodies)

Predictors (at baseline)	P multivariate	HR, 95% CI
ACA antibodies	NS	
Valentini score ≥ 3	0.016	1.56 [1.09-2.24]
Tendon friction rubs	NS	
Muscle weakness	0.036	1.33 [1.02-1.73]
CK elevation	NS	
Joint contracture	NS	
Scleroderma renal crisis	NS	
Proteinuria	0.002	1.86 [1.26-2.73]
DLCO < 60%	0.023	1.38 [1.05-1.83]
Lung fibrosis	NS	
Stomach symptoms	NS	

Predictors were identified in univariate cox proportional model as predictors of death with a p-value < 0.1; HR: Hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval; NS: not significant; ACA: anti-centromere antibodies; disease was active if the Valentini score was ≥ 3 ; CK: creatine kinase; DLCO: carbon monoxide diffusing capacity test; lung fibrosis was considered if present on X-rays and/or high resolution computed tomography.

SUPPLEMENTARY REFERENCES:

- 1 Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2013;**72**:1747–55. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204424
- 2 Meier FMP, Frommer KW, Dinser R, *et al.* Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis* 2012;**71**:1355–60. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200742
- 3 Allanore Y, Meune C, Vonk MC, *et al.* Prevalence and factors associated with left ventricular dysfunction in the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) database of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010;**69**:218–21. doi:10.1136/ard.2008.103382
- 4 Walker UA, Tyndall A, Czirják L, *et al.* Geographical variation of disease manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) group database. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:856–62. doi:10.1136/ard.2008.091348
- 5 Walker UA, Tyndall A, Czirják L, *et al.* Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis* 2007;**66**:754–63. doi:10.1136/ard.2006.062901
- 6 Maurer B, Graf N, Michel BA, *et al.* Prediction of worsening of skin fibrosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis using the EUSTAR database. *Ann Rheum Dis* Published Online First: 30 June 2014. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205226
- 7 LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, *et al.* Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;**15**:202–5.
- 8 Avouac J, Airò P, Meune C, *et al.* Prevalence of pulmonary hypertension in systemic sclerosis in European Caucasians and metaanalysis of 5 studies. *J Rheumatol* 2010;**37**:2290–8. doi:10.3899/jrheum.100245
- 9 Proceedings of the 4th World Symposium on Pulmonary Hypertension, February 2008, Dana Point, California, USA. *J Am Coll Cardiol* 2009;**54**:S1–117.
- 10 Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, *et al.* European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis* 2001;**60**:592–8.

Annexe 2

Autoimmunity Reviews 12 (2013) 1052–1057



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev



Review

Systemic sclerosis at the crossroad of polyautoimmunity

Muriel Elhai^{a,b}, Jérôme Avouac^{a,b}, André Kahan^a, Yannick Allanore^{a,b,*}

^a Rheumatology A Dpt, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Cochin Hospital, APHP, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

^b INSERM U1016, UMR 8104, Institut Cochin, University Sorbonne Paris Cité, 75014 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2013

Accepted 20 May 2013

Available online 19 June 2013

Keywords:

Systemic autoimmune disease

Connective tissue diseases

Systemic sclerosis

Autoimmunity

Overlap

ABSTRACT

Objectives: Several epidemiological studies have revealed the co-occurrence of other autoimmune diseases (AIDs) within patients with systemic sclerosis (SSc). However, some of these studies were based on small cohorts and wide ranges of prevalence have been reported. Therefore to overcome these limitations of individual studies, we sought to perform a meta-analysis to determine the accurate prevalence of polyautoimmunity in SSc.

Methods: We performed a systematic review and a meta-analysis of literature in MEDLINE and Embase databases from January 1960 to March 2013. All cohort studies reporting on prevalence of other AIDs known to be associated with SSc were analyzed. Prevalence of polyautoimmunity and of each AID were then calculated. **Results:** Ten studies reporting polyautoimmunity were identified corresponding to a total of 6102 SSc patients. Overall 1432 patients with at least one AID were identified corresponding to a weighted prevalence of polyautoimmunity equal to 25.7% CI 95% [20.1%–31.6%]. Overall 208/5139 SSc-patients had at least two additional AIDs resulting in a weighted prevalence of 3.9% [3.3%–4.4%]. The most prevalent associated AIDs were autoimmune thyroid disease (10.4%) followed by Sjögren's syndrome (7.7%) and dermatomyositis/polymyositis (5.6%).

Conclusion: Our results confirm that SSc polyautoimmunity is a frequent condition in SSc affecting a quarter of SSc-patients. The impact on the phenotype and also on the management and therapy will need to be addressed now in further works.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1053
2. Materials and methods	1053
2.1. Inclusion of the studies	1053
2.2. Data extraction	1053
2.3. Statistical analysis	1053
3. Results	1053
3.1. Prevalence of polyautoimmunity	1053
3.2. Phenotype of patients with polyautoimmunity	1054
3.3. Prevalence of each autoimmune disease and phenotype analysis	1054
3.3.1. Prevalence and phenotype of patients with systemic sclerosis and Sjögren syndrome	1054
3.3.2. Prevalence of patients with systemic sclerosis and autoimmune thyroid disease	1054
3.3.3. Prevalence and phenotype of patients with systemic sclerosis and primary biliary cirrhosis	1054
3.3.4. Prevalence and phenotype of patients with systemic sclerosis and rheumatoid arthritis	1055
3.3.5. Prevalence and phenotype of SSc-patients with dermatomyositis/polymyositis	1055
3.3.6. Prevalence of patients with systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus	1055
3.4. Aggregation of autoimmune diseases in systemic sclerosis	1055
4. Discussion	1055
Take-home messages	1056
References	1056

* Corresponding author at: Service de Rhumatologie A, Hôpital Cochin 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. Tel.: +33 1 58 41 25 63; fax: +33 1 58 41 26 24. E-mail address: yannick.allanore@cch.aphp.fr (Y. Allanore).

1. Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a complex incurable multiorgan disease affecting the immune system, the microvascular network and the connective tissue [1,2]. SSc is characterized by a fibrotic phenotype resulting from the accumulation of extracellular matrix components, mainly collagens [3]. Its pathogenesis remains partially unknown, but it is believed that both genetic and environmental factors contribute to disease susceptibility and clinical expression [4]. Autoimmunity plays a pivotal role in SSc-pathogenesis; anti-nuclear antibodies are detected in up to 90% of SSc-patients and correspond to multiple SSc-specific auto-antibodies [1,5,6]. Both genetic and epidemiologic studies have suggested that SSc shares a genetic background with other autoimmune diseases (AIDs) [4,7–30]. Genetic studies have highlighted some susceptibility genes predisposing to multiple AIDs [4,7,31]. And we recently reported that some variant, such as a regulatory one located in TNFAIP3 region, was associated for SSc polyautoimmunity (i.e. AIDs co-occurring within patients) [32].

Epidemiological studies have revealed the existence of both polyautoimmunity and familial autoimmunity in SSc-patients (i.e. co-occurrence of AIDs in their families) [8,10–30]. According to studies, several AIDs were frequently associated with SSc in more than 10% of patients [8,10,12,15–18,20–22]. However, prevalence of polyautoimmunity and of each AIDs were highly variable from study to study [8,10–30]. Therefore, the precise frequencies of polyautoimmunity in SSc and of each AID associated with SSc remain unclear. Disparities across studies may be caused by small sample sizes and selection bias resulting in low statistical power and cohort's heterogeneity. Therefore to overcome the limitations of individual studies, increase statistical power thanks to a large cohort and resolve inconsistencies, we decided to perform a meta-analysis to determine the accurate prevalence of polyautoimmunity and of each AID known to be associated with SSc.

2. Materials and methods

2.1. Inclusion of the studies

The meta-analyses of observational studies in epidemiology (MOOSE) guidelines were followed [33]. For prevalence of polyautoimmunity in SSc, we searched MEDLINE and Embase databases between January 1960 and March 2013 using the terms (scleroderma or systemic sclerosis) [MesH] AND (autoimmunity). Eligible studies were cohort studies with SSc diagnosed according to ACR criteria [34] or Leroy's criteria [35] and reporting at least the prevalence within the cohort of two AIDs known to be associated with SSc (i.e. Sjögren's syndrome (SjS), dermatomyositis/polymyositis (DM/PM), rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), autoimmune thyroid disease (AITD) and primary biliary cirrhosis (PBC)). Secondary SjS was defined by the revised American-European consensus classification criteria or the 1999 Japanese Ministry of Health and Welfare's diagnostic criteria for SjS [36]. SLE and RA were defined by the revised classification criteria from the American College of Rheumatology [37,38]. PM and DM were diagnosed using the Bohan and Peter criteria [39]. PBC was diagnosed by combining laboratory, immunological and/or histological data or on criteria used in Japan [40–43]. AITD was diagnosed according to clinical and biological criteria including thyroid hormone levels and the detection of antithyroid antibodies [44]. We also investigated the prevalence of each AID using the terms (scleroderma or systemic sclerosis) [MesH] AND (Sjögren's syndrome)/(systemic lupus erythematosus)/(rheumatoid arthritis)/(dermatomyositis)/(polymyositis)/(autoimmune thyroid disease)/(primary biliary cirrhosis) [MesH], respectively. Multi autoimmune syndrome was defined by the presence of two or more other AIDs in a single SSc-patient [45]. Other SSc-cohort studies as well as reference lists of the papers initially detected were also searched by hand to identify additional relevant reports. In order to identify recent studies not yet published, we also searched in European League against

Rheumatism (EULAR)/ACR congress abstract archives of 2011 and 2012. No language restriction was applied. Studies were excluded if they only referred to antibody prevalence.

2.2. Data extraction

From each study, we extracted data including localization of the study, period of follow-up, total number of SSc-patients, total number of SSc-patients affected by polyautoimmunity and by each of the AIDs investigated as well as clinical phenotype and antibodies prevalence, when available. The mid-cohort was calculated as the median year between the starting year of inclusion period and the ending year of the follow-up period.

2.3. Statistical analysis

All data analysis was performed using MedCalc® version 9.2.1.0. Data were presented as mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables and numbers (percentages) for categorical variables. Data were statistically analyzed using chi-square tests for differences in frequency between 2 normally distributed continuous variables. A p value < 0.05 was considered statistically significant. Prevalence of polyautoimmunity was calculated using data of studies assessing at least 2 AIDs known to be associated with SSc. The prevalence was calculated by dividing the number of patients with polyautoimmunity (or the specific AID investigated) by the number of patients studied. We then used the Freeman–Tukey transformation for each prevalence. This is a variance stabilizing transformation that removes the dependence of the variance on the mean of the transformed proportion (i.e., it corrects for overdispersion). We then calculated the pooled estimate for all studies (with 95% confidence interval (CI 95%)), which was backtransformed afterward using the DerSimonian and Laird method. This method is used for fitting the random effects model for meta-analysis to incorporate heterogeneity. With the prevalences calculated, aggregation for different AIDs was calculated by dividing the prevalence of a given AID in SSc-patients by the prevalence in the general population (λ). We extracted data on prevalences from one meta-analysis, which determined worldwide prevalences of AIDs [46]. Correlations were assessed using Spearman rank correlation coefficient (ρ).

3. Results

The search retrieved 5738 articles. Overall, 5683 were excluded on the basis of their title or abstract resulting in 55 articles being examined for the full text (Fig. 1). Overall 22 studies responded to inclusion criteria and were included in the present analysis (Table 1) [8,10–30].

3.1. Prevalence of polyautoimmunity

Ten studies reporting several AIDs known to be associated with SSc were identified [8,10,12,15–18,20–22]. These studies provided a total sample of 6102 patients (women 87.1%, 35% of diffuse cutaneous subtype). Mean age at assessment was 57.6 (± 3.1) years whereas mean disease duration was 10.6 (± 2.3) years. Mean age at diagnosis was 47.6 (± 2.6) years. Anti-Scl 70 antibodies were detected in 726/3145 (23.1%) SSc-patients and anticentromere antibodies were present in 1130/3143 (35.9%) patients. Four studies investigated anti-U1-RNP antibody positivity in their SSc-cohort and detected it in 216/2874 (7.5%) cases. The period of follow-up ranged from 1973 to 2011. Mid-cohort was comprised between 1987 and 2011, with 2 studies before 2000 ($n = 779$ patients) and 8 after ($n = 5323$ patients).

Polyautoimmunity was found more frequently in European patients (852/3603 (23.6%)) than in North American patients (325/1639 (19.8%), $p < 0.05$).

Prevalence of polyautoimmunity varied across studies from 10.9% to 43.9%. It was equal to 20.3% in studies before 2000 and to 23.9% in

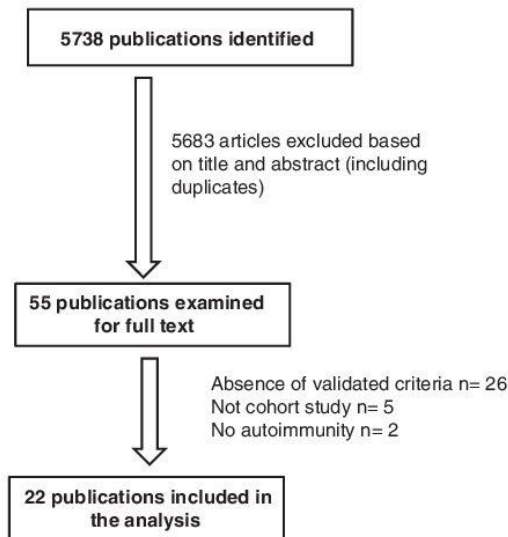


Fig. 1. Study flow chart.

those after 2000 ($p = 0.03$). Polyautoimmunity did not correlate with age at assessment ($\rho = 0.48$; $p = 0.13$) or age at diagnosis ($\rho = 0.07$; $p = 0.85$). However, another AID was more frequently detected in SSc-patients older than 48 years at diagnosis (27.1%) than those younger (21.1%) ($p < 0.01$).

Overall 1432 patients with at least one AID were identified corresponding to a weighted prevalence of polyautoimmunity equal to 25.7% CI 95% [20.1%–31.6%] (Fig. 2). Eight studies also reported the number of patients with multi autoimmune syndrome [8,10,16–18,20–22]. Overall 208/5139 SSc-patients had at least two other AIDs resulting in a weighted prevalence of 3.9% [3.3%–4.4%].

Table 1
Main characteristics of the studies included.

Study	Localization	Study period	Number of patients	Age, years ^a	Age, years ^b	Female n (%)	Disease duration, years	Dc SSc n (%)	ACA n (%)	Anti-ScI70 n (%)
Koumakis E [21]	France	2010–2011	373	61.1		327 (88%)		204 (55%)		
Hudson M [12]	Canada	2004–2011	963	54.25		833 (87%)	11.04	356 (38%)	334/961 (35%)	150 (16%)
Simic-Pasalic K [22]	Serbia		153	59.1		138 (89%)	9.2	67 (44%)	61 (40%)	75 (49%)
Imura-Kumada S [25]	Japan		225	53.4		192 (85%)	6.5	119 (53%)	110 (49%)	27 (12%)
Hashimoto A [15]	Japan	1973–2008	405		51	376 (93%)	14	135 (33%)	128 (36%)	84 (24%)
Pakozdi A [16]	UK	1999–2007	1700					564 (33%)		
Balbir-Gurman A [17]	Israel	2004–2009	165					42 (25%)		
Ueda-Hayakawa I [26]	Japan		146			128 (88%)		60 (41%)	60 (41%)	38 (26%)
Cavazzana I [14]	Italy	1983–2010	201			172/198 (87%)		67/198 (34%)	65/197 (33%)	63/195 (32%)
Simeon-Aznar CP [13]	Spain	2006–2008	916		51.2	801 (87%)	6.2	356 (39%)	356 (39%)	173 (19%)
Avouac J [10]	France		585	57		498 (85%)	11	191 (33%)	193 (33%)	149 (25%)
Avouac J [10]	Italy		547	63		491 (90%)	13	136 (25%)	276 (50%)	136 (24%)
Assassi S [23]	USA	2001–2007	817	53.95		725 (89%)	9.16	326 (40%)	246 (30%)	156 (19%)
Hudson M [8]	Canada	2004–2007	429	55		369 (86%)	11	197 (46%)		
Hudson M [8]	Colombia	2004–2007	290	54		264 (91%)	7	61 (21%)		
Meyer O [18]	France	1975–2002	127		48.4	105 (83%)		24 (19%)	23 (18%)	45 (35%)
Meyer O [18]	USA	1986–88	247		47.6	183 (91%)		116 (47%)	52 (21%)	54 (22%)
Antonelli A [11]	Italy	1999–2004	202	55		184 (91%)	12.9	32 (16%)	71 (35%)	79 (39%)
Caramaschi P [20]	Italy		118	57.2	48.5	106 (90%)	8.7	40 (34%)	63 (53%)	33 (28%)
Szucs G [27]	Hungary		477							
Biro E [19]	Hungary		119							
Jinnin M [28]	Japan	1990–2001	173			158 (91%)	8	63 (36%)	51 (30%)	57 (33%)
Jacobsen S [24]	Denmark	1980–1993	230	58		189 (82%)	11		79 (34%)	31 (13%)
Kobak S [29]	Turkey		118	48.3		108 (92%)	8.2	58 (49%)	53 (45%)	58 (49%)
Marrone M [30]	Italy	2004–2005	60	50.1		57 (95%)	7.5	8 (13%)	14 (23%)	34 (57%)

N: number, Dc: diffuse cutaneous subtype, SSc: systemic sclerosis, ACA: anticentromere antibodies.

^a Age at assessment.

^b Age at diagnosis.

3.2. Phenotype of patients with polyautoimmunity

Only six studies provided information regarding the phenotype of SSc-overlap patients [8,10,15,17,18,22]. Patients with polyautoimmunity were more frequently women (607/654 (92.8%) vs. 1524/1755 (86.8%); $p < 0.01$) and of limited cutaneous subtype (314/385 (81.6%) vs. 925/1439 (64.3%); $p < 0.01$).

3.3. Prevalence of each autoimmune disease and phenotype analysis

3.3.1. Prevalence and phenotype of patients with systemic sclerosis and Sjögren syndrome

Eleven studies reported prevalence of SjS in SSc-patients. Prevalence of SjS in the cohorts ranged from 0% to 33.9% [8,10,12,15–18,20–22,29]. Overall 513/6220 SSc had also SjS, with a weighted prevalence of 7.7% [4.5%–11.6%] (Fig. 3A). SSc-patients with SjS were preferentially of limited cutaneous subtype (195/245 (79.6%) vs. 1107/1615 (68.5%), $p < 0.01$) [10,15,17,29].

3.3.2. Prevalence of patients with systemic sclerosis and autoimmune thyroid disease

Prevalence of AITD was reported by 7 studies [8,10,11,19–22]. Prevalence of AITD varied from study to study from 1.4% to 23.1% with a total of 300/2816 patients with AITD. This corresponded to a weighted prevalence of 10.4% [6.1%–15.5%] (Fig. 3B).

3.3.3. Prevalence and phenotype of patients with systemic sclerosis and primary biliary cirrhosis

PBC was investigated in 11 studies. PBC was detected in 157 patients/5024 with a weighted prevalence equal to 3.0% [1.7%–4.6%] [range: 0–15.6%] [8,10,13,14,17,20–25] (Fig. 3C).

SSc-patients with PBC were more frequently women (78/82 (95.1%) vs. 1822/2092 (87.1%), $p < 0.05$), of limited cutaneous subtype (104/119 (87.4%) vs. 2045/3201 (63.9%), $p < 0.01$) and with anticentromere antibody positivity (78/96 (81.3%) vs. 873/2517 (34.7%), $p < 0.01$) [10,13,14,23–25].

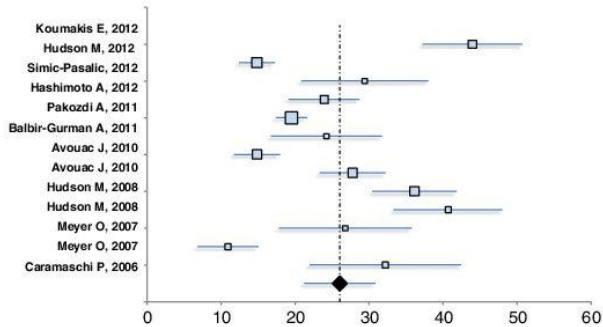


Fig. 2. Forest plot of polyautoimmunity for patients with systemic sclerosis. Each square represents an individual prevalence estimate, the size of the square being proportional to the weight given to the study. The lines represent the 95% CI for the point estimate in each study. The diamond represents the combined prevalence.

3.3.4. Prevalence and phenotype of patients with systemic sclerosis and rheumatoid arthritis

Fourteen studies investigated frequency of RA in their cohorts [8,10,12,15–18,20–22,26–28,30]. They found frequencies between 0% and 17.5% with 345 cases of RA among 6958 SSc-patients. The weighted prevalence of RA was calculated at 4.2% [1.7%–7.2%] (Fig. 3D).

Patients with concomitant RA were of limited cutaneous subtype in 34/49 cases (69.4%) vs. 497/735 (67.6%) patients without RA ($p = 0.92$) [15,26,28,30].

3.3.5. Prevalence and phenotype of SSc-patients with dermatomyositis/polymyositis

Seven reports investigated PM/DM associated with SSc with 256 cases/4605 patients studied [10,12,16–18,20,22]. Frequencies were between 1.7% and 15.7% resulting in a weighted frequency of 5.6% [3.7%–7.8%]. SSc-patients with DM/PM were of limited cutaneous subtype in 65.3% of the cases (49/75) and those without DM/PM in 71.5% (1163/1627) ($p = 0.30$) [10,15,17].

3.3.6. Prevalence of patients with systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus

SLE was detected in 127/5383 patients with a weighted prevalence of 2.6% [1.6%–3.9%] [range: 0.5%–7%] [10,12,15–18,20–22].

3.4. Aggregation of autoimmune diseases in systemic sclerosis

Recurrence risk values λ were calculated to approximately 1120 for DM/PM, 750 for PBC, 108 for SLE, 26 for SjS, 5 for AITD and 4 for RA [46].

4. Discussion

So far, results concerning prevalence of polyautoimmunity in SSc have remained conflicting varying from 10.9% to 43.9% [8,10,12,15–18,20–22]. Similarly, the prevalence of each AID in SSc is unknown [8,10–30]. To our knowledge, our study is the first one to investigate the worldwide prevalence of polyautoimmunity in SSc in a meta-analysis. With this method, we can conclude that concurrent AIDs are common in SSc-patients with

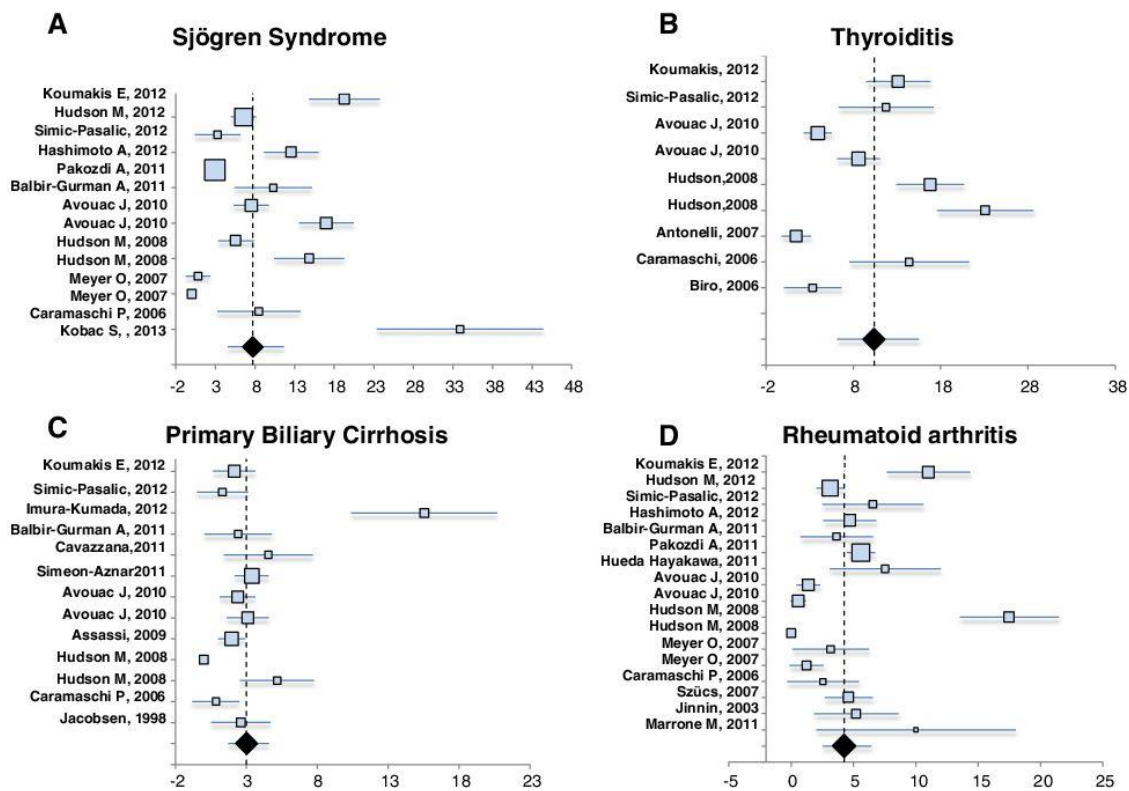


Fig. 3. Forest plots of prevalence of Sjögren syndrome (A), autoimmune thyroiditis (B), primary biliary cirrhosis (C) and rheumatoid arthritis (D) in patients with systemic sclerosis according to studies. Each square represents an individual prevalence estimate, the size of the square being proportional to the weight given to the study. The lines represent the 95% CI for the point estimate in each study. The diamond represents the combined prevalence.

a prevalence of 26%. The most prevalent associated AIDs are AITD (10.4%) followed by SJS (7.7%) and DM/PM (5.6%).

Several reasons may account for the heterogeneity in studies and as a result in our meta-analysis: small size (median number of patients in a cohort: 373), geographical differences, differences in population characteristics (age and phenotype) and in study periods. For example, we found a higher prevalence of polyautoimmunity in SSc in recent studies as compared to the older ones. This result probably reflects a bias of underdiagnoses in older studies. Thus some AIDs were not searched for in cohorts studied before 2000, such as PBC or DM/PM [15,18]. We can hypothesize that with increasing knowledge in the spectrum of AIDs associated with SSc (and polyautoimmunity), the prevalence of polyautoimmunity will be found increased in further studies.

Our results confirm that prevalence of polyautoimmunity is much higher in SSc-patients (26%) than reported in the general population (3–8%) [46]. Consistent with this result, our aggregation analyses disclosed an aggregation of AIDs in SSc with values over 1 for all AIDs investigated. Interestingly, this analysis revealed extreme values with individual recurrence risk values over 700 for some diseases, such as PBC and DM/PM.

Our results are also supported by studies in other AIDs, such as PBC and SJS, which demonstrated with the opposite approach an association with SSc more frequent than might be expected in the general population [47–49].

The concept of “shared autoimmunity” is strengthened by the familial aggregation of AIDs, detected in 1/3 of SSc-relatives [8,21], and by the existence of polyautoimmunity in patients affected by these SSc-associated AIDs, such as AITD, SLE, PBC and SJS [4,7,9,47–52]. Furthermore, some data suggest common pathogenic mechanisms in some of these AIDs [53]. Altogether, these results are concordant with genetic studies, revealing some degree of common genetic susceptibility. This has been known for a long time by the associations of certain Human Leukocyte Antigen (HLA) loci with different AIDs. And this has been confirmed by recent studies identifying non-HLA common susceptibility genes involved in diverse immune pathways [4,7,31]. This supported the autoimmune tautology indicating that different AIDs with a wide heterogeneity in their phenotype might represent pleiotropic outcomes of non-specific disease genes [54]. However, the mechanisms involved in the development of the final clinical phenotype are unknown. Therefore, understanding the relationship of genotype to phenotype is an extremely important goal for research. The study of specific environmental triggers and their putative interaction with susceptibility genes should be helpful in further studies to better understand the development of each specific phenotype [55,56].

Similarly, the mechanism involved in the development of multiple AIDs in one individual and the effect of this polyautoimmunity on the final clinical autoimmune phenotype are not well understood. Our results suggest that polyautoimmunity in SSc could influence both disease phenotype and severity. Patients with polyautoimmunity seem to have a milder disease (higher frequencies of women, of limited cutaneous subtype and of antinuclear positivity). This is concordant with previous reports in SSc [4,10,13,14,23–26]. Similarly in PBC, patients with an overlap SSc-PBC seem to have a milder disease [57]. We can hypothesize that some immunological interactions in the presence of an additional AID may favor a better outcome of the disease. Therefore, further studies are needed to better determine the effect of an additional AID on SSc-phenotype.

Our study should be interpreted within its limitations. First, this meta-analysis might be limited by the heterogeneity across the studies included. However, we considered this variability in our analysis and reduced it using the DerSimonian and Laird method. Furthermore, some limitations related to cohort studies may bias our results. Ethnicity, demographical characteristics, clinical subsets and organ involvement may differ across studies. Unfortunately, we could not stratify our results according to ethnicity because of missing data in studies included. However, we observed that North American patients were less affected by

polyautoimmunity than European. Height percent of the patients with available data had anti-RNP antibodies, underlying the question of a misdiagnosis between mixed connective tissue disease and SSc with polyautoimmunity [58]. However, to reduce this bias, inclusion criteria were international validated criteria for SSc and also for the other AIDs. These rigorous criteria lead to exclusion of studies reporting sicca syndrome (and not SJS) and those with diagnosis of PM/DM in cases of myositis related to SSc. Moreover, we did not assess other AIDs, such as diabetes, multiple sclerosis, vitiligo, autoimmune hepatitis Indeed, the prevalence of these AIDs was assessed in a minority of the studies included. Finally we cannot exclude a bias of underdiagnoses in some of the studies included, depending on the screening method used and its repetition or not during the disease course. This underlines the need of large contemporary cohorts, with prospective and repeated standardized data collection, to better study the prevalence of associated AIDs in SSc. Thus, the EULAR Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group database, enabled by the major efforts of multiple medical centers, should allow studying prevalence of AIDs associated with SSc, phenotype of the SSc-patients with polyautoimmunity and the chronology of appearance of the different diseases in a large population of SSc-patients.

In conclusion, polyautoimmunity is a common condition in SSc, affecting one quarter of the patients. The most frequent associated AIDs are AITD, SJS, DM/PM and RA. Further studies are warranted to increase our knowledge about the common mechanisms of autoimmunity and the effect of polyautoimmunity on SSc-phenotype leading to potential new approaches for management and treatment of SSc-patients with polyautoimmunity.

Take-home messages

- Polyautoimmunity affects one quarter of the systemic sclerosis-patients.
- The main overlapping disorders are autoimmune thyroiditis and Sjögren syndrome.
- Systemic sclerosis-patients with polyautoimmunity seem to have a milder disease.

References

- [1] Allanore Y, Avouac J, Kahan A. Systemic sclerosis: an update in 2008. *Joint Bone Spine* 2008;75:650–5.
- [2] Rossi D, Russo A, Manna E, Binello G, Baldovino S, Sciascia S, et al. The role of nail-videocapillaroscopy in early diagnosis of scleroderma. *Autoimmun Rev* 2013;12:821–5.
- [3] Martin P, Teodoro WR, Velosa AP, de Moraes J, Carrasco S, Christmann RB, et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2012;11:827–35.
- [4] Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:203–10.
- [5] Villalta D, Imbustaro T, Di Giovanni S, Lauriti C, Gabini M, Turi MC, et al. Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2012;12:114–20.
- [6] Mehra S, Walker J, Patterson K, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2013;12:340–54.
- [7] Dieudé P, Boileau C, Allanore Y. Immunogenetics of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2011;10:282–90.
- [8] Hudson M, Rojas-Villarraga A, Coral-Alvarado P, López-Guzmán S, Mantilla RD, Chalem P, et al. Polyautoimmunity and familial autoimmunity in systemic sclerosis. *J Autoimmun* 2008;31:156–9.
- [9] Becker KG. The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Med Hypotheses* 2004;62:309–17.
- [10] Avouac J, Airò P, Dieude P, Caramaschi P, Tiev K, Diot E, et al. Associated autoimmune diseases in systemic sclerosis define a subset of patients with milder disease: results from 2 large cohorts of European Caucasian patients. *J Rheumatol* 2010;37:608–14.
- [11] Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, Cazzato M, Ferrari SM, Sebastiani M, et al. Clinical and subclinical autoimmune thyroid disorders in systemic sclerosis. *Eur J Endocrinol* 2007;156:431–7.
- [12] Hudson M, Pope J, Mahler M, Tatibouet S, Steele R, Baron M, et al. Clinical significance of antibodies to Ro52/TRIM21 in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R50.
- [13] Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Plá V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Ramos-Casals M, Campillo-Grau M, et al. Registry of the Spanish network for systemic sclerosis: clinical pattern according to cutaneous subsets and immunological status. *Semin Arthritis Rheum* 2012;41:789–800.

- [14] Cavazzana I, Ceribelli A, Taraborelli M, Fredi M, Norman G, Tincani A, et al. Primary biliary cirrhosis-related autoantibodies in a large cohort of Italian patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2011;38:2180–5.
- [15] Hashimoto A, Endo H, Kondo H, Hirohata S. Clinical features of 405 Japanese patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* 2012;22:272–9.
- [16] Pakozdi A, Nihtyanova S, Moinzadeh P, Ong VH, Black CM, Denton CP. Clinical and serological hallmarks of systemic sclerosis overlap syndromes. *J Rheumatol* 2011;38:2406–9.
- [17] Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y. Scleroderma overlap syndrome. *Isr Med Assoc J* 2011;13:14–20.
- [18] Meyer OC, Fertig N, Lucas M, Somogyi N, Medsger Jr TA. Disease subsets, antinuclear antibody profile, and clinical features in 127 French and 247 US adult patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2007;34:104–9.
- [19] Biró E, Szekanez Z, Czirják L, Dankó K, Kiss E, Szabó NA, et al. Association of systemic and thyroid autoimmune diseases. *Clin Rheumatol* 2006;25:240–5.
- [20] Caramaschi P, Biasi D, Volpe A, Carletto A, Cecchetto M, Bambara LM. Coexistence of systemic sclerosis with other autoimmune diseases. *Rheumatol Int* 2007;27:407–10.
- [21] Koumakis E, Dieudé P, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Association des Sclérodermiques de France. Familial autoimmunity in systemic sclerosis – results of a French-based case–control family study. *J Rheumatol* 2012;39:532–8.
- [22] Simic-Pasalic K, Damjanov N, Marinkovic G. Associations of systemic sclerosis and other autoimmune diseases (analysis of 153 patients from a single EUSTAR centre). *EULAR*; 2012.
- [23] Assassi S, Fritzler MJ, Arnett FC, Norman GL, Shah KR, Gourh P, et al. Primary biliary cirrhosis (PBC), PBC autoantibodies, and hepatic parameter abnormalities in a large population of systemic sclerosis patients. *J Rheumatol* 2009;36:2250–6.
- [24] Jacobsen S, Halberg P, Ullman S, Van Venrooij WJ, Hoier-Madsen M, Wiik A, et al. Clinical features and serum antinuclear antibodies in 230 Danish patients with systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1998;37:39–45.
- [25] Imura-Kumada S, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Encabo S, Shums Z, et al. High prevalence of primary biliary cirrhosis and disease-associated autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* 2012;22:892–8.
- [26] Ueda-Hayakawa I, Hasegawa M, Kumada S, Tanaka C, Komura K, Hamaguchi Y, et al. Usefulness of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor to detect rheumatoid arthritis in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2135–9.
- [27] Szücs G, Szekanez Z, Zilahi E, Kapitány A, Baráth S, Szamosi S, et al. Systemic sclerosis–rheumatoid arthritis overlap syndrome: a unique combination of features suggests a distinct genetic, serological and clinical entity. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:989–93.
- [28] Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Asano Y, Yazawa N, Tamaki K. Clinical features of patients with systemic sclerosis accompanied by rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:91–4.
- [29] Kobak S, Oksel F, Aksu K, Kabasakal Y. The frequency of sicca symptoms and Sjögren's syndrome in patients with systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis* 2013;16:88–92.
- [30] Marrone M, Chialà A, Tampoia M, Iannone F, Raho L, Covelli M, et al. Prevalence of anti-CCP antibodies in systemic sclerosis. *Reumatismo* 2007;59:20–4.
- [31] Davies TF, Latif R, Yin X. New genetic insights from autoimmune thyroid disease. *J Thyroid Res* 2012;2012:623852.
- [32] Koumakis E, Giraud M, Dieudé P, Cohignac V, Cuomo G, Airò P, et al. Brief report: candidate gene study in systemic sclerosis identifies a rare and functional variant of the TNFAIP3 locus as a risk factor for polyautoimmunity. *Arthritis Rheum* 2012;64:2746–52.
- [33] Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. meta-analysis of observational studies in epidemiology (MOOSE) group. *JAMA* 2000;283:2008–12.
- [34] Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Committee: preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581–90.
- [35] LeRoy EC, Medsger Jr TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28:1573–6.
- [36] Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554–8.
- [37] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
- [38] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
- [39] Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:344–7.
- [40] EASL clinical practice guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009;51:237–67.
- [41] Leuschner U. Primary biliary cirrhosis—presentation and diagnosis. *Clin Liver Dis* 2003;7:741–58.
- [42] Sasaki H, Inoue K, Higuchi K, Yasuyama T, Koyata H, Kuroki T, et al. Primary biliary cirrhosis in Japan: national survey by the subcommittee on autoimmune hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 1985;20:476–85.
- [43] Inoue K, Hirohara J, Nakano T, Seki T, Sasaki H, Higuchi K, et al. Prediction of prognosis of primary biliary cirrhosis in Japan. *Liver* 1995;15:70–7.
- [44] Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med* 2003;348:2646–55.
- [45] Rojas-Villarraga A, Amaya-Amaya J, Rodriguez-Rodriguez A, Mantilla RD, Anaya JM. Introducing polyautoimmunity: secondary autoimmune diseases no longer exist. *Autoimmun Dis* 2012;2012:254319.
- [46] Cardenas-Roldan J, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. How do autoimmune diseases cluster in families? A systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 2013;11:73 [Epub ahead of print].
- [47] Watt FE, James OF, Jones DE. Patterns of autoimmunity in primary biliary cirrhosis patients and their families: a population-based cohort study. *QJM* 2004;97:397–406.
- [48] Marasini B, Gagetta M, Rossi V, Ferrari P. Rheumatic disorders and primary biliary cirrhosis: an appraisal of 170 Italian patients. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1046–9.
- [49] Lazarus MN, Isenberg DA. Development of additional autoimmune diseases in a population of patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1062–4.
- [50] Culp KS, Fleming CR, Duffy J, Baldus WP, Dickson ER. Autoimmune associations in primary biliary cirrhosis. *Mayo Clin Proc* 1982;57:365–70.
- [51] Theander E, Jacobsson LT. Relationship of Sjögren's syndrome to other connective tissue and autoimmune disorders. *Rheum Dis Clin North Am* 2008;34:935–47 [viii–ix].
- [52] McDonagh JE, Isenberg DA. Development of additional autoimmune diseases in a population of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2000;59:230–2.
- [53] Fenoglio D, Bernuzzi F, Battaglia F, Parodi A, Kalli F, Negrini S, et al. Th17 and regulatory T lymphocytes in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis as models of autoimmune fibrotic diseases. *Autoimmun Rev* 2012;12:300–4.
- [54] Anaya JM. The autoimmune tautology. *Arthritis Res Ther* 2010;12:147.
- [55] Costenbader KH, Gay S, Alarcón-Riquelme ME, Iaccarino L, Doria A. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmun Rev* 2012;11:604–9.
- [56] Antico A, Tampoia M, Tozzoli R, Bizzaro N. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev* 2012;12:127–36.
- [57] Rigamonti C, Shand LM, Feudjo M, Bunn CC, Black CM, Denton CP, et al. Clinical features and prognosis of primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis. *Gut* 2006;55:388–94.
- [58] Iaccarino L, Gatto M, Bettio S, Caso F, Rampudda M, Zen M, et al. Overlap connective tissue disease syndromes. *Autoimmun Rev* 2013;12:363–73.

Ultrasonographic Hand Features in Systemic Sclerosis and Correlates With Clinical, Biologic, and Radiographic Findings

MURIEL ELHAI, HENRI GUERINI, RAMIN BAZELI, JÉRÔME AVOUAC, VÉRONIQUE FREIRE, JEAN-LUC DRAPÉ, ANDRÉ KAHAN, AND YANNICK ALLANORE

Objective. To investigate ultrasonographic (US) hand features in systemic sclerosis (SSc) patients and their relationship with clinical, biologic, and radiographic data.

Methods. Fifty-two consecutive SSc patients were included in a cross-sectional observational study together with 24 rheumatoid arthritis (RA) patients enrolled as controls. All patients underwent clinical examination, including tender and swollen joint counts, measurement of disability indices, and hand/wrist radiographs. US was performed on the hand and wrist joints and was aimed at the detection of synovitis, tenosynovitis, and calcinosis.

Results. Synovitis and tenosynovitis were more frequently detected with US in SSc patients (46% and 27%, respectively) than with clinical examination (15% and 6%, respectively; $P < 0.01$ for both comparisons). Fifty-seven percent of patients had inflammatory synovitis (mostly Doppler grade 1), and tenosynovitis was either inflammatory or fibrotic. Calcifications were observed using US and radiographs in 40% and 36% of SSc patients, respectively ($P = 0.8$). As compared to RA, US features specific to SSc were sclerosing tenosynovitis ($P < 0.01$) and soft tissue calcifications ($P = 0.01$).

Conclusion. Our study confirms that articular involvement in SSc is underestimated by a single clinical examination. It is characterized by mild inflammatory changes and the specific findings include sclerotic US aspects together with calcinosis. Further prospective studies are warranted to evaluate the predictive value of these findings and determine whether they should be considered for adapting a therapeutic strategy.

Introduction

While tethering of the skin is the clinical hallmark of systemic sclerosis (SSc), skeletal involvement seems to be frequent (1–5). Joint symptoms are reported by 24–97% of SSc patients during the course of their disease, and they can even be inaugural (2,3). Manifestations are highly variable, ranging from arthralgias to frank arthritis, contractures, and tendon friction rubs (2). Clinical assessment is limited by concomitant skin disease.

Radiographic studies have shown that SSc can affect the joints, soft tissue, and bones of the hands (1,3,4,6). However, radiographs exhibit some limitations regarding their sensitivity to detect early inflammatory changes, such as

effusion or synovitis, and they cannot assess tendon damage. Therefore, radiographic and clinical evaluations are imperfect for assessing the whole spectrum of articular involvement in SSc. Ultrasonography (US) can precisely assess synovitis and effusion together with tendon and soft tissue involvements. It has dramatically improved joint and tendon evaluation in rheumatoid arthritis (RA) and other rheumatic diseases (7).

Very scarce data are available regarding US articular involvement in SSc. To date, there is only 1 study that suggested a high prevalence of subclinical synovitis, but correlations between US findings with clinical, biologic, and radiographic findings remain to be determined (8).

The objectives of our study were to analyze the prevalence and characteristics of US hand involvement in SSc as compared to RA, to determine the correlations between US findings and hand evaluation parameters, and to investigate a potential association between US features and other characteristics of the disease.

Materials and methods

Patients. Fifty-two consecutive SSc patients were included in a cross-sectional observational study together

Muriel Elhai, MD, Henri Guerini, MD, Ramin Bazeli, MD, Jérôme Avouac, MD, PhD, Véronique Freire, MD, FRCPC, Jean-Luc Drapé, MD, PhD, André Kahan, MD, PhD, Yannick Allanore, MD, PhD: Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Cochin Hospital, AP-HP, Paris, France.

Address correspondence to Yannick Allanore, MD, PhD, Service Rhumatologie A, Hôpital Cochin, 27 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. E-mail: yannick.allanore@cch.aphp.fr.

Submitted for publication October 8, 2011; accepted in revised form March 6, 2012.

Significance & Innovations

- Articular involvement in systemic sclerosis is frequent and underestimated by the single clinical examination.
- Ultrasonographic joint and tendon involvements appear to be mildly inflammatory in systemic sclerosis.
- Specific ultrasonographic hand features in systemic sclerosis seem to display a fibrotic pattern in cases of tenosynovitis and soft tissue calcifications.

with 24 RA patients, who were enrolled as controls. Clinical examination was performed by 2 physicians (ME and JA) who were blinded to the US and radiograph results. Tender and swollen joint counts, together with fingertip-to-palm distance and the presence of tendon friction rubs, were recorded (9).

US was performed on the joints of both hands (metacarpophalangeal [MCP], proximal interphalangeal [PIP], and distal interphalangeal [DIP] joints) and the wrists and fingers, and was aimed at the detection of synovitis, tenosynovitis, and calcinosis. All patients underwent biologic tests and a hand/wrist radiograph that was evaluated by 2 independent readers (ME and VF). Further methodologic details are reported in Supplementary Appendix A (available in the online version of this article at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)2151-4658](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)2151-4658)).

Statistical analysis. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. A multivariate stepwise logistic regression analysis was performed for all variables identified with a *P* value less than or equal to 0.05 univariately, with calculation of odds ratio (OR) estimates and 95% confidence intervals (95% CIs; for further details, see Supplementary Appendix A, available in the online version of this article at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)2151-4658](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)2151-4658)).

Results

Study population. We included 52 SSc patients (75% of whom were women) with a mean \pm SD age of 56.3 ± 14.1 years and a mean \pm SD disease duration of 8.6 ± 8.6 years; 21 SSc patients (40%) had diffuse cutaneous SSc. Rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies were detected in 27% and 4% of the SSc patients, respectively. The mean \pm SD erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) level were 15.2 ± 10 mm/hour and 4.9 ± 5.8 mg/liter, respectively. The treatment regimens for the SSc patients were a low dose of steroids in 23 of 52 patients, disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs; mostly methotrexate) in 19 of 52 patients, and rituximab in 5 of 52 patients. All of the other characteristics of the SSc patients are shown in Supplementary Table 1 (available in the online version of this article at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)2151-4658](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)2151-4658)). Twenty-four RA patients (87% of whom were women) with a mean \pm SD age of 57.1 ± 11.5 years and a mean \pm SD disease duration of 12 ± 8.7 years were included. RF and anti-CCP antibodies were positive in 67% and 54% of cases, respec-

Table 1. Clinical articular involvement among SSc and RA patients*

	SSc patients (n = 52)	RA patients (n = 24)
Patients with painful joints (on palpation)	20 (38)	17 (71)
Number of painful joints, mean \pm SD	2.9 ± 5.1	5.3 ± 6.5
Patients with painful joints		
Wrist	9 (17)	12 (50)
MCP joints	8 (15)	12 (50)
PIP joints	14 (27)	11 (46)
DIP joints	10 (19)	3 (12)
Patients with ≥ 1 swollen joint	8 (15)	14 (58)
Number of swollen joints, mean \pm SD	0.5 ± 1.8	2.0 ± 2.9
Distribution of the swollen joints		
Wrist	3 (6)	7 (29)
MCP joints	4 (8)	10 (42)
PIP joints	4 (8)	5 (21)
DIP joints	3 (6)	0
Tendon friction rubs	3 (6)	0
Distal palmar crease, mean \pm SD	0.7 ± 1.2	0.5 ± 1.1
Durooz hand index, mean \pm SD	13.5 ± 15.7	16.7 ± 18.4
HAQ score, mean \pm SD	0.8 ± 0.7	1.1 ± 0.9
SHAQ score, mean \pm SD	0.9 ± 0.6	

* Values are the number (percentage) unless otherwise indicated. SSc = systemic sclerosis; RA = rheumatoid arthritis; MCP = metacarpophalangeal; PIP = proximal interphalangeal; DIP = distal interphalangeal; HAQ = Health Assessment Questionnaire; SHAQ = Scleroderma Health Assessment Questionnaire.

Table 2. Comparison of ultrasonography findings between SSc patients and RA patients*

	SSc patients (n = 52)	RA patients (n = 24)	P
Synovitis	24 (46)	19 (79)	0.01
Total no. of joints with synovitis	68	63	
Characteristics of synovitis			
Inflammatory activity	39 (57)	41 (65)	NS
Power Doppler grade 1	33 (48)	23 (36)	0.2
Power Doppler grade 2 or 3	6 (9)	18 (29)	0.007
Distribution of synovitis			
Radioulnar joints	11 (16)	12 (19)	NS
Mediocarpal joints	15 (22)	13 (21)	NS
Radiocarpal joints	13 (19)	15 (24)	NS
MCP joints	12 (18)	14 (22)	NS
PIP joints	10 (15)	8 (13)	NS
DIP joints	7 (10)	1 (2)	NS
Tenosynovitis	14 (27)	6 (25)	NS
Total number of tendons with tenosynovitis	35	17	
Characteristics of tenosynovitis			
Sclerosing pattern	15 (43)	0 (0)	0.004
Inflammatory activity	19 (54)	12 (71)	NS
Sclerosing and inflammatory synovitis	6 (17)	0 (0)	NS
Distribution of tenosynovitis			
No. of extensor tendons	27	13	
Sclerosing pattern	14 (52)	0 (0)	
Power Doppler	14 (52)	10 (77)	
No. of flexor tendons	8	4	
Sclerosing pattern	1 (2)	0 (0)	
Power Doppler	5 (62)	2 (50)	
Calcifications	21 (40)	5 (21)	NS
In the tendon	6 (29)	1 (20)	NS
In the tendon sheath	5 (24)	1 (20)	NS
Intraarticular	14 (67)	5 (100)	NS
In the soft tissue	14 (67)	0 (0)	0.01

* Values are number (percentage) unless otherwise indicated. SSc = systemic sclerosis; RA = rheumatoid arthritis; NS = not significant; MCP = metacarpophalangeal; PIP = proximal interphalangeal; DIP = distal interphalangeal.

tively. The mean \pm SD Disease Activity Score in 28 joints was 3.3 ± 1.5 . The mean \pm SD ESR and CRP level were 17.9 ± 14.6 mm/hour and 6.1 ± 6.4 mg/liter, respectively. The treatment regimens for the RA patients were DMARDs in 20 of 24 patients, steroids in 19 of 24 patients (mean \pm SD dosage 7.9 ± 5.9 mg/day), and biologic agents in 13 of 24 patients at the time of US.

The clinical articular features of the SSc and RA patients are shown in Table 1. Twenty SSc patients (38%) had painful joints on palpation and 8 patients (15%) had swollen joints. Tendon friction rubs were present in 3 SSc patients (6%).

US findings in SSc versus RA patients. The results of US findings in SSc versus RA patients are shown in Table 2. US detected ≥ 1 joints with synovitis in 24 (46%) of 52 SSc patients. Sixty-eight joints with synovitis were detected in the 24 SSc patients, with a mean \pm SD number of joints with synovitis per patient of 2.8 ± 1.3 . Synovitis was found in the wrists, MCP joints, PIP joints, and DIP joints of SSc patients without a statistically significant difference when compared to the RA patients. Power Doppler re-

vealed inflammatory activity in 39 joints with synovitis in SSc patients (57%), 33 of which had a power Doppler grade of 1. Six joints (in 3 SSc patients) had synovitis with a power Doppler grade of 2 or 3. The frequency of positive intrasynovial power Doppler signal was not significantly different between RA and SSc patients; however, a grade 2 or 3 power Doppler signal was more likely observed in RA patients (29% versus 9%; $P = 0.007$).

For US of the tendons, tenosynovitis was found in 14 SSc patients (27%). A total of 35 tendons with tenosynovitis were detected, with a mean \pm SD of 2.5 ± 1.5 tendons with tenosynovitis per patient. Among the tendons with tenosynovitis, 43% were characterized by a hyperechoic tendon sheath thickening, a pattern considered as sclerosing. This pattern was more likely observed in the extensor tendons than in the flexor tendons (52% versus 2%; $P = 0.03$). Sclerosing tenosynovitis appeared to be specific to SSc patients (15 of 35 tendons in SSc patients versus 0 of 17 tendons in RA patients; $P = 0.004$). A power Doppler signal corresponding to an inflammatory pattern was detected in 19 (54%) of 35 tendons with tenosynovitis, which was in proportion to the RA patients. Although 9

Table 3. Radiologic articular involvement among SSc and RA patients*

	SSc patients (n = 52)	RA patients (n = 24)
Radiologic demineralization	11 (21)	9 (37)
Joint space narrowing		
Wrists	8 (15)	14 (58)
MCP joints	17 (52)	9 (37)
PIP joints, no./total (%)	2/42 (5)†	5/24 (21)
DIP joints, no./total (%)	4/42 (9)†	7/24 (29)
Erosions		
Wrists	6 (11)	13 (54)
MCP joints	5 (10)	11 (46)
PIP joints	5 (10)	4 (17)
DIP joints	5 (10)	2 (8)
Arthritis‡	10 (19)	15 (62)
Cutaneous atrophy	11 (21)	0
Flexion contracture	11 (21)	0
Calcinosis	19 (36)	0
Acroosteolysis	12 (23)	0
Resorption of distal ulna	1 (2)	7 (29)

* Values are the number (percentage) unless otherwise indicated. SSc = systemic sclerosis; RA = rheumatoid arthritis; MCP = metacarpophalangeal; PIP = proximal interphalangeal; DIP = distal interphalangeal.
† Of interpretable data.
‡ Defined by association of erosion and joint space narrowing.

(60%) of 15 tendons with sclerosing tenosynovitis had no power Doppler signal, 6 (17%) of 35 tendons with tenosynovitis were both sclerosing and inflammatory. US tenosynovitis occurred in patients with concomitant synovitis in 57% of cases.

For US of the soft tissue, calcifications were detected in both RA and SSc patients (21% and 40%, respectively), but soft tissue calcifications were specifically found in 67% of SSc patients versus 0% of RA patients ($P = 0.01$). Further details are provided in Table 2. Radiologic findings are shown in Table 3.

Correlations in SSc patients. *Association of joint findings with hand parameters in univariate analysis.* The presence of US synovitis was correlated with a higher number of swollen joints (mean \pm SD 1.2 ± 2.5 versus 0 ± 0 ; $P = 0.01$). All patients with clinical synovitis had US synovitis; however, synovitis was more frequently observed with US compared to clinical evaluation (46% versus 15%; $P < 0.01$). US detected 16 additional patients with synovitis ($P = 0.002$). No association between hand disability and synovitis was found.

Patients with a CRP concentration >10 mg/liter were more likely to have synovitis and/or tenosynovitis (6 [100%] of 6 patients versus 0%; $P < 0.05$) and inflammatory activity at power Doppler assessment (5 [83%] of 6 patients versus 1 [17%] of 6 patients; $P = 0.04$).

There was a trend for association of detection of erosions in radiography with US synovitis (9 [37%] of 24 patients versus 3 [11%] of 28 patients; $P = 0.05$). Particularly, erosion of the wrist was associated with radiocarpal synovitis (4 [31%] of 13 patients versus 2 [5%] of 39 patients; $P = 0.04$).

Association of joint findings with other characteristics of the disease in univariate analysis. SSc patients with a disease duration of ≤ 3 years had significantly more clinical synovitis than those whose disease duration was >3 years (5 of 14 patients versus 3 of 38 patients; $P = 0.04$); however, prevalence of US synovitis was not significantly different between both groups (43% versus 47%; $P = 0.95$).

There was a trend for lower disease duration in the subgroup of patients with grade 2 or 3 synovitis (mean \pm SD 4.3 ± 1.5 years) as compared to the rest of the cohort (mean \pm SD 9 ± 8.7 years); however, this did not reach significance ($P = 0.3$), probably because of the small sample size.

Joint multivariate analysis. Erosion detected by radiography was the only variable independently associated with synovitis (OR 5.0 [95% CI 1.2–21.4], $P = 0.03$; see Supplementary Table 2, available in the online version of this article at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)2151-4658](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)2151-4658)).

Association of tendon findings with hand parameters in univariate analysis. US tenosynovitis was more likely to occur in patients with tendon friction rubs (3 [21.4%] of 14 patients versus 0; $P = 0.02$), in those with a higher distal palmar crease (mean \pm SD 1.6 ± 1.7 versus 0.4 ± 0.8 ; $P = 0.003$), and in those with higher numbers of painful and swollen joints (mean \pm SD 6.2 ± 8.0 versus 1.7 ± 2.8 ; $P = 0.004$ and 1.6 ± 3.1 versus 0.2 ± 0.5 ; $P = 0.006$, respectively). Tendon friction rubs were only seen in patients with US tenosynovitis. Tenosynovitis was observed more frequently at the US evaluation than at the clinical examination (27% versus 6%; $P < 0.01$). US detected 11 additional patients with tenosynovitis ($P = 0.009$). Patients with US sclerosing tenosynovitis were more likely to have tendon friction rubs (3 [33%] of 9 patients versus 0; $P = 0.002$). No association between hand disability and tenosynovitis was found.

Joint space narrowing in the wrist and radiologic demineralization were associated with US tenosynovitis (5 [36%] of 14 patients versus 3 [8%] of 38 patients; $P = 0.04$ and 7 [50%] of 14 patients versus 4 [10%] of 38 patients; $P = 0.007$, respectively).

Association of tendon findings with other characteristics of the disease in univariate analysis. Tenosynovitis was associated with a higher modified Rodnan skin thickness score (mean \pm SD 16.8 ± 12.0 versus 9.4 ± 6.5 ; $P = 0.006$), presence of anti-Scl-70 antibodies (8 [57%] of 14 patients versus 7 [19%] of 37 patients; $P = 0.02$), and active or severe disease (8 [57%] of 14 patients versus 3 [8%] of 38 patients; $P = 0.0005$ and 8 [57%] of 14 patients versus 8 [21%] of 38 patients; $P = 0.03$, respectively). We did not find any association between sclerosing tenosynovitis and other fibrotic features of the disease (e.g., lung fibrosis).

Tendon multivariate analysis. Presence of anti-Scl-70 antibodies (OR 11.8 [95% CI 1.03–135.17], $P = 0.04$) and radiologic demineralization (OR 25.4 [95% CI 1.6–402.3], $P = 0.02$) were independently associated with tenosynovitis in multivariate analysis (see Supplementary Table 3, available in the online version of this article at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)2151-4658](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)2151-4658)).

For soft tissue, no significant difference was observed between US and radiography in detecting calcinosis.

Discussion

The main results of our study are that articular involvement in SSc is underestimated by the clinical examination, joint and tendon involvements are mildly inflammatory, and US hand features specific to SSc seem to display fibrotic tenosynovitis and soft tissue calcifications. Altogether, our results confirm that articular involvement is common in SSc (2–5). One of our main results is that US synovitis was detected in almost one-half of the patients (8,10,11). A previous US study suggested that synovitis in SSc patients was associated with the presence of some power Doppler signal, but without grading this signal (8). We herein showed, using a validated semiquantitative method, that synovitis was mildly inflammatory, with a power Doppler grade of 1 in most of the cases. Several reports have previously underlined that synovitis is related to CRP values in SSc (1,2,8). Here, we also found that an inflammatory activity at power Doppler assessment correlated with systemic inflammation. This is consistent with histologic analyses, revealing some evidence of synovial inflammation (12).

In 43% of the cases, synovitis was not inflammatory. Inactive synovitis has only been described in RA patients undergoing treatment (13). One may speculate that such synovitis could be a residual effect of an active synovitis following active treatment. This may also be an explanation of our SSc patients with inactive synovitis, who were all treated for joint involvement. Only longitudinal data will allow demonstrating this hypothesis.

US tenosynovitis was detected in 27% of the patients, in accordance with a previous magnetic resonance imaging (MRI) study assessing 38 asymptomatic patients (11). Two previous US and MRI studies with small sample sizes suggested a higher prevalence (10,14); however, these studies included symptomatic patients, whereas we included consecutive unselected patients. In one of these studies, most of the patients were assessed at the early stages of the disease and had the diffuse cutaneous subtype of SSc (10), which is thought to be the group with the highest risk (2,9).

In our study, US tenosynovitis did not correlate with disability. A possible explanation might be that our cohort may be regarded as mildly severe, as suggested by the low prevalence of tendon friction rubs.

We observed that tenosynovitis displayed a unique pattern, including a fibrotic US pattern. It predominantly involved the extensor tendons and was associated with the detection of tendon friction rubs. Our study is, to our knowledge, the first to assess US characteristics of tendon involvement in SSc. This unique pattern, specific to SSc patients, may become an important way to suspect SSc in cases of inaugural articular manifestations.

Clinical examination appeared to be insufficient in detecting articular involvement in our study. Indeed, it frequently faces difficulties because of concomitant skin involvement and/or flexion contractures. Previous studies have consistently underlined the high value of imaging

(MRI and/or US) in detecting subclinical synovitis in SSc (8,10,14).

Our study should be interpreted within its limitations; it was a cross-sectional study, thereby preventing the assessment of the natural history of US hand involvement. We included RA patients mainly to allow the comparison of US characteristics between the 2 groups, but not to directly compare the frequencies of the findings, which would need larger groups. A control group of patients with other fibrotic disorders (e.g., Dupuytren's contracture) would be meaningful to further delineate the input of US in such conditions. This study included a small heterogeneous sample group of SSc patients, but this reflects the heterogeneity of the disease. Furthermore, the preferential involvement of the extensor tendons might have reflected a bias of sampling. US is an operator-dependent method, and we could not perform reproducibility and concordance analyses herein since the same patients were not examined by the 2 examiners. Nevertheless, these investigations were performed by trained radiologists (13).

In conclusion, US articular involvement in SSc is underrecognized by the single clinical examination. It is characterized by mild inflammatory changes associated with systemic inflammation and with US sclerosing findings for tenosynovitis. Further, larger prospective studies are warranted to evaluate the possibility of using hand US in the followup of SSc patients and to assess the predictive value of US abnormalities in hand damage.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Allanore had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Elhai, Avouac, Kahan, Allanore.

Acquisition of data. Elhai, Guerini, Bazeli, Avouac, Freire, Drapé, Allanore.

Analysis and interpretation of data. Elhai, Guerini, Freire, Allanore.

REFERENCES

1. Avouac J, Guerini H, Wipff J, Assous N, Chevrot A, Kahan A, et al. Radiological hand involvement in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1088–92.
2. Avouac J, Walker U, Tyndall A, Kahan A, Matucci-Cerinic M, Allanore Y, et al. Characteristics of joint involvement and relationships with systemic inflammation in systemic sclerosis: results from the EULAR Scleroderma Trial and Research Group (EUSTAR) database. *J Rheumatol* 2010;37:1488–501.
3. Baron M, Lee P, Keystone EC. The articular manifestations of progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis* 1982;41:147–52.
4. La Montagna G, Sodano A, Capurro V, Malesci D, Valentini G. The arthropathy of systemic sclerosis: a 12 month prospective clinical and imaging study. *Skeletal Radiol* 2005;34:35–41.
5. Avouac J, Mogavero G, Guerini H, Drape JL, Mathieu A, Kahan A, et al. Predictive factors of hand radiographic lesions in systemic sclerosis: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 2011;70:630–3.
6. Koutaissoff S, Vanthuyne M, Smith V, De Langhe E, Depresieux G, Westhovens R, et al. Hand radiological damage in systemic sclerosis: comparison with a control group and clin-

- ical and functional correlations. *Semin Arthritis Rheum* 2011; 40:455–60.
7. Weidekamm C, Koller M, Weber M, Kainberger F. Diagnostic value of high-resolution B-mode and Doppler sonography for imaging of hand and finger joints in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:325–33.
 8. Cuomo G, Zappia M, Abignano G, Iudici M, Rotondo A, Valentini G. Ultrasonographic features of the hand and wrist in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:1414–7.
 9. Steen VD, Medsger TA Jr. The palpable tendon friction rub: an important physical examination finding in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1146–51.
 10. Low AH, Lax M, Johnson SR, Lee P. Magnetic resonance imaging of the hand in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2009; 36:961–4.
 11. Allanore Y, Seror R, Chevrot A, Kahan A, Drape JL. Hand vascular involvement assessed by magnetic resonance angiography in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2747–54.
 12. Rodnan GP. The nature of joint involvement in progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma). *Ann Intern Med* 1962;56:422–39.
 13. Guerini H, Ayrat X, Campagna R, Feydy A, Pluot E, Rousseau J, et al. US evaluation of the hands and feet in rheumatoid arthritis. *J Radiol* 2010;91:99–110.
 14. Chitale S, Giapetti A, Hodgson R, Grainger A, O'Connor P, Goodson NJ, et al. Magnetic resonance imaging and musculoskeletal ultrasonography detect and characterize covert inflammatory arthropathy in systemic sclerosis patients with arthralgia. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2357–61.



Available online at
ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
 www.em-consulte.com/en



Review

Systemic sclerosis: Recent insights



Muriel Elhai^{a,b}, Jérôme Avouac^{a,b}, André Kahan^a, Yannick Allanore^{a,b,*}

^a Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Rheumatology A department, Cochin Hospital, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques 75014 Paris, France

^b Inserm U1016, Cochin Hospital, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques 75014 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 29 October 2014

Available online 31 December 2014

Keywords:

Systemic sclerosis
 Treatment
 Pathogenesis
 Raynaud's phenomenon
 Fibrosis

ABSTRACT

Systemic sclerosis is an orphan connective tissue disease characterized by alterations of the microvasculature, disturbances of the immune system and massive deposition of collagen and other matrix substances in the skin and internal organs. A major achievement of the recent years has been the validation of new classification criteria, allowing earlier diagnosis and earlier treatment of systemic sclerosis, before irreversible fibrosis and organ damage appeared ("window of opportunity"). Raynaud's phenomenon is usually the first sign of the disease and is considered as the main sentinel sign for the identification of very early systemic sclerosis. Systemic sclerosis is clinically heterogeneous and disease course remains unpredictable. Its prognosis depends on cardiopulmonary involvement and recent studies aim to identify serum or genetic biomarkers predictive of severe organ involvement. Moreover, the prospective follow-up of large cohorts has provided and will offer critical material to identify strong prognostic factors. Whereas the outcomes of vascular manifestations of the disease has been recently improved due to targeted therapy, recent data have highlighted that mortality has not changed over the past 40 years. This reflects the absence of efficacy of current available drugs to counteract the fibrotic process. Nevertheless, several targeted immunity therapies, commonly with proven efficacy in other immune diseases, are about to be investigated in systemic sclerosis. Indeed, promising results in small and open studies have been reported. This article deals with recent insights into classification criteria, pathogenesis, organ involvements, outcome and current and possible future therapeutic options in systemic sclerosis.

© 2014 Société française de rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Classification of systemic sclerosis

A major achievement of the recent years has been the validation of new ACR/EULAR classification criteria for systemic sclerosis (SSc) (Table 1) [1]. These criteria were developed because the 1980 ACR classification criteria lacked sensitivity for diagnosis, particularly in cases of early SSc and limited cutaneous SSc (lcSSc). Sensitivity and specificity in the validation sample were, respectively, 0.91 and 0.92 for the new criteria, which contrasts with the 0.75 and 0.72 values for the 1980 ACR classification criteria.

These new criteria should allow for more patients to be classified as having SSc, particularly those with the lcSSc and early SSc and therefore, recruit such patients in clinical trials. This is of major interest, since recent data suggest that there could be a "window" of opportunity to treat patients, before irreversible fibrosis develops.

Potential new therapies should be assessed in patients with early SSc, which is now made easier thanks to these criteria.

2. Recent insights in pathogenesis

SSc is characterized by microvascular abnormalities, immune activation with autoimmunity and then fibroblastic activation leading to fibrosis.

2.1. Vasculopathy

Early vascular events include endothelium's dysfunction and injury with apoptosis of endothelial cells. The molecular mechanisms underlying early pathogenic changes in endothelial cells remain unclear. A recent study showed that down-regulation of the transcription factor GATA-6 in endothelial cells represented a key pathological event during development of pulmonary arterial hypertension (PAH) [2]. It was suggested that reduction of GATA-6 occurs before vessel occlusion and may reflect an early phase of endothelial cell activation and/or dysfunction during PAH. Furthermore, mice knockout for GATA-6 in endothelial cells spontaneously developed features of PAH.

* Corresponding author at: Paris Descartes University, Rheumatology A department, Cochin Hospital, 27, rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France. Tel.: +33 1 58 41 25 63; fax: +33 1 58 41 26 24. E-mail address: yannick.allanore@cch.aphp.fr (Y. Allanore).

Table 1
The American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for the classification of systemic sclerosis^a [1].

Item	Sub-item(s)	Weight/score ^b
Skin thickening of the fingers of both hands extending proximal to the metacarpophalangeal joints (<i>sufficient criterion</i>)	–	9
Skin thickening of the fingers (<i>only count the higher score</i>)	Puffy fingers	2
	Sclerodactyly of the fingers (distal to the metacarpophalangeal joints but proximal to the proximal interphalangeal joints)	4
Fingertip lesions (<i>only count the higher score</i>)	Digital tip ulcers	2
	Fingertip pitting scars	3
	–	2
Telangiectasia	–	2
Abnormal nailfold capillaries	–	2
Pulmonary arterial hypertension and/or interstitial lung disease (<i>maximum score is 2</i>)	Pulmonary arterial hypertension	2
	Interstitial lung disease	2
Raynaud's phenomenon	–	3
SSc-related autoantibodies (anticentromere, anti-topoisomerase I [anti-Scl-70], anti-RNA polymerase III) (<i>maximum score is 3</i>)	Anticentromere	3
	Anti-topoisomerase I	3
	Anti-RNA polymerase III	3

SSc: systemic sclerosis.

^a These criteria are applicable to any patient considered for inclusion in a systemic sclerosis study. The criteria are not applicable to patients with skin thickening sparing the fingers or to patients who have a scleroderma-like disorder that better explains their manifestations (e.g., nephrogenic sclerosing fibrosis, generalised morphea, eosinophilic fasciitis, scleredema diabeticorum, scleromyxedema, erythromyalgia, porphyria, lichen sclerosis, graft-versus-host disease, and diabetic cheiroarthropathy).

^b The total score is determined by adding the maximum weight (score) in each category. Patients with a total score of ≥ 9 are classified as having definite systemic sclerosis.

New data were recently published regarding the key role of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in SSc-vasculopathy. First, the late capillaroscopic pattern characterized by a severe vasculopathy with extensive avascular areas is associated with increased VEGF levels [3]. Furthermore, VEGF may act as a molecular link between vasculopathy and fibrosis, as it was suggested by two recent studies [4,5]. Indeed, in two mouse models of SSc, using VEGF mono and double transgenic mice, Maurer et al. showed that VEGF dose-dependently exerts strong profibrotic effects [4]. These profibrotic effects were accompanied by a vasculopathy with an increase in vessel wall thickness, which is a classical feature of SSc-microangiopathy.

In another study, key features of SSc-PAH were reproduced in a mouse model (T β RII Δ κ -fib) following inhibition of VEGF [5]. This model is characterized by a ligand-dependent up-regulation of transforming growth factor β (TGF- β) signaling and reproduces fibrotic features of SSc, underlining the link between TGF- β and VEGF signaling.

There is also impairment in compensatory mechanisms for vascular damage and chronic hypoxia, which are angiogenesis (compensatory growth of new vessels from existing vessels) or vasculogenesis (*de novo* formation of new vessels). The role of VEGF in the impairment in angiogenesis was supported by one study, demonstrating an inverse gene-dosing effect on the efficacy of angiogenesis between VEGF mono and double transgenic mice [4]. Another study suggested that the loss of the expression of the endothelial cell-derived factor EGFL7 in endothelial cells and their progenitors might play a role in SSc-vasculopathy and contribute to impaired angiogenesis and vasculogenesis [6]. It was also recently suggested that *in vivo* neovascularization capacity of endothelial progenitor cells was defective in SSc-patients, contributing to defective vasculogenesis [7].

2.2. Dysimmunity

Regarding genetic factors, the most consistent data have identified genes involved in autoimmunity. Several of these genes are already well-established risk factors for other autoimmune diseases, raising the concept of shared autoimmunity [8,9]. This is a major step forward and some genes are robustly associated with the disease or some subsets; this might suggest that shared therapies could be of help in various autoimmune diseases but it also suggests that post-genomic data are required to better establish the

role of these genes on the fibrotic propensity that characterizes SSc. Two studies have demonstrated the contribution of two immune genes (i.e. CD226 and STAT4) in SSc-pathogenesis and dermal fibrosis *in vivo* [10–12]. In another study, targeting IL-6 by both passive and active immunization strategies prevented the development of inflammatory driven dermal fibrosis [13].

A new hypothesis has been proposed concerning the pathogenesis of SSc [14]. SSc would be in some cases a paraneoplastic syndrome, initiated by exposure to a foreign tumoral antigen that cross-reacts with endogenous molecules. This is a stimulating new area of interest which fits well with all the developments of the immune control of neoplasia and that will deserve further confirmative studies.

2.3. Fibrosis

Fibrosis is the clinical hallmark of SSc and may be exacerbated by the failure of intrinsic mechanisms that normally constrain fibroblast activation (e.g. the nuclear receptor PPAR- γ). Moreover, intrinsic alterations in SSc-fibroblasts resulting from epigenetic changes have been identified, such as DNA methylation changes and altered microRNA expression that might contribute to the persistent activated phenotype of fibroblasts [15].

3. Prognosis of systemic sclerosis

SSc is the most severe connective tissue disease (CTD). The standardized mortality ratio has been estimated to 3.5, as compared to age and sex-matched population in a meta-analysis [16]. Mortality has not significantly changed over the past 40 years, reflecting the insufficient efficacy of available therapies. Causes of death were studied in the EUSTAR cohort including 5860 SSc-patients in 2010 [17]. Deaths were in 55% of the cases SSc-related and in 41% of the cases SSc-unrelated. Among SSc-related deaths, 35% were secondary to lung fibrosis, 26% to PAH, 26% to heart involvement (heart failure or arrhythmias) and 4% to scleroderma renal crisis (SRC), whereas unrelated SSc-causes included infections (33%), neoplasia (31%) and cardiovascular diseases (29%). SSc-patients have an increased risk of cancer [18]. However, absolute risk is relatively low. Patients with anti-RNA polymerases III seem to have a higher risk of cancer in close temporal relationship to onset of SSc, which suggests a paraneoplastic phenomenon in this

subset of SSc. Investigations for underlying malignancy should be considered in these cases [19].

The challenge is now to identify SSc-patients more likely to progress and to die. Some studies aim to determine prognostic models to predict more accurately the outcome of each patient, which might lead ultimately to personalized medicine. For example, a simple prognostic model using five parameters (age, male gender, urine protein, elevated erythrocyte sedimentation rate and low carbon monoxide diffusing capacity [DLCO]) was recently validated in the EUSTAR cohort to predict 5-year survival at diagnosis in SSc [20].

However, SSc is a very heterogeneous disease, not only at onset, but also during disease course. Therefore, it is crucial to determine risk factors to predict the development of severe organ involvement.

4. Organ involvement and therapies

4.1. Peripheral vascular disease

Raynaud's phenomenon (RP) is present in almost all SSc-patients and is usually the first sign of the disease [21]. It may precede other organ involvement for many years.

The EUSTAR group performed a Delphi consensus to identify patients with a potential very early SSc (VEDOSS study). The objectives were an earlier diagnosis and an earlier treatment of SSc, before irreversible fibrosis and organ damage appear ("window of opportunity") [22]. Three red flags were proposed: RP, puffy fingers/sclerodactyly and antinuclear antibodies. These red flags should lead to perform nailfold capillaroscopy and to search for SSc-specific antibodies (anticentromere [ACA] and anti-topoisomerase 1 [Scl70]) to diagnose a very early SSc. Indeed, a previous study about 600 patients without CTD referred for evaluation of RP, showed that 73% of the patients with abnormal findings on capillaroscopy at baseline together with a SSc-specific autoantibody developed SSc after 10 years, whereas 98% of the patients having neither abnormal capillaroscopy nor SSc-specific antibodies remained primary RP [23]. Abnormalities in capillaroscopy can be divided into 3 patterns: an "early pattern" (few giant capillaries, no evident loss of capillaries, and relatively well-preserved capillary distribution), an "active pattern" (frequent giant capillaries, frequent capillary microhemorrhages and moderate loss of capillaries), and a "late pattern" (relative absence of giant capillaries and microhemorrhages, severe loss of capillaries with extensive avascular areas and ramified/bushy capillaries). Recent studies have proposed using capillaroscopy as clinical biomarker of disease activity and severity with the most severe pattern being the late one [24]. More work is ongoing to determine whether in addition to its input in the classification, capillaroscopy might be of help to risk-stratify the patients for severe complication.

4.1.1. Vascular smooth muscle cells relaxation

Calcium-channel blockers (CCB) are first-line therapies for RP in SSc. In a recent Cochrane review including seven randomized trials, CCB appeared as minimally effective in the treatment of RP, with a 1.72 reduction in frequency of attacks [25]. However, these results were limited by small sample size and variable data quality. In practice, it is the first-line treatment with a recommended long-term use to try to reduce disease vascular progression. Furthermore, CCB were recently suggested to provide a renal protection, in addition to their other possible systemic effects, such as amelioration of myocardial perfusion and prevention of left ventricular dysfunction [26]. This underlines the possible role of CCB as a "background" SSc-therapy.

4.1.2. Endothelial cell injury

In case of digital ulcers (DU), specific therapies target the three main pathways involved in vasculopathy: endothelin, prostacyclin and nitric oxide pathways.

4.1.2.1. Endothelin. Bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, has shown its efficacy in two randomized, double blind, placebo-controlled studies of 16 and 24 weeks for prevention of DU with respectively 48% and 30% of reduction of new DU, as compared to placebo [27,28]. There was no difference between treatments neither in healing rate of the cardinal ulcer nor in treatment of RP.

4.1.2.2. Prostacyclin. Prostacyclin analogues (intravenous iloprost) demonstrated its benefit in the treatment of DU secondary to SSc and seem to be effective in their prevention but evidence based is missing.

4.1.2.3. Nitric oxide pathway. Phosphodiesterase-5 inhibitors have shown to have a significant but moderate efficacy in secondary RP in a recent meta-analysis of randomized trials with a decrease in daily frequency of ischaemic attacks by -0.49 ($P < 0.0001$), and daily duration of attacks by -14.62 min ($P < 0.0001$) [29]. Preliminary observational data have also suggested a potential benefit to heal DU but randomized trials are mandatory to confirm or not such findings. The results of a phase III study SEDUCE are awaited by the end of this year (number 01295736).

A novel drug (Riociguat), which is a stimulator of soluble guanylate cyclase, also targets this pathway, but it has not been evaluated so far in DU, it is licensed in the context of pulmonary hypertension.

4.2. Kidney

SRC with malignant hypertension and rapidly progressive renal failure is a major complication of SSc. Whereas SRC was observed in 12–18% of the patients in American cohorts before 1970, its prevalence has been recently estimated at 2% in the EUSTAR cohort [30]. Anti-RNA polymerase III antibodies are strongly associated with SRC and may be used to identify patients at high risk for SRC [31].

Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors are the first-line therapy for SRC, but outside of specialized centers, the mortality of SRC remains high, with overall 5-year mortality between 30 and 50%. One issue was to evaluate if ACE inhibitors should be given to prevent renal damage in high-risk patients. In a prospective cohort study of 87 incident SRC subjects, prior exposure to ACE inhibitors was associated with an increased risk of death after the onset of SRC, suggesting that ACE inhibitors should not be given for prevention of SRC [32]. A recent retrospective study suggested that CCB may have a protective effect on the development of SRC [26]. A differential diagnosis of SRC is SSc-overlap with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies-associated glomerulonephritis.

4.3. Pulmonary arterial hypertension (PAH)

Prevalence of pulmonary hypertension in SSc is about 9% [33]. The gold standard for the diagnosis of PAH is right heart catheterization (RHC). It is a key issue to select accurately the patients who need to be investigated by RHC. An expert consensus was performed, using Delphi method, to identify which criteria are the most appropriate in clinical practice to refer SSc-patients for RHC [34]. Selected criteria were based on clinical assessment (progressive dyspnea over the past 3 months, unexplained dyspnea, worsening of WHO dyspnea functional class, any finding on physical examination suggestive of elevated right heart pressures and any sign of right heart failure), echocardiography (systolic pulmonary artery pressure [PAPS] > 45 mmHg and right

ventricle dilation) and pulmonary function tests (DLCO < 50% without pulmonary fibrosis [PF]). An evidence-based algorithm, which included the ratio FVC%/DLCO%, predicted the presence of current or past telangiectasias, ACA positivity, N-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels, urate levels and a right axis deviation on EKG and echographic parameters (right atrium area and tricuspid regurgitant jet velocity) was developed for PAH detection in SSc (the DETECT score [<http://www.detect-pah.com>]) [35]. Codullo V. et al. validated the Cochin risk prediction score (including age, FVC and DLCO/alveolar volume) as an independent predictor of development of PAH during the follow-up [36,37]. They also highlighted the interest of stress Doppler echocardiography, since the difference between PAPS under exercise and at rest was also predictive of PAH.

Recent studies aim to identify serum or genetic biomarkers predictive for PAH. Some serum biomarkers appear as promising, such as ET-1 and sCD40L, but these results are limited by the definition of PAH based on echography instead of RHC [38]. Higher levels of CXCL4 were associated with PAH, confirmed on RHC [39]. Further larger studies are warranted to confirm these preliminary results.

The prognosis of SSc-associated PAH has improved relative to historical series with a 3-year survival of 60% in SSc-PAH and 50% in SSc-pulmonary hypertension-ILD [40]. This may partly be due to aggressive PAH-targeted therapy targeting the three main pathways involved in PAH-pathogenesis (i.e. endothelin, prostacyclin and nitric oxide pathways).

Guidelines for PH management and treatment have been recently updated [41]. New information mainly reports that combination therapy seems very promising. It is well documented that re-assessing after 2–3 months of initiation of any drug is critical in order to define whether a response is observed or if step-up therapy is required. Among the criteria, dyspnea class and NT-proBNP levels are critical but a new RHC is also recommended to evaluate the changes in hemodynamics.

Recently macitentan, a new dual endothelin-receptor antagonist, significantly reduced time to worsening of PAH and mortality in a large randomized controlled trial [42]. Riociguat improved exercise capacity among patients with PAH in a phase III double-blind study [43]. However, for both studies, the population-study consisted predominantly of idiopathic-PAH including a small subgroup of CTD-patients, preventing from any firm conclusion in the subgroup of SSc-patients.

4.4. Interstitial lung disease (ILD)

PF is a major cause of death in SSc [17]. Pulmonary function tests and high-resolution computed tomography (HRCT) are used for diagnosis, but also for prognosis of ILD [44].

Extensive fibrosis (defined by severe disease on HRCT [extent \geq 20%] or in indeterminate cases by FVC < 70%) has an increased risk of deterioration and mortality as compared to limited diseases. Recent studies aimed to identify clinical parameters and serum or genetic biomarkers predictive for development and severity of ILD.

A predictive model for the development of PF in a long-term cohort included the diffuse cutaneous subtype (dcSSc), greater age at onset, lower FVC and DLCO and anti-Scl70 antibodies, whereas ACA were protective [45]. Promising serum biomarkers are surfactant protein-D and Krebs von den Lungen-6, but with conflicting results according to studies [38]. The chemokine CXCL4 was recently identified as a biomarker to predict the development and the progression of ILD [39].

Some genetic biomarkers for ILD were also identified and confirmed in replication studies, such as CD226 and IRF5 gene polymorphisms [46,47].

Therefore, diagnosis and evaluation of ILD has improved these recent years. Conversely, so far, no drug has proven its efficacy to prevent or treat lung fibrosis. Despite a modest treatment effect and results non-clinically relevant, EUSTAR proposes the use of immunosuppressors, such as cyclophosphamide in ILD [48]. However, it remains to identify a subset of patients that may benefit from this treatment. A multicenter randomized, double blind, placebo-controlled study is ongoing to assess the effect of cyclophosphamide in progressive ILD (number 01570764). There are also two other ongoing clinical trials in SSc-ILD assessing respectively pomalidomide (number 01559129) and pirfenidone (number 01933334), which is also approved in idiopathic PF.

4.5. Heart

Primary myocardial disease results from microvascular involvement and is associated with a poor prognosis, when clinically apparent. A recent cohort study underlined the high mortality associated with silent cardiac involvement, highlighting the need of a rigorous cardiac screening of SSc-patients, particularly before autologous stem cell transplantation [49].

The prevalence of left ventricular dysfunction in SSc was estimated to 5.4% in EUSTAR cohort [30]. Age, male gender, DU, myositis and lung involvement were independent predictors of left ventricular dysfunction, whereas the use of CCB appeared as protective.

Diastolic dysfunction is common in SSc and worsens with time. It is better assessed by tissue-Doppler echocardiography [50]. Left ventricular diastolic function may lead to post-capillary pulmonary hypertension and to an inappropriate diagnosis of PAH [51]; this is a growing condition in SSc but also in the general population. This mandates the need of a rigorous heart's assessment, with RHC that may be sensitized by measurements of hemodynamic data after fluid challenge that can reveal occult pulmonary venous hypertension.

Some reports suggest that myocarditis is a common finding in SSc-patients with recent-onset cardiac involvement [52,53]. Cardiac magnetic resonance imaging (MRI) is the key imaging modality to distinguish between inflammation and fibrosis [54].

A routine cardiac workup has been proposed for SSc-patients including cardiovascular risk assessment, standard 12-lead EKG, 24-h Holter monitoring, Doppler (and tissue-Doppler) echocardiography and natriuretic peptides [55].

4.6. Gastro-intestinal

The gastro-intestinal tract is affected in 75% to 90% of SSc-patients. Gastric antral vascular ectasia (GAVE) is a rare complication of the disease (1% of SSc-patients in EUSTAR cohort). A recent study has highlighted the association with anti-RNA polymerase III antibodies and the risk of SRC, which requires a specific work-up in such GAVE-patients [56].

4.7. Musculoskeletal involvement

In EUSTAR cohort, frequencies of synovitis, tendon friction rubs, and joint contractures were 16%, 11%, and 31%, respectively [57]. Articular involvement was associated with a more severe disease. Patients with early dcSSc having tendon friction rubs had a > 2-fold risk of developing SRC and cardiac and gastro-intestinal complications over 5 years and poorer 5- and 10-year survival rates as compared to SSc-patients without tendon friction rubs [58]. Altogether, these results suggest that inflammatory joint involvement may help to identify patients of bad prognosis and at risk of severe organ damage.

Some recent studies have underlined the potential usefulness of new imaging tools, such as ultrasonography (US) and MRI for a better evaluation of joint involvement in SSc. We showed that synovitis and tenosynovitis were more frequently detected with US (46% and 27%, respectively) than with clinical examination (15% and 6%, respectively; $P < 0.01$) [59]. Synovitis was mostly mildly inflammatory, whereas tenosynovitis associated inflammatory and fibrotic changes.

5. Disease-modifying drugs

5.1. Synthetic DMARDs

5.1.1. Methotrexate

By analogy with rheumatoid arthritis, methotrexate is used for the treatment of inflammatory arthritis, with preferential use of subcutaneous route of administration because of the high frequency of malabsorption.

Based on two placebo-controlled small studies, suggesting an improvement in skin score without effect on pulmonary involvement, and expert opinion, methotrexate is recommended by the EULAR and the EUSTAR groups for treatment of skin manifestations of early dcSSc [48].

5.1.2. Mycophenolate mofetil (MMF)

MMF has shown encouraging results in observational studies with improvement in skin score, a lower frequency of PF and a better 5-year survival in the MMF-treated group [60]. Larger prospective randomized trials are awaited to confirm these preliminary results. In USA, a trial comparing oral cyclophosphamide and MMF in SSc-associated ILD is ongoing.

5.2. Biologic DMARDs

5.2.1. Rituximab

The EUSTAR group has compared patients receiving rituximab in routine clinical practice upon the decision of their physicians and untreated matched-control patients from the database [61]. After 6 months, in patients with severe dcSSc, the skin changes were larger in the rituximab group versus matched-controls ($P = 0.03$). In patients with ILD, rituximab prevented significantly the further decline of FVC. The treatment was well-tolerated. These promising results need to be confirmed in phase III randomized-controlled trials.

5.2.2. Tocilizumab/Abatacept

A preliminary study has suggested that tocilizumab and abatacept could be safe and effective in SSc-patients with refractory polyarthritis [62]. However, no trend for any change of fibrotic lesions was seen, but this may relate to the exposure time and inclusion criteria. A phase III study of tocilizumab in dcSSc is finished (number 01532869).

5.2.3. Tyrosine kinase inhibitors

A phase II randomized double-blinded controlled trial did not demonstrate any efficacy of imatinib to improve skin fibrosis in dcSSc [63]. Furthermore, it has a poor tolerance in SSc.

5.3. Autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)

In a recent randomized controlled trial, non-myeloablative autologous HSCT showed significantly better long-term event-free survival and overall survival in patients with early dcSSc compared to cyclophosphamide [64]. However, these results were limited by a high treatment-related mortality (associated with

cardiopulmonary involvement) (10%) and relapse (22%). This highlights the need of a rigorous patient selection [49].

6. Conclusion

The knowledge of SSc has improved greatly. However, disease course is clinically heterogeneous and remains unpredictable. The challenges are (i) an earlier diagnosis, which should be possible thanks to new classification criteria and VEDOSS project and (ii) the identification of patients at risk of severe organ involvement, using systemic or genetic biomarkers. New targeted immunity therapies are a promising approach for the treatment of early SSc, because biologic DMARDs are routinely used in rheumatology and their benefit/risk ratio is well established. Despite encouraging preliminary data, large randomized controlled trials are mandatory before drawing any conclusion. Maybe in the future, combination therapies targeting both vascular and immune processes, like in cancer, in which complementary pathways are targeted, could be the way to prevent and treat fibrosis.

Disclosures of interest

ME and AK have no conflicts of interest.

JA have an activity of Honoraria and/or research funding from Actelion, Sanofi-Aventis, Bristol Myers Squibb and Roche YA have an activity of Consultancy relationships and/or research funding from: Bayer Pharma, Actelion, Pfizer, Sanofi-Aventis and Roche, in the area of potential treatments of scleroderma.

References

- [1] Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1747–55.
- [2] Ghatnekar A, Chrobak I, Reese C, et al. Endothelial GATA-6 deficiency promotes pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol* 2013;182:2391–406.
- [3] Avouac J, Vallucci M, Smith V, et al. Correlations between angiogenic factors and capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R55.
- [4] Maurer B, Distler A, Suliman YA, et al. Vascular endothelial growth factor aggravates fibrosis and vasculopathy in experimental models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2013.
- [5] Derrett-Smith EC, Dooley A, Gilbane AJ, et al. Endothelial injury in a transforming growth factor β -dependent mouse model of scleroderma induces pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum* 2013;65:2928–39.
- [6] Manetti M, Guiducci S, Romano E, et al. Decreased expression of the endothelial cell-derived factor EGFL7 in systemic sclerosis: potential contribution to impaired angiogenesis and vasculogenesis. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R165.
- [7] Kuwana M, Okazaki Y. Brief report: impaired in vivo neovascularization capacity of endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1300–5.
- [8] Elhai M, Avouac J, Kahan A, et al. Systemic sclerosis at the crossroad of polyautoimmunity. *Autoimmun Rev* 2013;12:1052–7.
- [9] Meunier M, Bazeli R, Feydy A, et al. Incomplete thymic involution in systemic sclerosis and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine Rev Rhum* 2013;80:48–51.
- [10] Avouac J, Elhai M, Tomcik M, et al. Critical role of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of inflammation-driven dermal fibrosis in a mouse model of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1089–98.
- [11] Avouac J, Furrrohr BG, Tomcik M, et al. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2011;63:800–9.
- [12] Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine Rev Rhum* 2013;80:23–8.
- [13] Desallais L, Avouac J, Fréchet M, et al. Targeting IL-6 by both passive or active immunization strategies prevents bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R157.
- [14] Joseph CG, Darrah E, Shah AA, et al. Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science* 2014;343:152–7.
- [15] Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:42–54.
- [16] Elhai M, Meune C, Avouac J, et al. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatol (Oxford)* 2012;51:1017–26.
- [17] Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1809–15.

- [18] Onishi A, Sugiyama D, Kumagai S, et al. Cancer incidence in systemic sclerosis: meta-analysis of population-based cohort studies. *Arthritis Rheum* 2013;65:1913–21.
- [19] Moinzadeh P, Fonseca C, Hellmich M, et al. Association of anti-RNA polymerase III autoantibodies and cancer in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R53.
- [20] Fransen J, Popa-Diaconu D, Hesselstrand R, et al. Clinical prediction of 5-year survival in systemic sclerosis: validation of a simple prognostic model in EUSTAR centres. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1788–92.
- [21] Emad Y, Al-Sherbeni H, Ragab Y, et al. Arterial vasculopathy in systemic sclerosis: computerized tomography (CT) angiographic features of macrovascular and microvascular upper limbs arteries. *Joint Bone Spine Rev Rhum* 2014.
- [22] Avouac J, Fransen J, Walker UA, et al. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. *Ann Rheum Dis* 2011;70:476–81.
- [23] Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2008;58:3902–12.
- [24] Smith V, Decuman S, Sulli A, et al. Do worsening scleroderma capillaroscopic patterns predict future severe organ involvement? a pilot study. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1636–9.
- [25] Ennis H, Anderson ME, Wilkinson J, et al. Calcium channel blockers for primary Raynaud's phenomenon. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;1:CD002069.
- [26] Montanelli G, Beretta L, Santaniello A, et al. Effect of dihydropyridine calcium channel blockers and glucocorticoids on the prevention and development of scleroderma renal crisis in an Italian case series. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31:135–9.
- [27] Korn JH, Mayes M, Matucci Cerinic M, et al. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2004;50:3985–93.
- [28] Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2011;70:32–8.
- [29] Roustit M, Blaise S, Allanore Y, et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors for the treatment of secondary Raynaud's phenomenon: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1696–9.
- [30] Allanore Y, Meune C, Vonk MC, et al. Prevalence and factors associated with left ventricular dysfunction in the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) database of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:218–21.
- [31] Shanmugam VK, Steen VD. Renal disease in scleroderma: an update on evaluation, risk stratification, pathogenesis and management. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:669–76.
- [32] Hudson M, Baron M, Tatibouet S, et al. International Scleroderma Renal Crisis Study Investigators. Exposure to ACE inhibitors prior to the onset of scleroderma renal crisis—Results from the International Scleroderma Renal Crisis Survey. *Semin Arthritis Rheum* 2014;43:666–72.
- [33] Avouac J, Airò P, Meune C, et al. Prevalence of pulmonary hypertension in systemic sclerosis in European Caucasians and metaanalysis of 5 studies. *J Rheumatol* 2010;37:2290–8.
- [34] Avouac J, Huscher D, Furst DE, et al. Expert consensus for performing right heart catheterisation for suspected pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a Delphi consensus study with cluster analysis. *Ann Rheum Dis* 2014;73:191–7.
- [35] Coghlan JG, Denton CP, Grünig E, et al. Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis* 2013.
- [36] Meune C, Avouac J, Airò P, et al. Prediction of pulmonary hypertension related to systemic sclerosis by an index based on simple clinical observations. *Arthritis Rheum* 2011;63:2790–6.
- [37] Codullo V, Caporali R, Cuomo G, et al. Stress Doppler echocardiography in systemic sclerosis: evidence for a role in the prediction of pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* 2013;65:2403–11.
- [38] Lafyatis R. Application of biomarkers to clinical trials in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2012;14:47–55.
- [39] Van Bon L, Affandi AJ, Broen J, et al. Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2014;370:433–43.
- [40] Volkman ER, Saggarr R, Khanna D, et al. Improved transplant-free survival in patients with systemic sclerosis-associated pulmonary hypertension and interstitial lung disease. *Arthritis Rheumatol* 2014.
- [41] Galìè N, Corris PA, Frost A, et al. Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:D60–72.
- [42] Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013;369:809–18.
- [43] Ghofrani H-A, Galìè N, Grimminger F, et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013;369:330–40.
- [44] Goh NSL, Desai SR, Veeraraghavan S, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1248–54.
- [45] Nihtyanova SI, Schreiber BE, Ong VH, et al. Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1625–35.
- [46] Dieudé P, Guedj M, Truchetet ME, et al. Association of the CD226 Ser(307) variant with systemic sclerosis: evidence of a contribution of costimulation pathways in systemic sclerosis pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2011;63:1097–105.
- [47] Dieudé P, Guedj M, Wipff J, et al. Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009;60:225–33.
- [48] Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis* 2009;68:620–8.
- [49] Burt RK, Oliveira MC, Shah SJ, et al. Cardiac involvement and treatment-related mortality after non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation with unselected autologous peripheral blood for patients with systemic sclerosis: a retrospective analysis. *Lancet* 2013;381:1116–24.
- [50] D'Alto M, Cuomo G, Romeo E, et al. Tissue Doppler imaging in systemic sclerosis: a 3-year longitudinal study. *Semin Arthritis Rheum* 2014;43:673–80.
- [51] Coghlan G. Does left heart disease cause most systemic sclerosis associated pulmonary hypertension? *Eur Respir J* 2013;42:888–90.
- [52] Pieroni M, De Santis M, Zizzo G, et al. Recognizing and treating myocarditis in recent-onset systemic sclerosis heart disease: potential utility of immunosuppressive therapy in cardiac damage progression. *Semin Arthritis Rheum* 2014;43:526–35.
- [53] Dinsler R, Frerix M, Meier FMP, et al. Endocardial and myocardial involvement in systemic sclerosis – is there a relevant inflammatory component? *Joint Bone Spine Rev Rhum* 2013;80:320–3.
- [54] Di Cesare E, Battisti S, Di Sibio A, et al. Early assessment of sub-clinical cardiac involvement in systemic sclerosis (SSc) using delayed enhancement cardiac magnetic resonance (CE-MRI). *Eur J Radiol* 2013;82:e268–73.
- [55] Vacca A, Meune C, Gordon J, et al. Cardiac arrhythmias and conduction defects in systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl* 2014;53:1172–7.
- [56] Ghreñassia E, Avouac J, Khanna D, et al. Prevalence, correlates and outcomes of gastric antral vascular ectasia in systemic sclerosis: a EUSTAR case-control study. *J Rheumatol* 2014;41:99–105.
- [57] Avouac J, Walker U, Tyndall A, et al. Characteristics of joint involvement and relationships with systemic inflammation in systemic sclerosis: results from the EULAR Scleroderma Trial and Research Group (EUSTAR) database. *J Rheumatol* 2010;37:1488–501.
- [58] Doré A, Lucas M, Ivancu D, et al. Significance of palpable tendon friction rubs in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Care Res* 2013;65:1385–9.
- [59] Elhai M, Guerini H, Bazeli R, et al. Ultrasonographic hand features in systemic sclerosis and correlates with clinical, biologic, and radiographic findings. *Arthritis Care Res* 2012;64:1244–9.
- [60] Frech TM, Shanmugam VK, Shah AA, et al. Treatment of early diffuse systemic sclerosis skin disease. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31:166–71.
- [61] Jordan S, Distler JHW, Maurer B, et al. Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann Rheum Dis* 2014.
- [62] Elhai M, Meunier M, Matucci-Cerinic M, et al. Outcomes of patients with systemic sclerosis-associated polyarthritis and myopathy treated with tocilizumab or abatacept: a EUSTAR observational study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1217–20.
- [63] Prey S, Ezzedine K, Doussau A, et al. Imatinib mesylate in scleroderma-associated diffuse skin fibrosis: a phase II multicentre randomized double-blind controlled trial. *Br J Dermatol* 2012;167:1138–44.
- [64] Van Laar JM, Farge D, Sont JK, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014;311:2490–8.

EXTENDED REPORT

Critical role of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of inflammation-driven dermal fibrosis in a mouse model of systemic sclerosis

Jérôme Avouac,^{1,2} Muriel Elhai,² Michal Tomcik,^{3,4} Barbara Ruiz,² Manuel Friese,⁵ Melanie Piedavent,⁵ Marco Colonna,⁶ Gunter Bernhardt,⁷ André Kahan,¹ Gilles Chiochia,² Jörg H W Distler,³ Yannick Allanore^{1,2}

► Additional supplementary files are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201759>).

¹Rheumatology A Department, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Cochin Hospital, Paris, France

²Cochin Institute, Paris Descartes University, INSERM U1016 and CNRS UMR8104, Paris, France

³Department of Internal Medicine III and Institute for Clinical Immunology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

⁴Department of Rheumatology of the First Faculty of Medicine, Institute of Rheumatology and Connective Tissue Research Laboratory, Charles University in Prague, Czech Republic

⁵Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁶Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine, St Louis, Missouri, USA

⁷Institute of Immunology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Correspondence to

Dr Jérôme Avouac, Rheumatology A Department, Paris Descartes University, Cochin Hospital, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, Paris 75014, France; jerome.avouac@cch.aphp.fr

JA and ME contributed equally.

Accepted 20 October 2012

ABSTRACT

Objective To investigate the contribution of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of dermal fibrosis on gene inactivation and targeted molecular strategies.

Methods Human skin expression of DNAM-1 was determined by immunohistochemistry. Mice deficient for DNAM-1 (*dnam1*^{-/-}) and wild-type controls (*dnam1*^{+/+}) were injected with bleomycin or NaCl. Infiltrating leucocytes, T cells, B cells and monocytes were quantified and inflammatory cytokines were measured in lesional skin of *dnam1*^{-/-} and *dnam1*^{+/+} mice. The anti-fibrotic potential of a DNAM-1 neutralising monoclonal antibody (mAb) was evaluated in the mouse model of bleomycin-induced dermal fibrosis.

Results Overexpression of DNAM-1 was detected in the skin of patients with SSc (systemic sclerosis). *dnam1*^{-/-} mice were protected from bleomycin-induced dermal fibrosis with reduction of dermal thickening (75±5%, p=0.03), hydroxyproline content (46±8%, p=0.04) and myofibroblast counts (39±5%, p=0.01). Moreover, the number of T cells was significantly decreased in lesional skin of *dnam1*^{-/-} mice (69±15%, p=0.0007). *dnam1*^{-/-} mice also displayed decreased levels of TNF-α and IL-6 in lesional skin. Consistent with the gene inactivation strategy, treatment of mice with DNAM-1 neutralising mAb prevented dermal fibrosis induced by bleomycin with reduction of dermal thickness (64±6%, p=0.002), hydroxyproline content (61±8%, p=0.004) and myofibroblast counts (83±12%, p=0.002).

Conclusions An inactivation gene strategy showed that DNAM-1 exerts profibrotic effects by controlling T cell activation and cytokine release. A molecular targeted strategy confirmed that DNAM-1 neutralising mAb has potent antifibrotic properties, supporting the hypothesis that inhibition of DNAM-1 might be a promising new approach for the treatment of SSc and potentially other related fibrotic diseases.

Systemic sclerosis (SSc) is an orphan connective tissue disease of unknown aetiology with widespread microvascular damage and progressive fibrosis of the skin and internal organs.¹ Early stages of SSc are characterised by vascular changes, including endothelial cell apoptosis, and perivascular inflammatory infiltrates.² Later stages of SSc are

characterised by an excessive accumulation of extracellular matrix components.

The largest group of susceptibility genes for SSc, identified by genetic association studies of single nucleotide polymorphism (SNP) markers, is related to autoimmunity and inflammatory response.³ The majority of these genes have also been recognised as risk factors for other connective tissue disorders and autoimmune diseases.⁴ Thus, it is crucial to determine whether these genes contribute to the expression of the fibrotic phenotype in SSc or rather reflect a shared common genetic basis of autoimmune diseases. On this line, we recently provided for the first time, translational evidence that confirms the role of one of the identified genes, STAT4, in the development of inflammation driven fibrosis, which is a hallmark of early stages of SSc.⁵ These stages are characterised by the infiltration of inflammatory cells in lesional tissue. Previous data showed that T cells represent the major component of infiltrating leucocytes, which release inflammatory and pro-fibrotic cytokines that stimulate collagen synthesis by resident fibroblasts.^{6,7} Moreover, activated T cells have been suggested to play a key role in the induction of the hyperactive and altered functional phenotype of SSc fibroblasts. The DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1) has been shown to be an important regulator of the adhesion and co-stimulation of T cells and has been identified as a genetic risk factor for SSc.^{8,9} DNAM-1 is a 67-kDa type I membrane protein belonging to the immunoglobulin supergene family of receptors, containing two Ig-like domains in the extracellular region and is constitutively expressed on the majority of CD4 and CD8 T cells, monocytes, natural killer (NK) cells, platelets and a subset of B cells.⁸

Thus, considering the potential role of T cells in early stages of SSc, we hypothesised that DNAM-1 could contribute to the development of the fibrotic phenotype of SSc. To validate this hypothesis, we combined a gene activation strategy using mice lacking DNAM-1 (*dnam1*^{-/-}) and a targeted molecular approach with neutralising anti-DNAM-1 monoclonal antibody (mAb), to characterise the role of DNAM-1 in mice by studying bleomycin-induced dermal fibrosis, a widely used model of SSc.

Basic and translational research

MATERIALS AND METHODS**Human skin biopsies**

Paraffin embedded sections of lesional skin biopsies were obtained from 12 SSc patients and 8 healthy age- and sex-matched healthy volunteers. The median age of SSc patients was 46 years (range 25–68 years) and their median disease duration was 6 years (range 1–17 years); five had the limited cutaneous subset and seven the diffuse subset. No patients were treated with immunosuppressive or other potentially disease modifying drugs. All patients and controls signed a consent form approved by the local institutional review boards.

Bleomycin-induced dermal fibrosis in DNAM-1 deficient mice

Dnam1^{-/-} mice have been described elsewhere.¹⁰ Wild-type C57BL/6 mice (dnam1^{+/+}) were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Skin fibrosis was induced in 6-week-old male and female mice by local injections of bleomycin for 3 weeks; 100 µl of bleomycin dissolved in 0.9% sodium chloride (NaCl) at a concentration of 0.5 mg/ml was administered every other day by subcutaneous injections in defined areas of 1 cm² at the upper back. Subcutaneous injections of 100 µl 0.9% NaCl were used as controls. Four different groups, consisting of two groups with dnam1^{-/-} mice and dnam1^{+/+} were analysed. One group of dnam1^{-/-} mice and one group of dnam1^{+/+} mice was challenged with bleomycin, whereas the remaining two groups were injected with NaCl. The four groups consisted of 28 mice in total.

Prevention of bleomycin-induced fibrosis with anti-DNAM-1 mAb

To investigate whether prophylactic treatment with an anti-DNAM-1 neutralising mAb might protect against the development of bleomycin-induced skin fibrosis, one group of C57BL/6 mice (all males, 6-week-old) was subjected to bleomycin injections for 3 weeks and treated intraperitoneally with a neutralising mAb against mouse DNAM-1, at a concentration of 1.6 mg/ml, initially at a dose of 400 µg on day 1, then 200 µg every 5 days for 3 weeks, as in previous experiments.¹¹ Two control groups were used: one group of mice were treated for 3 weeks with control IgG and injected with bleomycin; the other group were treated for 3 weeks with control IgG and injected with NaCl. The three groups consisted of 18 mice in total. The local ethical committee approved all animal experiments.

Evaluation of dermal thickness

Lesional skin areas were excised, fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. Sections (5 µm thick) were stained with H&E. The dermal thickness was analysed at 100-fold magnification by measuring the distance between the epidermal-dermal junction and the dermal-subcutaneous fat junction at four sites from lesional skin of each mouse.⁵ Two independent examiners blinded to the treatment status performed the evaluation (JA and ME).

Assessment of the number of infiltrating leucocytes in bleomycin-treated mice

Infiltrating leucocytes in lesional skin of dnam1^{-/-} and dnam1^{+/+} mice were quantified on H&E stained sections. Eight different high power fields from different tissue sites from each mouse were evaluated for mononuclear/inflammatory cells at 400-fold magnification by two independent examiners blinded to the treatment (JA and ME).

All images were captured with a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Badhoevedorp, Netherlands) equipped with a digital signal processor (DSP) sCCD camera (Sony, Tokyo, Japan).⁵

Collagen measurements

The collagen content in lesional skin samples was explored by hydroxyproline assay. After digestion of punch biopsies (Ø 3 mm) in 6 M HCl for three hours at 120°C, the pH of the samples was adjusted to 7 with 6 M NaOH. Samples were then mixed with 0.06 M chloramine T and incubated for 20 min at room temperature. Next, 3.15 M perchloric acid and 20% p-dimethylaminobenzaldehyde were added and samples were incubated for additional 20 min at 60°C. The absorbance was determined at 557 nm with a Spectra MAX 190 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA).

For direct visualisation of collagen fibres, trichrome staining was performed using the Masson Trichrome Staining Kit (Sigma-Aldrich).

Immunohistochemistry for α-smooth muscle actin, DNAM-1, CD3, CD4, CD8, CD22 and CD68

For immunohistochemistry, skin sections were deparaffinised, followed by antigen retrieval with Tris/EDTA/Tween, incubation with 5% bovine serum albumin in phosphate buffered saline for 1 h to block non-specific binding, and incubation with 3% H₂O₂ for 10 min to block endogenous peroxidase activity. Irrelevant isotype matched antibodies were used as controls in all experiments. Staining was visualised with aminoethylcarbazole, using a peroxidase substrate kit (Vector, Burlingame, California, USA).

Myofibroblasts were identified by staining for α-smooth muscle actin (α-SMA), as previously described.^{5,12} Cells positive for α-SMA in mouse skin sections were detected by incubation with monoclonal anti-α-SMA antibody (clone 1A4; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at a dilution of 1:1000 for 3 h at room temperature. Polyclonal rabbit anti-mouse labelled with horseradish peroxidase (HRP) were used as secondary antibodies for 1 h at room temperature. The number of myofibroblasts was determined at 200-fold magnification in four different sections from each mouse by two blinded examiners (JA and ME) (an example is provided in additional figure 1).

The expression of DNAM-1 and the number of T cells in SSc patients and controls were detected by staining overnight at 4°C with polyclonal rabbit anti-human DNAM-1 antibody (Sigma-Aldrich) and polyclonal rabbit anti-human antibodies for CD3 (Abcam, Cambridge, UK), respectively. Polyclonal goat anti-rabbit antibodies (Dako, Glostrup, Denmark) labelled with HRP were used as secondary antibodies for 1 h at room temperature. The intensity of DNAM-1 immunostaining was quantified with the imageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/stained-sections/index.html>).

To quantify the numbers of infiltrating T cells, B cells and monocytes, lesional skin sections from dnam1^{-/-} and dnam1^{+/+} mice were stained for CD3, CD22 and CD68, respectively. CD4 and CD8 T cell subsets were also quantified after staining for CD4 and CD8. Skin sections were incubated with polyclonal rabbit anti-human antibodies for CD3 or CD22 (Abcam), monoclonal rabbit anti-human antibodies against CD8 (Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA) or monoclonal mouse anti-human antibodies against CD4 or CD68 (Abcam and Novus Biologicals, respectively). Polyclonal HRP labelled goat anti-rabbit or rabbit anti-mouse immunoglobulins (Dako) were used as secondary antibodies. T cells,

CD4 and CD8 T cell subsets, B cells and monocytes were counted in eight different sections of lesional skin of each mouse at 400-fold magnification. Counting was performed in a blinded manner by two examiners (JA and ME).

Inflammatory cytokine measurement in lesional skin samples of bleomycin-treated mice

Cytokine levels were measured in the skin of 24 *dnam1*^{-/-} and *dnam1*^{+/+} mice subjected to bleomycin or NaCl injections (six per group). Mouse skin tissue lysate was prepared by homogenisation in modified RIPA buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 150 mM NaCl and complete EDTA-free protease

inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany)) with Precellys 24 tissue homogeniser/grinder (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Tissue and cell debris was removed by centrifugation. Protein concentration was determined with the amidoblack method.¹³ Serum and skin lysates were assayed for the following cytokines by multiplex bead array technology (BD biosciences, Le Pont de Claix, France): tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, interferon- γ (IFN- γ), IL-4 and IL-10.

Statistics

Data were expressed as dot blots with mean. The Mann-Whitney U test for non-related samples was used for statistical

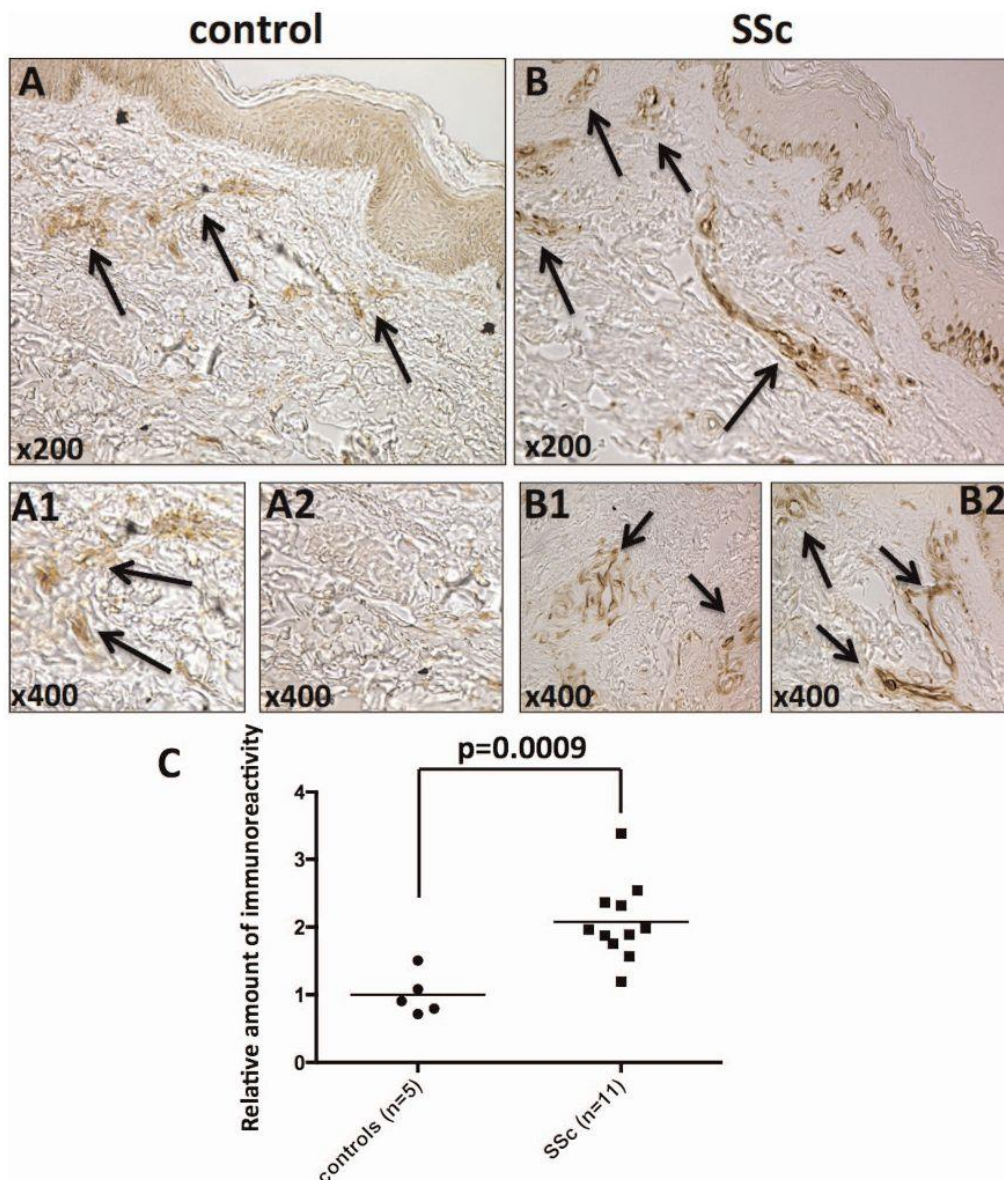


Figure 1 Increased expression of DNAM-1 in the lesional skin of systemic sclerosis (SSc) patients. (A, B) DNAM-1 protein was detected ex vivo by immunohistochemistry in SSc patients (B) compared to controls (A). Positive staining for DNAM-1 was observed in the germinal layer of the epidermis and in several cell types of the dermis (B1 and B2). (C) In addition, the intensity of immunostaining assessed by the ImageJ software was significantly increased in SSc patients compared to controls. The intensity of immunostaining was performed in the 11 SSc patients and 5 controls with detectable staining. Values are mean \pm SEM; arrows indicate positive DNAM-1 cells. This figure is only reproduced in colour in the online version.

Basic and translational research

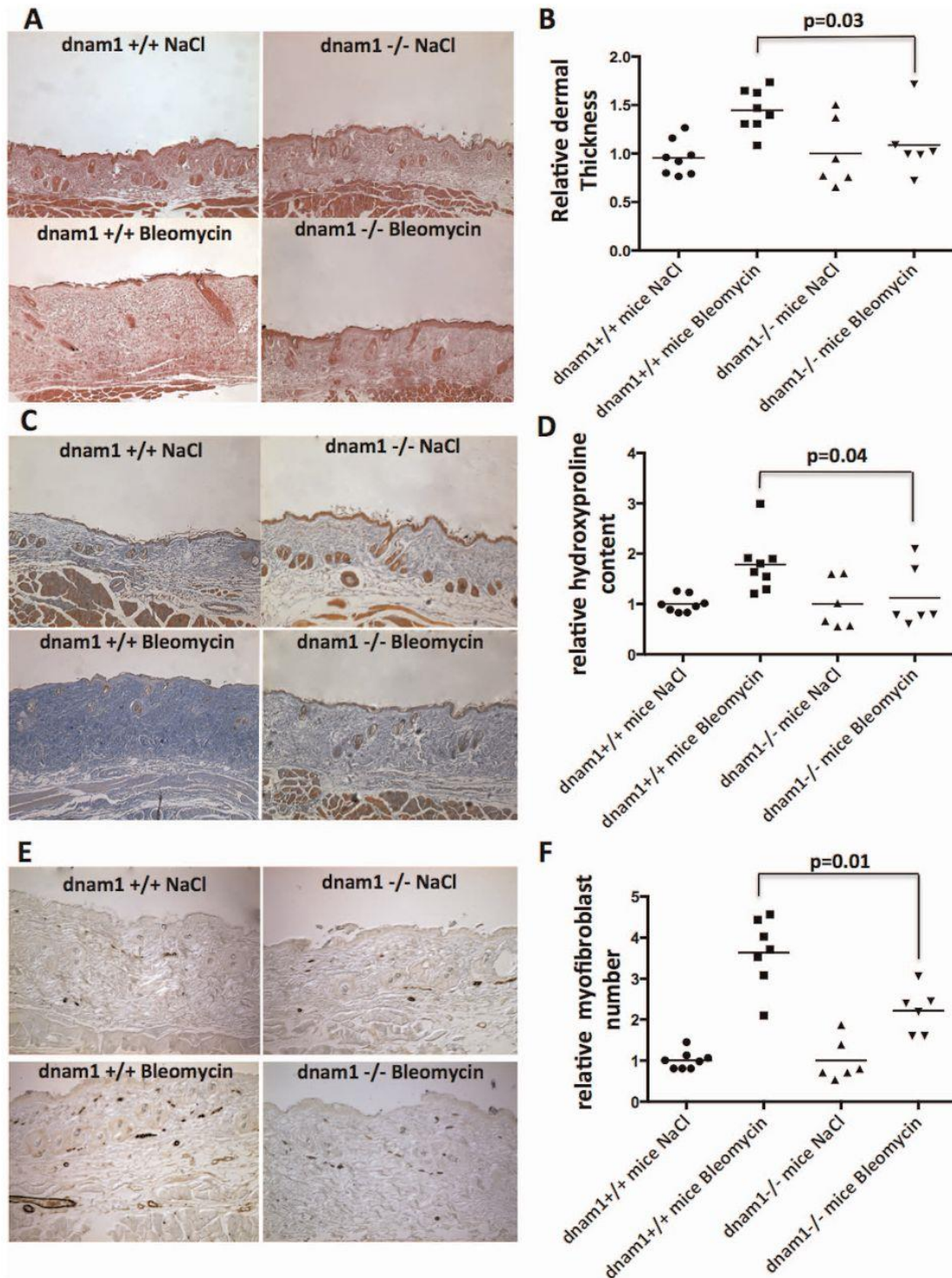


Figure 2 Dnam1^{-/-} mice are protected from dermal fibrosis induced by bleomycin. (A) Reduced dermal fibrosis in dnam1^{-/-} mice on challenge with bleomycin. Representative sections stained by H&E at 100-fold magnification. (B) Decreased dermal thickening in dnam1^{-/-} mice compared to their wild-type dnam1^{+/+} littermates. (C) Reduced accumulation of collagen in dnam1^{-/-} mice on challenge with bleomycin. Representative sections stained by trichrome staining at 100-fold magnification. (D) Reduced hydroxyproline content in lesional skin of dnam1^{-/-} mice. (E) Reduced number of α -smooth muscle actin positive cells by immunohistochemistry in dnam1^{-/-} mice. Representative sections at 200-fold magnification. (F) Lower myofibroblast counts in dnam1^{-/-} mice; 28 mice were used for these experiments (16 wild-type mice injected with bleomycin or NaCl, and 12 dnam1^{-/-} mice injected with bleomycin or NaCl). Values are represented by dot blots with means; dnam1^{+/+} control mice were injected with NaCl and defined as 1.0; the other results are normalised to this value. This figure is only reproduced in colour in the online version.

analysis. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Increased expression of DNAM-1 in SSc patients

We first analysed the expression of DNAM-1 patients with SSc in comparison with controls. The expression of DNAM-1 protein was detectable in 11 of 12 SSc patients *ex vivo* by immunohistochemistry, but in only 5 of 8 controls (figure 1A,B). Positive staining for DNAM-1 was observed in the germinal layer of the epidermis and in several cell lines in the dermis, including perivascular inflammatory cells, such as T cells (figure 1B1,B2 and additional figure 2). In addition, the intensity of immunostaining was more abundant in SSc patients compared to controls ($p=0.0009$) (figure 1C). We did not find any difference for DNAM-1 expression according to age, disease duration or cutaneous subset of SSc patients.

Mice deficient for DNAM-1 are protected from bleomycin-induced dermal fibrosis

To evaluate the role of DNAM-1 in fibrosis, *dnam1*^{-/-} mice and control *dnam1*^{+/+} mice were challenged with bleomycin.

Skin architecture and dermal thickness did not differ between *dnam1*^{-/-} mice and *dnam1*^{+/+} mice injected with NaCl, suggesting that the skin phenotype is not altered in *dnam1*^{-/-} mice compared to *dnam1*^{+/+} animals under non-fibrotic conditions (figure 2A). Following bleomycin injections, the mean±SEM increase in dermal thickness was 40±6% in *dnam1*^{+/+} mice, as compared with 13±8% in *dnam1*^{-/-} mice. Thus, dermal thickening on bleomycin challenge was reduced by 75±5% in *dnam1*^{-/-} mice compared to *dnam1*^{+/+} mice ($p=0.03$) (figure 2A,B). Consistent with decreased dermal thickening, reduced accumulation of collagen on bleomycin challenge was observed on trichrome stained skin sections of *dnam1*^{-/-} mice (figure 2C). In addition, the hydroxyproline content in lesional skin of *dnam1*^{-/-} mice was significantly lower than in the skin of *dnam1*^{+/+} mice, with a decrease of 46±8% ($p=0.04$) (figure 2D).

The number of myofibroblasts on challenge with bleomycin was also significantly reduced by 39±5% ($p=0.01$) in *dnam1*^{-/-} mice as compared to *dnam1*^{+/+} mice (figure 2E,F).

DNAM-1 regulates T cell infiltration into lesional skin

Inflammatory infiltrates are characteristic features of early stages of SSc that are mimicked in the mouse model of bleomycin-induced fibrosis. Infiltrating leucocytes contain

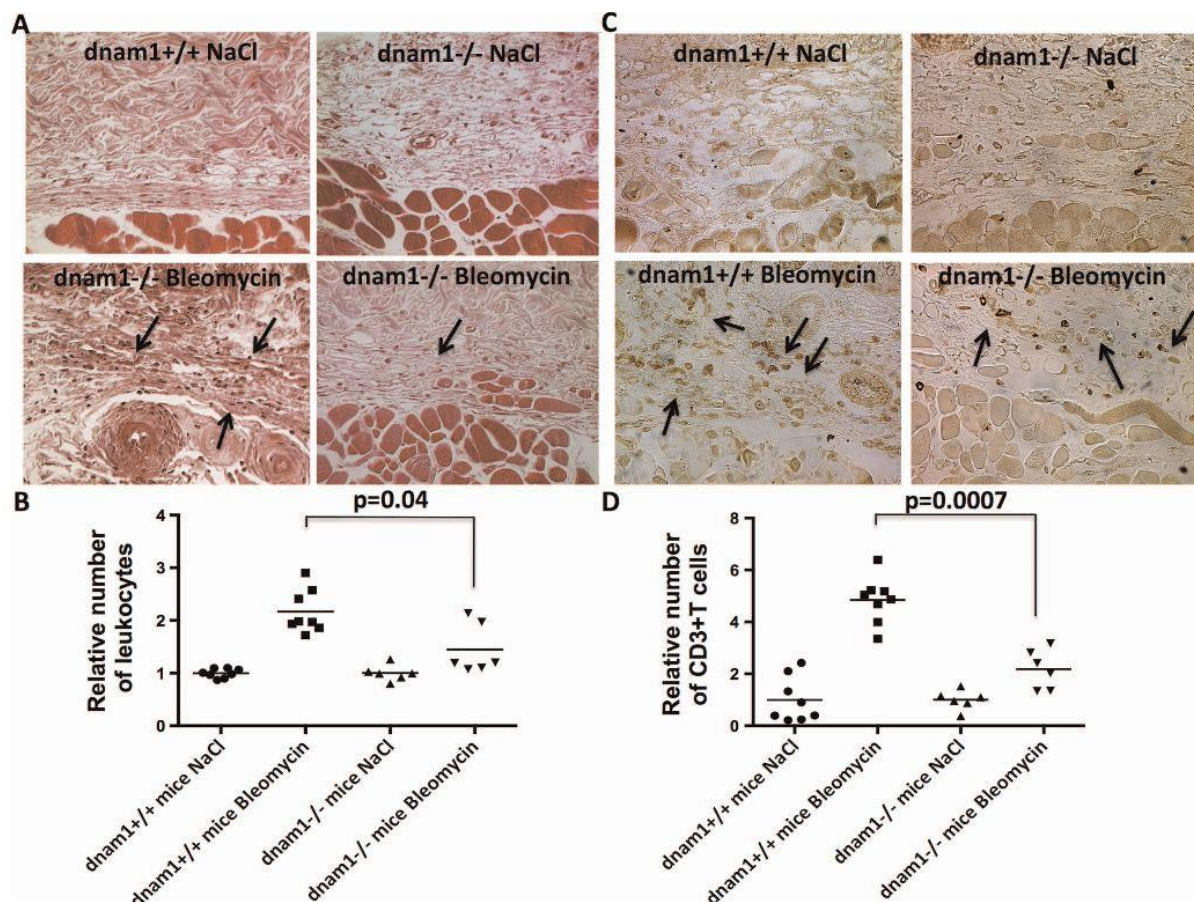


Figure 3 DNAM-1 regulates leucocyte infiltration into lesional skin. (A) Reduced inflammation in *dnam1*^{-/-} mice challenged with bleomycin. Representative sections stained by H&E at 400-fold magnification. (B) Decreased leucocyte counts in lesional skin of *dnam1*^{-/-} mice. (C) Reduced number of CD3 T cells by immunohistochemistry in lesional skin of *dnam1* deficient mice challenged with bleomycin. (D) Lower CD3 T cells in *dnam1*^{-/-} mice; 28 mice were used for these experiments (16 wild-type mice injected with bleomycin or NaCl, and 12 *dnam1*^{-/-} mice injected with bleomycin or NaCl). Values are represented by dot blots with means; all results are normalised to *dnam1*^{+/+} mice injected with NaCl. Arrows indicate leucocyte infiltration (A) or positive CD3 T cells (C). This figure is only reproduced in colour in the online version.

Basic and translational research

mostly T cells, with a perivascular distribution, and stimulate fibroblast activation and collagen synthesis by release of profibrotic factors.^{2 14} To analyse whether DNAM-1 influences the outcome of bleomycin-induced fibrosis by regulating leucocyte infiltration or proliferation, we next quantified the number of leucocytes in lesional skin. Inflammatory infiltrates on bleomycin treatment were significantly reduced in *dnam1*^{-/-} mice compared to *dnam1*^{+/+} mice with a reduction of 61±19% (p=0.04) (figure 3A,B).

To investigate which leucocyte populations were affected, we first quantified the number of T cells in fibrotic skin. T cell counts were significantly lower in *dnam1*^{-/-} mice compared to *dnam1*^{+/+} mice treated with bleomycin, with a decrease of 69±15% (p=0.0007) (figure 3C,D). Both CD4 and CD8 positive T cell numbers were reduced in *dnam1*^{-/-} mice by 71±29% (p=0.008), and 63±22% (p=0.01), respectively, compared to *dnam1*^{+/+} mice (figure 4A,B). In contrast to T cells, the number of B cells and monocytes did not significantly differ on bleomycin challenge between *dnam1*^{-/-} and *dnam1*^{+/+} mice (figure 4C,D).

Reduced levels of proinflammatory cytokines in the serum and skin lysates of DNAM-1 deficient mice subjected to bleomycin injections

To further characterise how DNAM-1 regulates leucocyte infiltration and secondary fibroblast activation in the lesional skin,

the levels of different cytokines were determined in the lesional skin (figure 5). Compared with *dnam1*^{+/+} mice subjected to bleomycin treatment, *dnam1*^{-/-} mice showed reduced levels of selective cytokines that have been implicated into inflammation and fibrosis such as IL-6 (reduction of 59±12%, p=0.009) and TNF- α (reduction of 60±15%, p=0.008) in the lesional skin. No differences in the levels of IL-4, IL-10 and IFN- γ were observed between *dnam1*^{-/-} and *dnam1*^{+/+} mice following bleomycin injections. These data suggest that DNAM-1 is associated with a proinflammatory profile, promoting tissue infiltration of T cells and the release of selective proinflammatory cytokines.

Anti-DNAM-1 mAb protects from the development of bleomycin-induced fibrosis

The mouse model of bleomycin-induced dermal fibrosis was used to evaluate the anti-fibrotic potential of DNAM-1 inhibition *in vivo* using a neutralising anti-DNAM-1 mAb. In mice injected with bleomycin and treated with control IgG, strong accumulation of thickened collagen bundles was observed (figure 6A,B). Treatment with anti-DNAM-1 mAb significantly reduced dermal thickening by 64±6% (p=0.002) (figure 6A,B). These results are similar to those observed in DNAM-1 deficient mice. Consistent with reduced dermal thickening, the hydroxyproline content and the number of myofibroblasts in lesional skin were also efficiently reduced on inhibition of

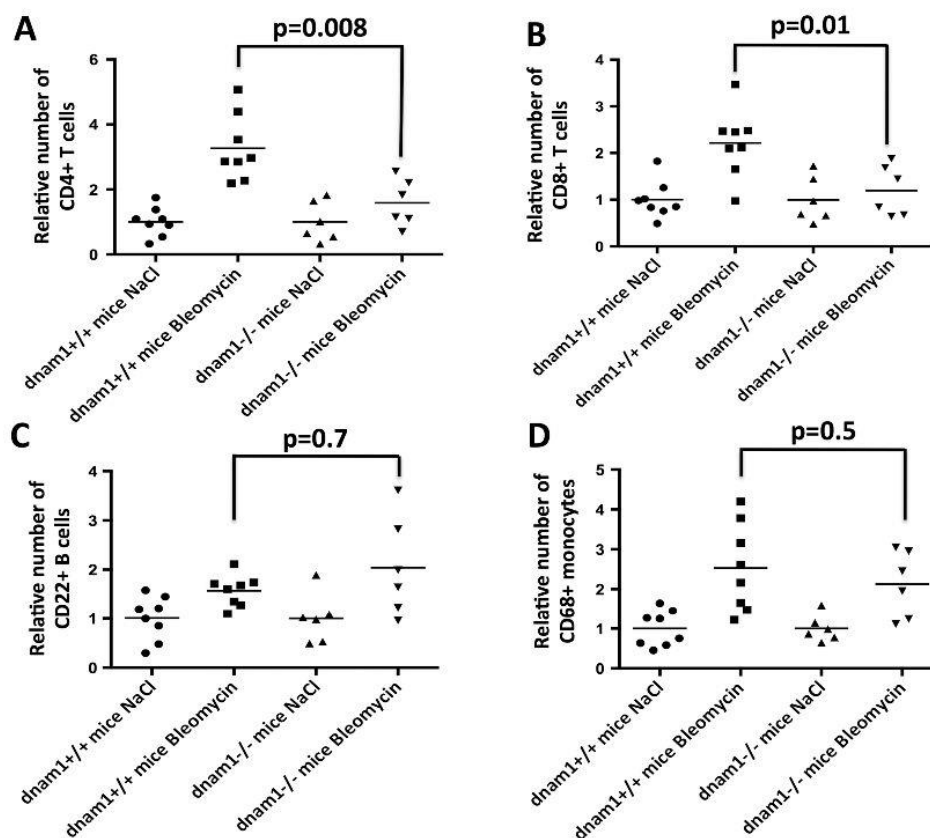


Figure 4 DNAM-1 regulates CD4 and CD8 T cell infiltration into lesional skin. (A, B) CD4 and CD8 T cell subsets were reduced in bleomycin-injected skin of *dnam1*^{-/-} mice, compared with *dnam1*^{+/+} mice. (C, D) The number of infiltrating B cells and monocytes did not significantly differ on bleomycin challenge between *dnam1*^{-/-} and *dnam1*^{+/+} mice; 28 mice were used for these experiments (16 wild-type mice injected with bleomycin or NaCl, and 12 *dnam1*^{-/-} mice injected with bleomycin or NaCl). Values are represented by dot blots with means.

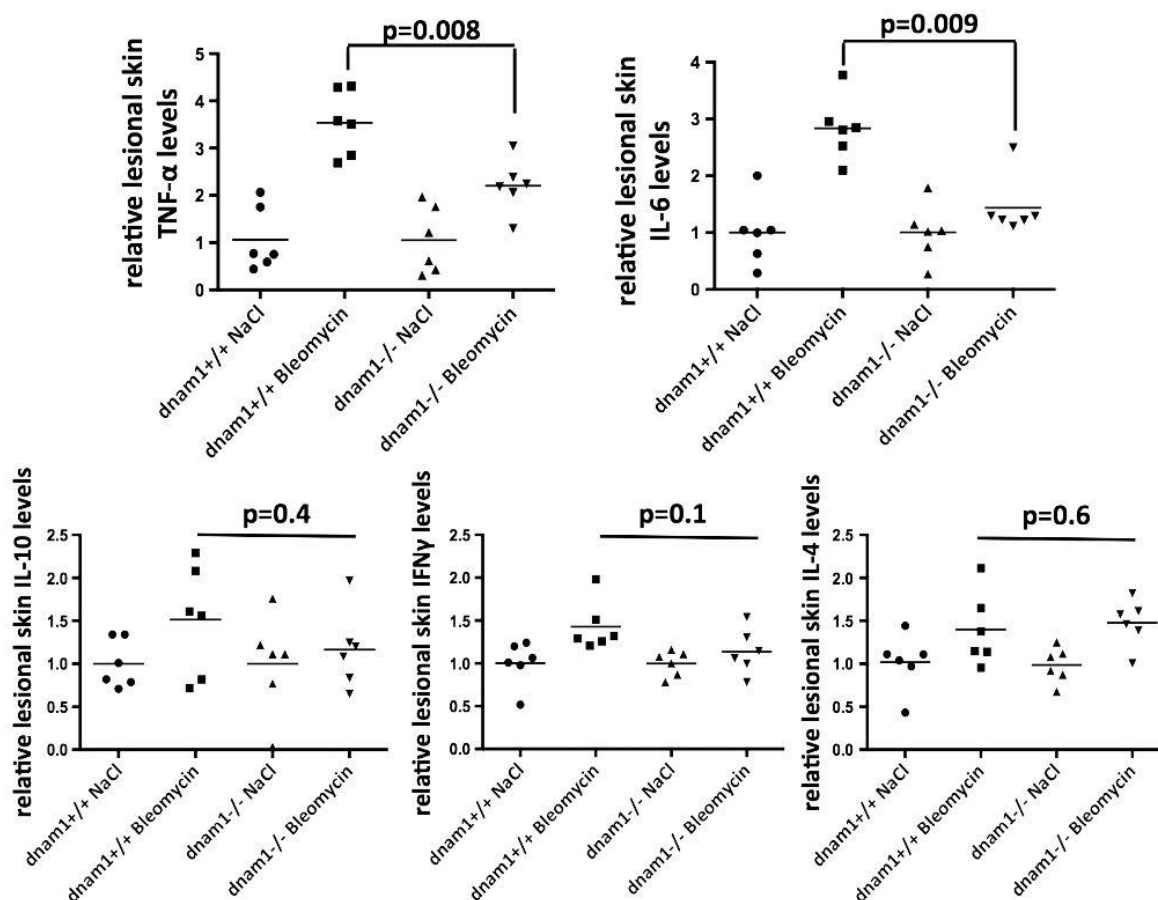


Figure 5 Reduced levels of proinflammatory cytokines in lesional skin lysates of DNAM-1 deficient mice subjected to bleomycin injections. Reduced skin levels of the inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in $dnam1^{-/-}$ mice compared with $dnam1^{+/+}$ mice subjected to bleomycin. No differences in levels of IFN- γ , IL-4 and IL-10 were observed between $dnam1^{-/-}$ or $dnam1^{+/+}$ mice; 24 mice were used for these experiments (six mice per group). Values are represented by dot blots with means. All cytokine concentrations are normalised on total protein concentration. All results are normalised to $dnam1^{+/+}$ mice injected with NaCl.

DNAM-1. The hydroxyproline content decreased by $61 \pm 8\%$ ($p=0.004$) (figure 6C,D) and the number of myofibroblasts was reduced by $83 \pm 12\%$ ($p=0.002$) (figure 6E,F).

DNAM-1 mAb was administered without serious adverse events for 3 weeks. No substantial changes were observed among mobility, activity, texture of the fur and skin integrity between mice treated with anti-DNAM-1 mAb or control IgG. Moreover, weight loss was $<10\%$ and no significant reduction of food consumption was observed.

DISCUSSION

We demonstrate in the present study that the adhesion factor DNAM-1, a costimulatory molecule required for full activation of T cells, is overexpressed in lesional skin tissue of patients with SSc and contributes to the development of inflammation-driven dermal fibrosis. A gene inactivation strategy indicates that DNAM-1 exerts profibrotic effects in the model of bleomycin-induced skin fibrosis, a widely used animal model reflecting early inflammatory stages of SSc by promoting the infiltration of T cells into lesional skin and regulating the cytokine balance towards a proinflammatory and profibrotic profile. In the early stages of SSc, the infiltrating leucocytes, and especially T cells, release inflammatory and profibrotic cytokines

that activate fibroblast and stimulate collagen synthesis.^{7 15} As in human SSc, T cells are present in increased numbers and in an activated state in lesional skin of bleomycin challenged mice.⁶

CD226, encoding for the DNAM-1 protein has been identified as a risk factor of SSc and also other autoimmune diseases.^{9 16 17} The functional impact of the SNP rs763361 on RNA levels and/or splicing remains unclear so far. In addition, other associated SNPs in close linkage disequilibrium have been reported but the unambiguous identification of the causal gene variant is still missing. Although our results in mice suggest a functional role of DNAM-1 in fibrosis, additional investigations with a different approach will be necessary to determine the functional impact of CD226 SNP markers in SSc patients.

Our results demonstrate that DNAM-1 deficiency significantly reduced the number of infiltrating T cells, in bleomycin-treated mice. Although DNAM-1 is involved in the adhesion and costimulation of NK cells, we did not quantify NK cells present in lesional skin biopsies, since only minor levels of DNAM-1 expression are detected on some subsets of NK cells, with a heterogeneous profile.^{11 18} A reduction in numbers of infiltrating T cells genetically deficient for DNAM-1 was observed in a mouse model of acute graft-versus-host disease

Basic and translational research

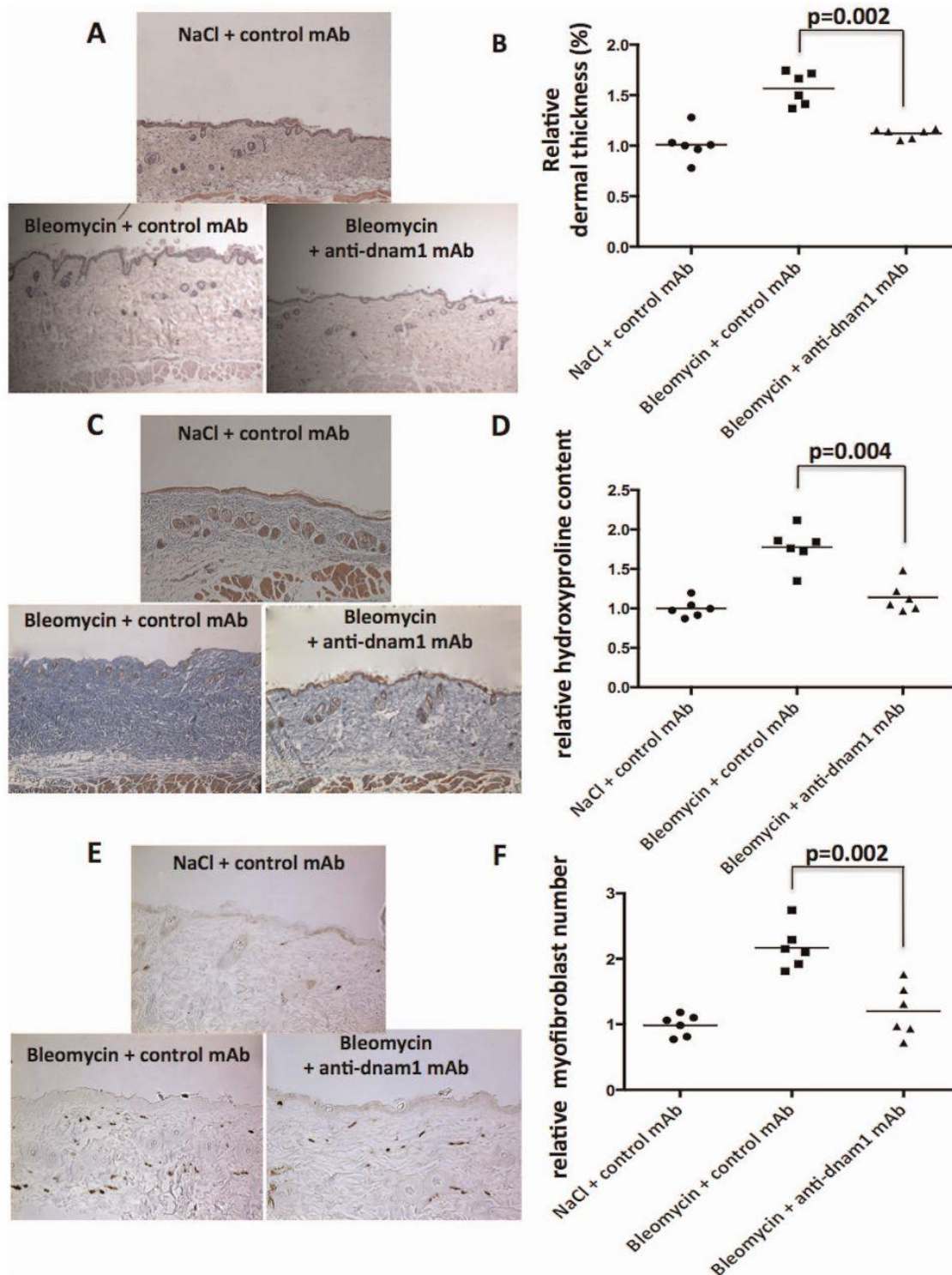


Figure 6 Bleomycin-induced skin fibrosis is prevented on DNAM-1 inhibition with a neutralising mAb. (A) In mice injected with bleomycin, a massive accumulation of thickened collagen bundles was observed. Representative sections stained by H&E at 100-fold magnification. (B) Treatment with DNAM-1 neutralising mAb significantly reduced dermal thickening. (C, D) Consistent with reduced dermal thickening, we observed reduced accumulation of collagen on trichrome staining at 100-fold magnification (C) and decreased hydroxyproline content (D) were observed on DNAM-1 inhibition. (E, F) In addition, the number of myofibroblasts was significantly reduced in mice treated by DNAM-1 neutralising mAb. Representative sections at 200-fold magnification; 18 mice were used for these experiments (six mice per group). Values are represented by dot blots with means. This figure is only reproduced in colour in the online version.

(GVHD), a major complication of allogeneic bone marrow transplantation.¹⁹ GVHD, an immune-mediated disease that results from a complex interaction between donor and recipient immune cells, is characterised by activation and trafficking of T cells to target tissues where inflammation and tissue destruction occurs.²⁰ In this mouse model, sublethally irradiated B6C3F1 mice receiving splenocytes from DNAM-1-deficient mice lived significantly longer than mice receiving wild-type splenocytes.¹⁹ In addition, histopathological examinations showed a reduced infiltration of inflammatory cells, and especially T cells, in the liver and small intestine of recipients of DNAM-1 deficient splenocytes. The role of DNAM-1 has also been highlighted in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Treatment of EAE by recombinant T cell receptor ligand (RTL)-551 can reverse clinical and histological signs of EAE by reducing DNAM-1+ CD4 T cells in the periphery.²¹ Taken together, these findings support that the blocking of DNAM-1 is associated with decreased infiltration of effector T cells that mediate clinical signs of different inflammatory and immune conditions, such as inflammation-driven fibrosis, a mouse model of acute GVHD and EAE. Our findings may thus reflect a general effect of DNAM-1 on inflammation rather than an effect linked to a specific SSc genetic susceptibility, and DNAM-1 may have an impact mainly at the initiating inflammatory phase of the disease.

We demonstrate that DNAM-1 promotes the release of IL-6 and TNF- α from infiltrating leucocytes. Significantly reduced levels of these cytokines were found in DNAM-1 deficient mice treated with bleomycin in comparison to wild-type mice. These cytokines have been implicated in the activation of fibroblasts, collagen synthesis and subsequent fibrosis. IL-6 is over-expressed by endothelium and fibroblasts in the lesional skin of SSc patients, as well as in bleomycin-induced skin fibrosis and tight skin mice.²²⁻²⁴ Dermal fibroblasts from SSc patients were reported to constitutively produce up to 30-fold higher levels of IL-6 than those of healthy controls.²⁵ IL-6 promotes fibrosis by enhancing inflammation and is a potent inducer of excessive collagen production and proliferation of SSc fibroblasts, notably by exerting an autocrine regulation of fibroblasts.²⁶ Thus, increased levels of IL-6 promoted by DNAM-1 may redirect the focus on other cell types involved in fibrosis and targeted by these cytokines, in which DNAM-1 expression has not been assessed. Blocking of the IL-6 receptor using MR16-1, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, has been shown to alleviate dermal thickness, collagen production and myofibroblast infiltration in the mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis.²⁷

Expression of TNF- α is found during early stages of SSc.²⁸ Preclinical studies indicate that inhibition of TNF- α might exert antifibrotic effects in early inflammatory stages of SSc. Inhibition of TNF- α in bleomycin-induced dermal fibrosis resulted in a significant reduction of dermal thickness, collagen accumulation and the number of infiltrating myofibroblasts.²⁹ Similar results were also obtained for pulmonary fibrosis.³⁰⁻³¹ However, these promising results were not confirmed in clinical studies.

Levels of IL-10, IL-4 and IFN- γ were not significantly different between *dnam1*^{-/-} and *dnam1*^{+/+} mice subjected to bleomycin injections. However, it is noteworthy that IL-4 and IFN- γ levels did not significantly increase on bleomycin injections in wild-type mice, which differs from previous published reports.^{5,6}

To confirm the results obtained with DNAM-1 deficient mice, we performed a complementary molecular targeting

strategy using a neutralising mAb specifically recognising murine DNAM-1. Using this antibody, DNAM-1 expression was shown on murine thymocytes and mature peripheral T cells. On injection into mice, this antibody caused a partial depletion of CD8 T cells.¹¹ In addition, anti-DNAM-1 mAb has previously been shown to suppress the development of acute GVHD by suppressing donor CD8 T cell proliferation in recipient mice.¹⁹ We observed a significant decrease of dermal thickness and collagen production in mice treated with this mAb, similar to the reduction obtained in DNAM-1 deficient mice. Thus, the role of DNAM-1 in dermal inflammation-driven fibrosis is supported by two independent and complementary strategies of DNAM-1 inhibition. Further studies with additional mouse models of established fibrosis or inflammation-independent fibrosis would be useful to validate the promising findings obtained in the bleomycin model.

One limitation of our study was related to the quantification of myofibroblasts, defined as α -SMA positive cells. Since α -SMA also stains microvessels, the distinction between myofibroblasts (spindle-shaped cells) and pericytes was challenging in some cases.

We did not observe any signs of toxicity of the anti-DNAM-1 mAb during the study period, supporting the good safety profile of this antibody in the preclinical setting in mice.

In summary, we demonstrate with two complementary approaches that inhibition of DNAM-1, a critical new target in autoimmune disorders, significantly ameliorates dermal inflammation-driven fibrosis. DNAM-1 displays profibrotic effects by promoting the infiltration of leucocytes, especially T cells, into lesional skin and by stimulating the release of cytokines involved in both inflammatory and fibrotic processes. In addition, a molecular targeting strategy using a DNAM-1 neutralising mAb confirmed the potent antifibrotic properties of DNAM-1 inhibition. Our findings might have direct translational implications, and inhibition of DNAM-1 might be a promising new approach for the treatment of SSc and potentially other fibrotic diseases.

Acknowledgements Plateformes d'Immuno-biologie (M. Andrieu), De Morphologie/Histologie (M. Favier) et d'imagerie cellulaire (P. Bourdoncle) de l'institut Cochin, Paris, France and Prof. Catherine Chaussain, EA2496, Université Paris Descartes, Faculté de Chirurgie Dentaire, Montrouge, France

Contributors JA, YA: study conception. JA, ME, MT, BR, MP: data acquisition. JA, ME, MF, MC, GB, GC, JHWD, YA: data analysis. JA, ME, MT, MF, GC, GB, AK, GC, JHWD, YA: manuscript preparation.

Funding INSERM, Société Française de Rhumatologie, Association des Sclérodermiques de France, Fondation pour la recherche Médicale, Arthritis Foundation, CMH Research Projects No. 0000023728. Additional grant support was provided by grant A40 of the Interdisciplinary Center of Clinical Research (IZKF) in Erlangen and grants DI 1537/1-1, DI 1537/2-1, DI 1537/4-1, AK 144/1-1 and SCHE 1583/7-1 from the Deutsche Forschungsgesellschaft. This project was supported by research grant from SERVIER research group

Competing interests None.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Correction notice This article has been corrected since it was published Online First. Figure 6 has been corrected.

REFERENCES

1. Allanore Y, Avouac J, Wipff J, et al. New therapeutic strategies in the management of systemic sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2007;**8**:607-15.
2. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009;**360**:1989-2003.
3. Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology (Oxford)* 2010;**49**:203-10.
4. Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Updating the genetics of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;**22**:665-70.

Basic and translational research

5. **Avouac J**, Fumrohr BG, Tomcik M, *et al*. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2011;**63**:800–9.
6. **Yamamoto T**. The bleomycin-induced scleroderma model: what have we learned for scleroderma pathogenesis? *Arch Dermatol Res* 2006;**297**:333–44.
7. **Gu YS**, Kong J, Cheema GS, *et al*. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008;**38**:132–60.
8. **Shibuya A**, Campbell D, Hammum C, *et al*. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 1996;**4**:573–81.
9. **Dieude P**, Guedj M, Truchetet ME, *et al*. Association of the CD226 Ser(307) variant with systemic sclerosis: evidence of a contribution of costimulation pathways in systemic sclerosis pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2011;**63**:1097–105.
10. **Gifillan S**, Chan CJ, Cella M, *et al*. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med* 2008;**205**:2965–73.
11. **Seth S**, Georgoudaki AM, Chambers BJ, *et al*. Heterogeneous expression of the adhesion receptor CD226 on murine NK and T cells and its function in NK-mediated killing of immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2009;**86**:91–101.
12. **Avouac J**, Palumbo K, Tomcik M, *et al*. Inhibition of AP-1 signaling abrogates TGF- α mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum* 2011;**64**:1642–52.
13. **Kamel H**, Brown DH, Ottaway JM, *et al*. Comparison of gold levels and distribution in guinea pig serum. *Arthritis Rheum* 1978;**21**:441–6.
14. **Prescott RJ**, Freemont AJ, Jones CJ, *et al*. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992;**166**:255–63.
15. **Yamamoto T**. Scleroderma—pathophysiology. *Eur J Dermatol* 2009;**19**:14–24.
16. **Maiti AK**, Kim-Howard X, Viswanathan P, *et al*. Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2010;**49**:1239–44.
17. **Hafler JP**, Maier LM, Cooper JD, *et al*. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun* 2009;**10**:5–10.
18. **Dardalhon V**, Schubart AS, Reddy J, *et al*. CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions. *J Immunol* 2005;**175**:1558–65.
19. **Nabekura T**, Shibuya K, Takenaka E, *et al*. Critical role of DNAM-1 accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of acute graft-versus-host disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:18593–8.
20. **Briones J**, Novelli S, Sierra J. T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus-host disease: therapeutic implications. *Bone Marrow Res* 2011;**2011**:976793.
21. **Sinha S**, Miller LM, Subramanian S, *et al*. RTL551 treatment of EAE reduces CD226 and T-bet+ CD4 T cells in periphery and prevents infiltration of T-bet+ IL-17, IFN- γ producing T cells into CNS. *PLoS One* 2011;**6**:e21868.
22. **Koch AE**, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, *et al*. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. *Pathobiology* 1993;**61**:239–46.
23. **Yamamoto T**, Takagawa S, Katayama I, *et al*. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;**112**:456–62.
24. **Yamamoto T**, Takagawa S, Katayama I, *et al*. Anti-sclerotic effect of transforming growth factor-beta antibody in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol* 1999;**92**:6–13.
25. **Kadono T**, Kikuchi K, Ihn H, *et al*. Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol* 1998;**25**:296–301.
26. **Wipff J**, Bonnet P, Ruiz B, *et al*. Association study of serotonin transporter gene (SLC6A4) in systemic sclerosis in European Caucasian populations. *J Rheumatol* 2010;**37**:1164–7.
27. **Kitaba S**, Murota H, Terao M, *et al*. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol* 2012;**180**:165–76.
28. **Distler JH**, Schett G, Gay S, *et al*. The controversial role of tumor necrosis factor alpha in fibrotic diseases. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:2228–35.
29. **Koca SS**, Isik A, Ozercan IH, *et al*. Effectiveness of etanercept in bleomycin-induced experimental scleroderma. *Rheumatology (Oxford)* 2008;**47**:172–5.
30. **Piguet PF**, Vesin C. Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. *Eur Respir J* 1994;**7**:515–8.
31. **Farivar AS**, Mackinnon-Patterson B, McCourtie AS, *et al*. Obliterative airway disease in rat tracheal allografts requires tumor necrosis factor alpha. *Exp Mol Pathol* 2005;**78**:190–7.

RESEARCH

Open Access

Targeting CD226/DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in collagen-induced arthritis mouse models

Muriel Elhai^{1,2}, Gilles Chiochia³, Carmen Marchiol⁴, Franck Lager⁴, Gilles Renault⁴, Marco Colonna⁵, Guenter Bernhardt⁶, Yannick Allanore^{1,2} and Jérôme Avouac^{1,2*}

Abstract

Background: Genetic studies have pointed out that *CD226* variants, encoding DNAM-1, could be associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. Therefore, we aimed to determine the influence of DNAM-1 on the development of arthritis using the collagen-induced arthritis (CIA) mouse model.

Methods: CIA was induced in mice on a DBA/1 background, treated in parallel with a DNAM-1 neutralizing monoclonal antibody, a control IgG and PBS, respectively. CIA was also induced in mice deficient for DNAM-1 (*dnam1*^{-/-}) and control *dnam1*^{+/+} mice on a C57/BL6 background. Mice were monitored for clinical and ultrasound signs of arthritis. Histological analysis was performed to search for inflammatory infiltrates and erosions. The Mann-Whitney U test for non-related samples was used for statistical analysis.

Results: There was a non-significant trend for a less arthritic phenotype in mice receiving anti-DNAM-1 mAb at both clinical, ultrasound and histological assessments. But, we did not observe any difference between *dnam1*^{+/+} and *dnam1*^{-/-} mice for incidence nor severity of clinical arthritis. Histological analysis revealed inflammatory scores similar in both groups, without evidence of erosion. Collagen antibodies levels were similar in all mice, confirming immunization with collagen.

Conclusion: Despite some clues suggesting a role of DNAM-1 in arthritis, these complementary approaches demonstrate no contribution of *CD226*/DNAM-1 in the arthritic phenotype. These results contrast with previous studies showing a role *in vivo* of DNAM-1 in some autoimmune disorders.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Collagen-induced arthritis, CD226, Autoimmunity, Mouse model

Background

Rheumatoid arthritis (RA) is a frequent disease leading to joint destruction, deformity, and disability. Biologics have shown their efficacy in limiting joint destruction and have dramatically improved the outcome of RA-patients. However, some patients remain refractory or become nonresponder to these treatments, underlining the need in this context for new or complementary therapeutic strategies [1-3].

The pathogenesis of RA is characterized by chronic inflammation and synovial infiltration of immune cells [4,5]. It results from the combination of genetic susceptibility genes and environmental factors [6]. Until now, most of the susceptibility genetic factors identified are involved in inflammatory response and autoimmunity [7]. Furthermore, the majority of these genetic factors was also associated with other autoimmune diseases, which were not characterized by an arthritic phenotype, underlining the concept of a shared genetic background between autoimmune diseases [8-10].

Recently, a non-synonymous single nucleotide polymorphism (SNP) Gly307Ser (rs763361) in the *CD226* gene, which encodes the DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1), has been associated with multiple autoimmune

* Correspondence: jerome.avouac@cch.aphp.fr

¹Rheumatology A department, Cochin Hospital, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France

²Cochin Institut, INSERM U1016, UMR 8104, Team ATIP/AVENIR, Paris Descartes University, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Elhai et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

diseases including RA [11–18]. DNAM-1 is a 67 kDa type I membrane protein belonging to the immunoglobulin supergene family of receptors. It is constitutively expressed on the majority of CD4+ and CD8+ T cells, monocytes, natural killer cells, platelets and a subset of B cells. It is involved in the adhesion and co-stimulation of T cells in a Th1 pathway [19]. Interestingly, there are accumulating evidences suggesting a key role of T cells in the pathogenesis of RA characterized by a marked shift toward Th1 and Th17 phenotypes [20]. Furthermore, DNAM-1 was found to be significantly expressed on CD4+CD28- T cells from RA-patients and to be involved in co-stimulation of these cells [21]. Therefore, it remains to determine whether *CD226* Gly307Ser (rs763361) contributes specifically to the expression of the arthritic phenotype in RA or does it just reflect a common genetic background between autoimmune diseases. For this purpose, we aimed to validate *in vivo* this genetic susceptibility factor, using the collagen-induced arthritis (CIA) model, which is a widely used model for RA and has been important for understanding RA pathogenesis [22–24]. This might also reveal pathophysiological pathways leading to new potential therapeutic targets. We combined a targeted molecular approach with neutralizing anti-DNAM-1 monoclonal antibody (mAb) and a gene inactivation strategy using mice lacking DNAM-1 (*dnam1*^{-/-}) in the CIA mouse model and demonstrated that inhibition of DNAM-1 does not have a direct influence on the development of inflammatory arthritis in mice.

Methods

Mice

DBA/1 mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). *Dnam1*^{-/-} mice have been described elsewhere [25]. C57/BL6 expressing DNAM-1 (*dnam1*^{+/+}) were also purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). All mice were 6–8 weeks of age at the time of experimentation, were fed standard rodent chow and water ad libitum. To prevent from a cage effect, mice on different background or with different treatments were randomly assigned to each cage. The study was approved by the Cochin institute committee on animal care and its registered number is CEEA34.GC.052.12.

Induction of CIA

For DBA/1 mice an emulsion was formed by dissolving 2 mg/ml bovine native collagen II (CII) (MD BioSciences, Zurich, Switzerland) overnight at 4°C in 10 mM acetic acid and combining it with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA) emulsification (MD BioSciences, Zurich, Switzerland). DBA/1 mice were injected intradermally at three sites into the base of the tail with a total of 100 µl emulsion containing 200 µg CII emulsified in CFA. On day 21, an injection with CII

in incomplete Freund's adjuvant (IFA) was repeated as a booster [26]. CII solution and the emulsion with CFA or IFA were always freshly prepared. In this model, arthritis develops 20–30 days after the first collagen injection.

For C57/BL6 mice, the emulsion was formed by dissolving 4 mg/ml chicken CII overnight at 4°C in 10 mM acetic acid and combining it with an equal volume of CFA emulsification (MD BioSciences, Zurich, Switzerland). The booster was performed using the same protocol as for the priming immunization [27,28]. In this model, arthritis develops 50–60 days after the first collagen injection.

Effect of DNAM-1 in CIA

To investigate whether prophylactic treatment with an anti-DNAM-1 neutralizing monoclonal antibody (mAb) might protect from the development of CIA, arthritis was induced in three groups of 7 DBA/1 mice (all males, 6–8 weeks old). In parallel, mice were treated intraperitoneally with the neutralizing anti-DNAM-1 mAb TX42 (rat IgG2a), at a concentration of 1.6 mg/ml, initially at a dose of 400 µg at day-1, then 200 µg every 5 days for 3 weeks, as previously described [29,30]. This antibody has been shown to inhibit DNAM-1 binding to its ligands CD155 and CD112 and inhibits activation of T cells *in vitro* [31]. Two control groups were treated for three weeks from day-1 with control rat IgG (MP Biomedicals) and PBS, respectively.

To determine whether DNAM-1 deficient mice were protected from CIA, arthritis was induced in 7 *dnam1*^{+/+} and 5 *dnam1*^{-/-}. All *dnam1*^{+/+} and *dnam1*^{-/-} mice were males of 6–8 weeks old.

Evaluation of arthritis

Clinical assessment of arthritis

Mice were monitored for evidence of arthritis in their four paws using a blind procedure, by two examiners (G.C. and M.E.) and a clinical score based on disease severity was given for each mouse. Clinical assessment was performed two to three times per week, for up to 60 days in C57/BL6 mice and 35 days in DBA/1 mice as previously described [32]. Briefly, the date of disease onset was recorded, and the clinical severity of each joint or group of joints (toes, tarsus, ankle, wrist and fingers) was graded as follows: 0 (normal), 1 (swelling or focal redness of finger joints), 2 (mild swelling), 3 (severe swelling) or 4 (necrosis). Clinical scores of each joint (graded 0–4) were summed to yield the arthritic score and the severity of CIA was expressed as the mean score observed on a given day, as the mean of the score reached by mice during the experiment and as the mean of the maximal arthritic score reached by each mouse. The maximum score reached for each of the 10 joints was 4, so the maximum score of clinical arthritis reached for a single mouse on a given day was 40. Incidence of

CIA was calculated by dividing the number of mice showing swelling of any paws (score > 1) with the number of total mice.

Ultrasound methodology

Animal preparation Mice were sedated using 1.5% iso-fluorane in air (Minerve équipement vétérinaire, Esternay, France). They were attached on the heating pad in a supine position [33]. Hairs were removed from the knee and ankle using depilatory cream.

Evaluation of arthritic joints by ultrasound This evaluation was performed in collaboration with the Small Animal Imaging Facility, which developed the ultrasound (US) examination in arthritic mice. Mice were monitored for evidence of arthritis in their knees, ankles, tarsus and toes by a blinded examiner (C.M), as previously described [34]. US examinations were performed using Ultrasound biomicroscope UBM (VEVO770, Visualsonics) either in B mode or in Doppler mode. A 60 MHz probe (RMV708) was used for optimal spatial resolution (with axial resolution up to 30 mm), and attached to an articulated arm (MP-Tec AG, Veltheim, Switzerland). The position was kept by tightening the articulated arm. Power Doppler imaging settings were defined as follows: the scan speed was set to 2 mm/s, the wall filter to 2.5 mm/s, the number of pulses to two radio-frequency cycles. Emitted power (ranging from 10 to 50%) and colour priority over grey scale were adjusted to allow visualisation of the vessels and remove the colour signal at the skin/tissue interface (Doppler artefacts). In B-mode images, each joint or group of joints was coded according to five different grades. Vascularisation was scored by the operator according to four different grades, depending upon the percentage of coloured pixels in the joint area, i.e. Grade 0: no detectable power Doppler signal; grade 1: one to two small colour Doppler areas (about 0.1 × 0.1 mm); grade 2: two to four medium colour Doppler areas (about 0.15 × 0.15 mm); grade 3: more than four large colour Doppler areas (over 0.2 × 0.2 mm).

On C57/BL6 mice, there was a power Doppler background level, which was not considered as pathological, since it was observed on naive C57/BL6 mice.

Six C57/BL6 and DBA/1 non-immunized mice (males of 6–8 weeks of age) were assessed as controls at B-mode and Doppler.

Histological assessment of arthritis

At the end of the experiment, i.e. day 35 in DBA/1 mice and day 62 in C57/BL6 mice, corresponding to the decrease in signs of arthritis, mice were killed by cervical dislocation, the paws of the mice were removed, fixed, decalcified and paraffin embedded. At least four serial

sections were cut from each paw to ensure extensive evaluation of the arthritic joints. Sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin and examined to search for inflammation, pannus formation, and cartilage and bone damage. All images were captured with a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Badhoevedorp, Netherlands) equipped with a DSP 3CCD camera (Sony, Tokyo, Japan). The histological severity of the arthritis was scored on a scale of 0–3 for synovitis (synovial proliferation, inflammatory cell infiltration) and erosions by two examiners (G.C. and M.E.), blinded to the diagnosis [35].

Assessment of DNAM1+T cells and T cell infiltrates

We aimed to quantify T cell infiltrates and DNAM1+T cells in arthritic joints from mice treated with anti-DNAM1, PBS or control IgG. We performed immunofluorescent staining in paws sections from 4 mice from each group (i.e. treated with anti-DNAM1, control IgG and PBS). Sections were deparaffinized, followed by antigen retrieval with Tris/EDTA/Tween, incubation with 5% bovine serum albumin in phosphate buffered saline for 1 hour to block non-specific binding. The number of T cells in the infiltrate was detected by staining for one hour at 4°C with polyclonal rabbit anti-mouse antibodies for CD3 (Abcam, Cambridge, UK). Alexa Fluor® 488 Goat Anti-rabbit antibodies (Life Technologies Saint Aubin, France) was used as secondary antibody for one hour at room temperature. For co-staining experiments, the expression of DNAM-1 and the number of T cells were detected by staining overnight at 4°C with polyclonal rabbit anti-mouse DNAM-1 antibody (Abcam, Cambridge, UK) and monoclonal rat anti-mouse antibodies for CD3 (Abcam, Cambridge, UK), respectively. Alexa Fluor® 488 Goat Anti-rat and Alexa Fluor® 594 Goat Anti-rabbit antibodies (Life Technologies Saint Aubin, France) were used as secondary antibody for one hour at room temperature. Nuclei were stained using DAPI. Slides were then mounted coverslip with a drop of mounting medium and stored in the dark at +4°C until analyze. All images were captured on a Zeiss Axio Observer Z1 microscope with a dry × 40 objective and CoolSNAP HQ2 CCD camera. Four mice were used for this experiment and 4 pictures were taken by mouse. The number of CD3+ and DNAM1+CD3+ cells were counted by two examiners blinded to the treatment.

Detection of anti-CII Ab by ELISA

Anti-CII antibodies were detected in the serum of mice. Mice were bled by cardiac puncture at the time of death, just after cervical dislocation. Sera were stored at – 20°C until use. ELISA assays were performed for the detection of Abs to CII by coating 96-well flat-bottom plates with 50 µl of CII (2 mg/ml in PBS) overnight at 4°C. The wells were then blocked by 2-h incubation at 4°C with

100 μ l of PBS containing 2% (w/v) BSA. Next, 50 μ l of serial twofold dilutions (beginning at 1/1600 dilution) of mouse sera in PBS containing 2% BSA and 0.1% Tween-20 were applied and incubated overnight at 4°C. Three washes in PBS/0.05% (v/v) Tween-20 were applied between all steps. Polyclonal rabbit anti-mouse labeled with horseradish peroxidase (HRP) (Dako, Glostrup, Denmark)(50 μ l) diluted in PBS containing 2% BSA and 0.1% Tween-20 were next applied for 2 h at room temperature (dilution 1:200). Five washes in PBS/0.05% (v/v) Tween-20 were applied between all steps. Antibodies were detected by incubation with TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine) (Sigma, Lyon, France) substrate for 45 minutes in the dark. Optical density was measured at 450 nm. A standard curve was created for each assay by including serial dilutions of a reference sample obtained from the pooled sera of all immunized mice on each plate. The reference sample was arbitrarily assigned an antibody concentration of 1 AU/mL. Antibody concentrations for each serum sample were obtained by reference to this standard curve and were expressed in relative titer to this reference sample. We also tested control sera of non-immunized mice to calculate a positivity threshold.

Statistical analysis

All data analyses were performed using Graph Pad Prism 6.01 (2012). Data were presented as median (+/- IQR) for continuous variables and numbers (percentages) for categorical variables. The Mann-Whitney U test for non-related samples was used for statistical analysis. Correlation between US and clinical assessments for ankle, tarsus and toes was assessed using Spearman rank correlation coefficient (ρ). A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Anti-DNAM-1 mAb does not protect from the development of CIA

The mouse model of CIA was used to evaluate the anti-arthritic potential of DNAM-1 inhibition *in vivo* using a neutralizing anti-DNAM-1 mAb. First evidence of arthritis appeared at day 19 post-immunization. Clinical evidence of arthritis (defined by at least one joint with a score > 1) was observed in 5/7 (71%) mice treated with anti-DNAM-1 mAb, 6/7 (86%) mice treated with control IgG and 7/7 (100%) mice injected with PBS ($p = 0.51$ and 0.13) (Figure 1a). Incidence of arthritis increased in the three groups during the time, but was less important in mice injected with anti-DNAM-1 mAb (Figure 1b). Median of the mean [\pm IQR] clinical score was 1.9 [0.2-8.1] in mice receiving anti-DNAM-1, 9.4 [2.8-12.1] in those treated with control IgG ($p = 0.13$) and 5.0 [3.9-13.2] in mice treated with PBS ($p = 0.17$) (Figure 1c).

Consistent with these previous results, the maximal score had a non-significant trend to be lower in mice receiving anti-DNAM-1 mAb ($p = 0.37$ and 0.25 versus mice injected with control IgG and PBS, respectively) (Figure 1d). The day of the maximal score was similar in the three groups (32nd day in the first two groups and 34st day in the latter; $p = 0.67$ and 0.78 versus control IgG and PBS, respectively) (Figure 1b).

To better evaluate the difference between the three groups, we combined an US approach, which allows an accurate assessment of both synovitis in B-mode and inflammatory activity with Doppler. US was consistent with our clinical assessment, as it revealed a non-significant trend for lower scores in B-mode assessment in mice treated with anti-DNAM-1 ($p = 0.25$) (Figure 2a and b). Moreover, Doppler demonstrated a less inflammatory activity in mice receiving anti-DNAM-1 as compared to those treated with control IgG or PBS, but it did not reach significance ($p = 0.43$ and $p = 0.41$, respectively) (Figure 2c and d).

In all non-immunized mice, both B-mode and Doppler scores were equal to 0.

Collagen antibodies levels were similar in the three groups ($p = 0.75$ and $p = 0.62$, respectively), confirming the immunization with CII (Figure 3a).

Histological analysis revealed extensive inflammatory infiltrates in the synovium, without evidence of bone damage in all groups (Figure 3b). Inflammatory scores were not significantly different across the three groups, despite a trend for lower scores in those receiving anti-DNAM-1 ($p = 0.35$ and $p = 0.10$ versus mice injected with control IgG and PBS, respectively) (Figure 3c). To further assess the effect of anti-DNAM1 antibody, we quantified T cell infiltrates and DNAM1+T cells in each group of mice. We observed a significant reduction of the number of infiltrating T cells and the number of T cells expressing DNAM-in mice treated with anti-DNAM1 antibody as compared to mice injected with control IgG and PBS (Additional file 1: Figure S1).

DNAM-1 mAb was administered without serious adverse events for 3 weeks. No substantial changes were observed among mobility, activity, and compartment between mice treated with anti-DNAM-1 mAb or control IgG. Moreover, weight loss was <10% and no significant reduction of the food consumption was observed.

Although not significant, our results suggested a trend toward a less arthritic phenotype in mice treated with anti-DNAM-1 mAb. However, the molecular targeted strategy may be characterized by an incomplete blockade of the pathway targeted, unlike the gene inactivation strategy. Therefore to better assess the effect of inactivation of DNAM-1 in prevention of CIA, we decided to use mice deficient for DNAM-1, in which the pathway is completely blocked. We used these mice

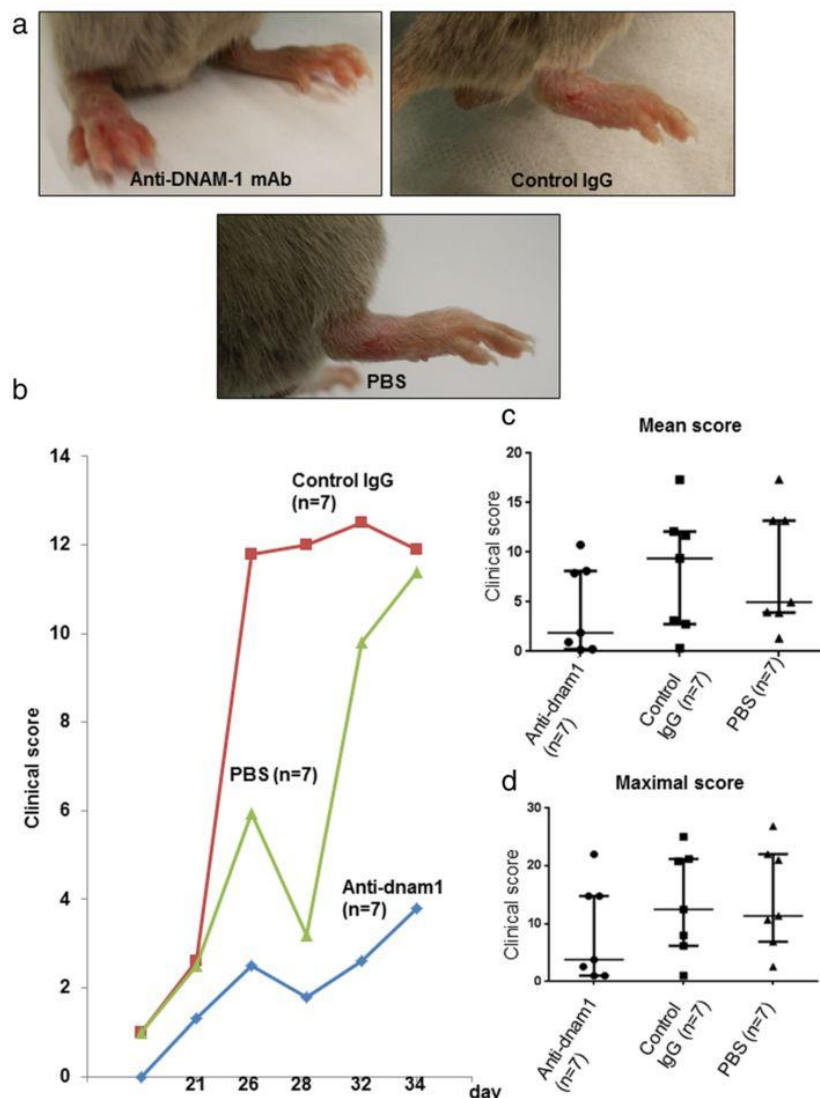


Figure 1 Anti-DNAM-1 monoclonal antibody does not protect from the development of collagen-induced arthritis at clinical assessment.

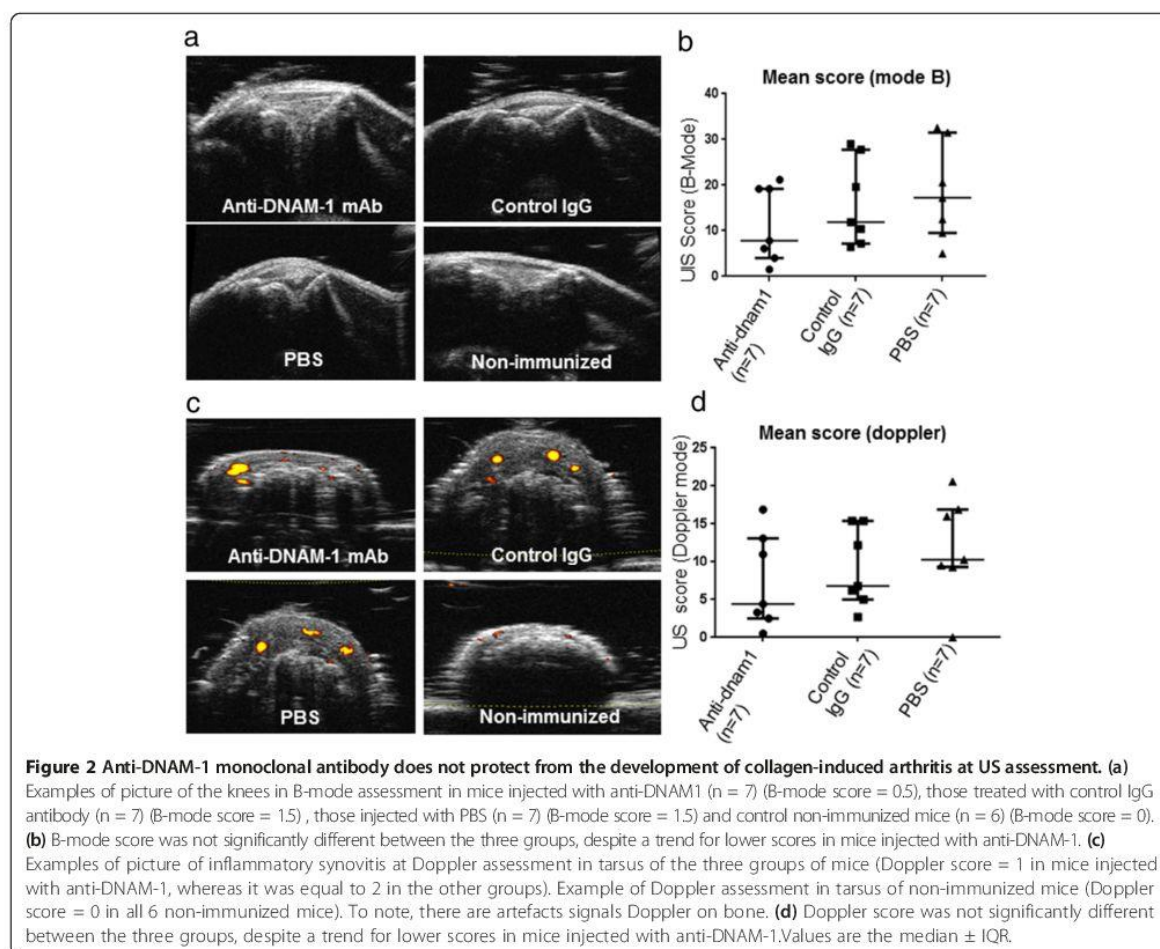
(a) Clinical evidence of arthritis with redness and swelling of the paws involving tarsus, ankle and toes in the three groups: the first group was treated with anti-DNAM-1 monoclonal antibody (n = 7); the second was treated with control IgG antibody (n = 7) and the third with PBS (n = 7). Pictures were taken at day 30. **(b)** Clinical score similarly increased in the three groups from the injection to the end point. This score had a trend to be lower in the group injected with anti-DNAM-1 without significance. The blue curve represents the scores obtained in mice treated with AC anti-DNAM1 (n = 7), the red one those obtained in mice receiving control IgG (n = 7) and the green one the scores in mice treated with PBS (n = 7). **(c and d)** Median of the mean clinical score and of the maximal score were not significantly different between mice injected with anti-DNAM-1 and those treated with control IgG and PBS, but there was a trend for lower score in mice injected with anti-DNAM-1. Values are the median \pm IQR.

in a previous study and they were on a C57/BL6 background [29].

Mice deficient for DNAM-1 are not protected from CIA

To further evaluate the role of DNAM-1 in CIA, 5 *dnam1*^{-/-} mice and 7 control *dnam1*^{+/+} mice were immunized with CII. First evidence of arthritis appeared at

day 38. All, 7/7 (100%) *dnam1*^{+/+} and 4/5 (80%) *dnam1*^{-/-} mice developed arthritis ($p = 0.22$) (Figure 4a). Incidence of arthritis increased similarly in both groups during the time (Figure 4b). Median of the mean [\pm IQR] clinical score was 6.0 [4.6-8.0] in *dnam1*^{+/+} mice versus 4.9 [3.6-7.1] in *dnam1*^{-/-} mice ($p = 0.60$) (Figure 4c). Consistent with these results, maximal clinical score



did not differ significantly between both groups ($p = 0.33$) (Figure 4d). The day of the maximal score was similar in both groups (53rd day in *dnam1*^{-/-} mice and 56th day in *dnam1*^{+/+} mice, $p = 0.78$) (Figure 4b).

We combined a B-mode US assessment to better evaluate arthritis in the mice and observed similar scores in *dnam1*^{+/+} mice (5.2 [4.2-7.2]) and *dnam1*^{-/-} mice (5.7 [4.6-9.3] in B-mode ($p = 0.53$)) (Figure 5a and b). Of interest, Doppler, which is an accurate tool to measure inflammatory activity in cases of arthritis, did not demonstrate any difference between *dnam1*^{+/+} and *dnam1*^{-/-} mice (scores: 4.2 [3.1-5.4] and 4.9 [4.0-6.5], respectively; $p = 0.53$) (Figure 5c and d). In all non-immunized mice, both B-mode and Doppler scores were equal to 0.

Collagen antibodies levels were also similar in *dnam1*^{+/+} and *dnam1*^{-/-} mice ($p = 0.88$) (Figure 6a).

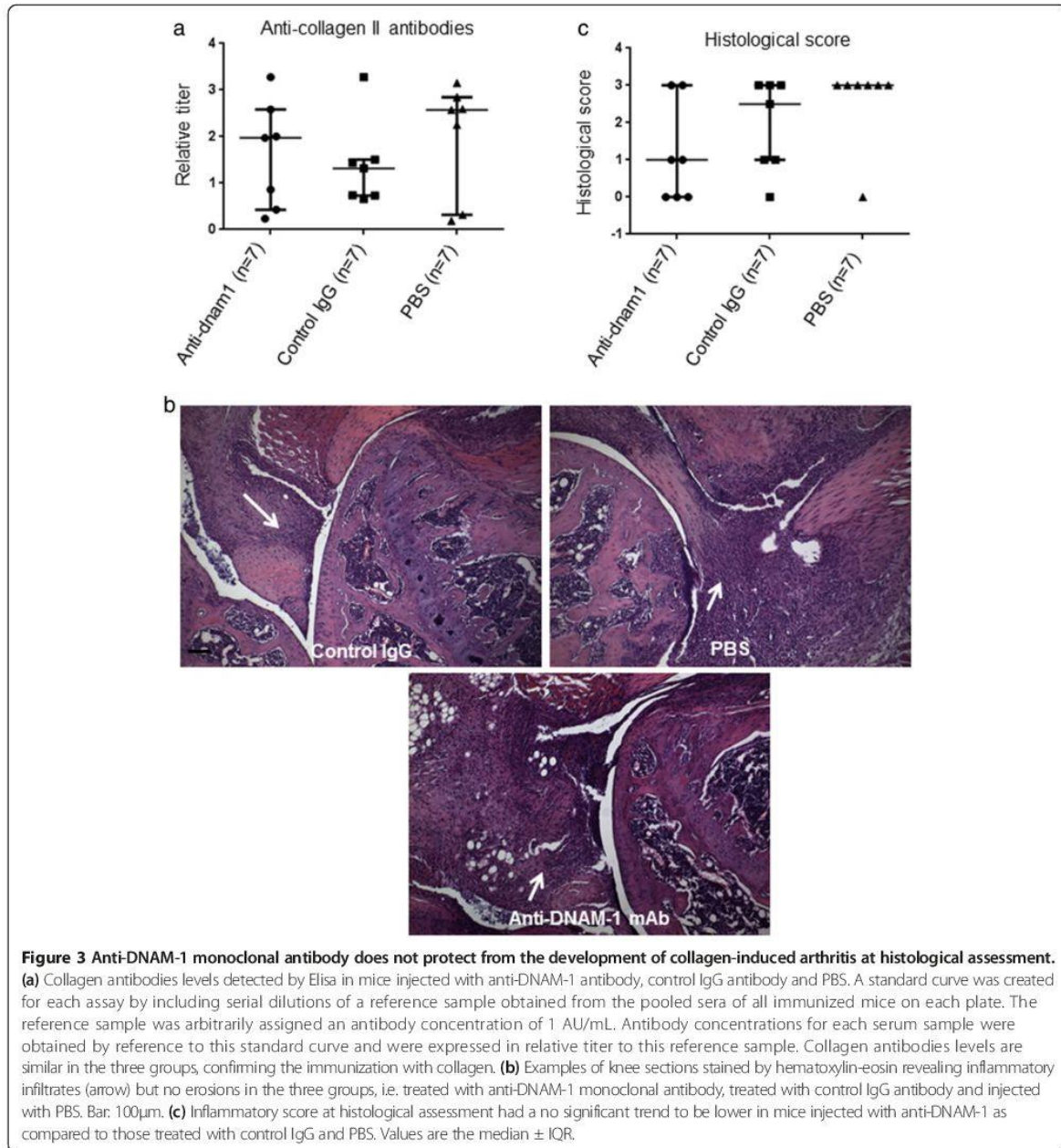
Histological analysis revealed mild inflammatory infiltrates in the synovium, without evidence of bone damage (Figure 6b). Inflammatory scores were low and not significantly different in both groups ($p = 0.79$) (Figure 6c).

Correlation between US and clinical assessments

We assessed correlation between US and clinical assessments in both experiments, for the joints, which were assessed by both methods (i.e. ankle, tarsus and toes) and observed a high correlation ($\rho: 0.71$; $p < 0.01$).

Discussion

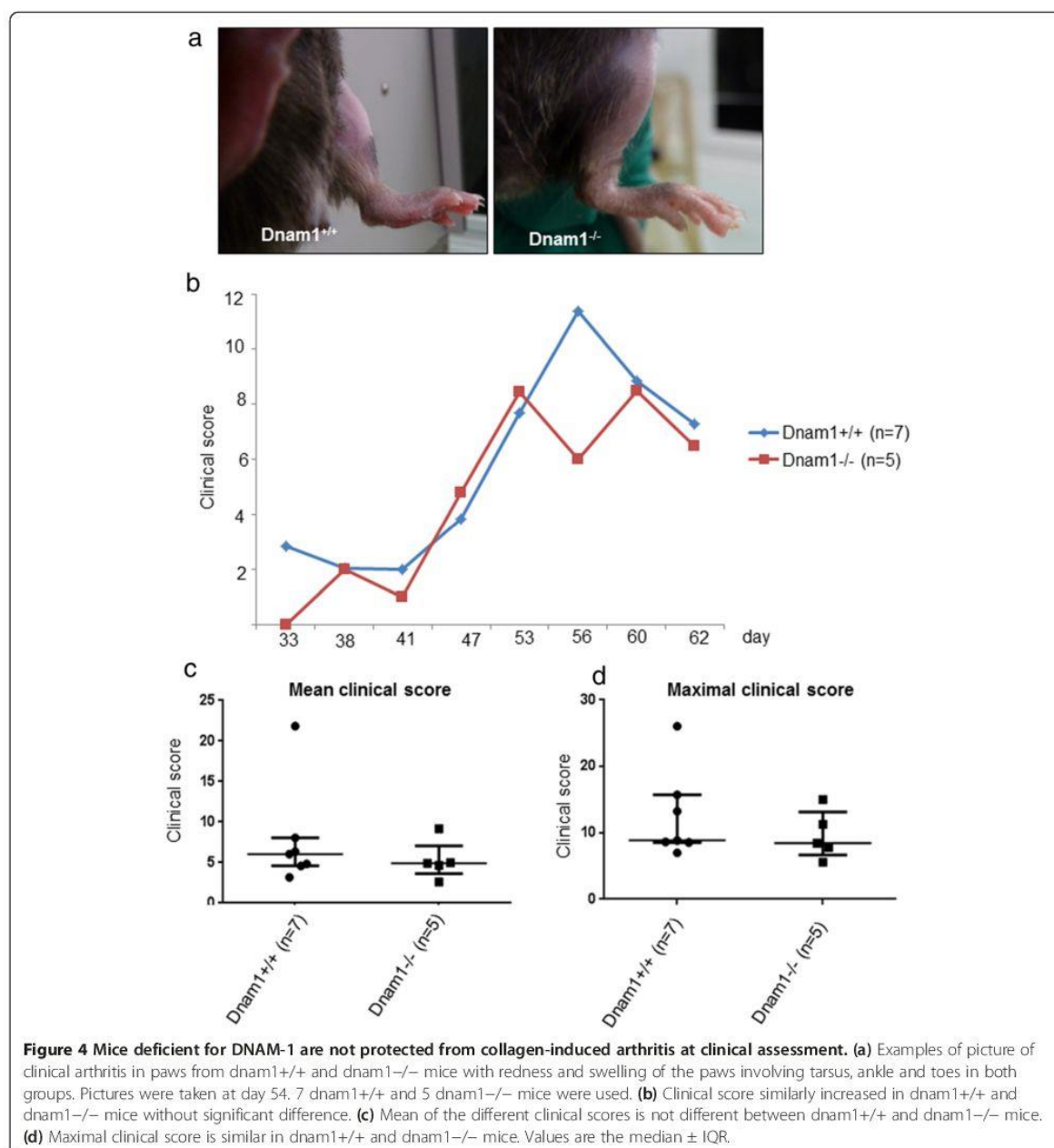
In the present study, we demonstrate that *CD226*/*DNAM-1* may be not a relevant target in RA, using an *in vivo* approach in the CIA model. Despite several genetic studies revealing that *CD226* was a susceptibility genetic factor for RA in different ethnic groups [11-18], neither inactivation of *DNAM-1* nor a molecular targeted strategy using a neutralizing mAb against *DNAM-1* prevented from CIA. To assess rigorously the effect of invalidation of *DNAM-1*, we used four different validated parameters (clinical score, US score, histological assessment and collagen antibodies levels) [34]. All these four parameters displayed the same results, demonstrating no significant effect of invalidation or neutralization



of DNAM-1 in CIA. This effect was not due to an arthrogenic effect of the antibody on its own, since we did not observe any clinical arthritis in non-immunized control mice treated with this mAb in a previous project [29].

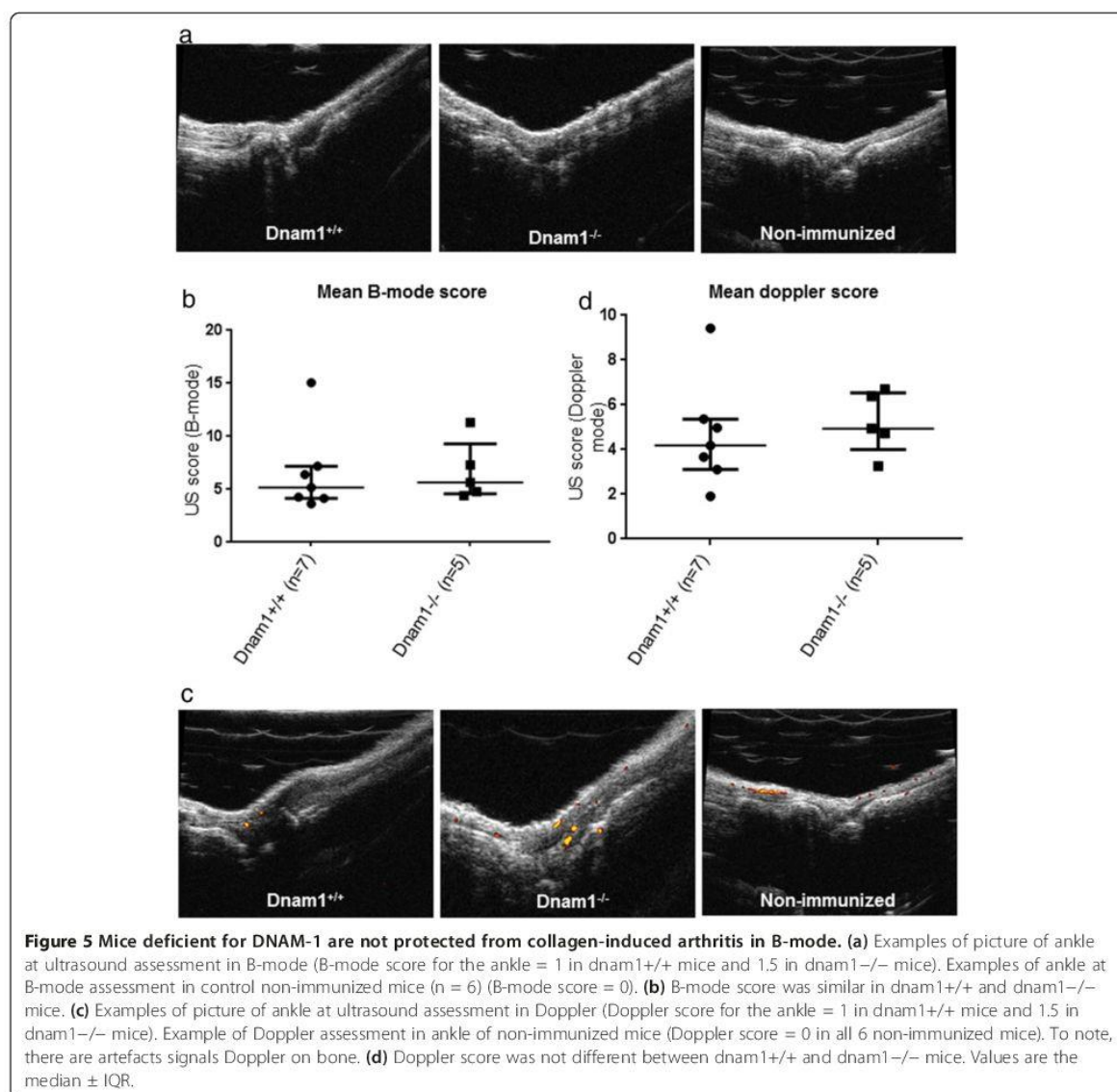
Until now, genetic approaches have revealed that *CD226* Gly307Ser (rs763361) polymorphism was significantly associated with several different autoimmune diseases and the risk of multiple autoimmune diseases

[11-18,36-38]. There is increasing evidence suggesting that autoimmune diseases share a genetic background and that autoimmune phenotypes represent pleiotropic outcomes of nonspecific disease genes [9,10,39]. Several susceptibility genes for autoimmune diseases have been identified without confirmation of their involvement in the development of the pathogenic phenotype. Therefore, it is crucial to proceed to their functional validation *in vivo*. So far, the contribution of *CD226*/DNAM-1 to



the phenotype of several autoimmune diseases has been demonstrated *in vivo* in some murine models [29,38,40]. In a murine model of multiple sclerosis, i.e. experimental autoimmune encephalomyelitis, anti-DNAM-1 treatment delayed the onset and reduced the severity of the disease [40]. In a mouse model of acute graft-versus-host disease (GVHD), invalidation of DNAM-1 and an anti-DNAM-1 mAb were both associated with a milder GVHD and prolonged survival [38]. Recently, our group

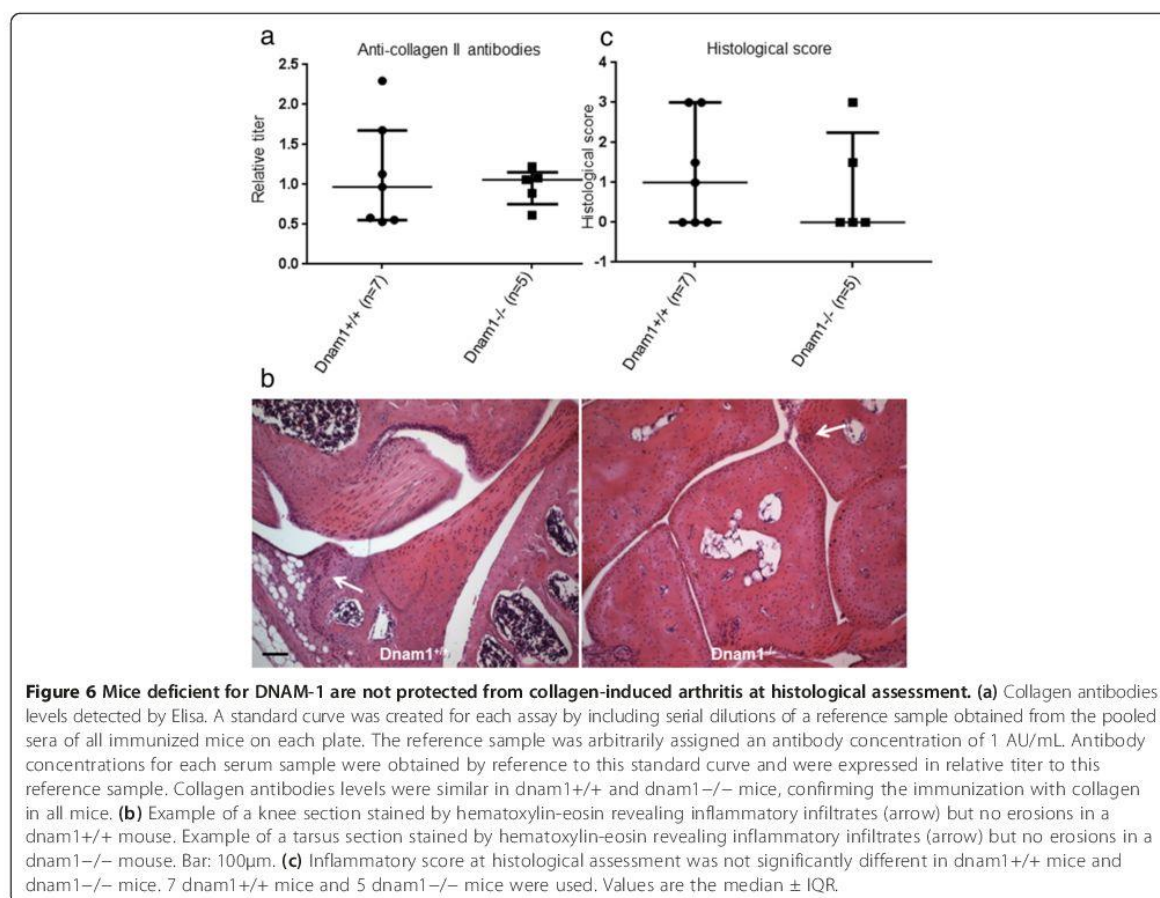
demonstrated that inhibition of DNAM-1 significantly ameliorated dermal fibrosis, in a murine model of systemic sclerosis [29]. In all these murine models, the blocking of DNAM-1 was associated with decreased infiltration of T cells, suggesting that it could reflect a general effect of DNAM-1 on inflammation rather than an effect linked to a specific genetic susceptibility for the autoimmune disease considered. Here we show that blocking *CD226*/DNAM-1 has no effect in another T



cell-mediated inflammatory disease, despite a decrease in infiltrating T cells, consistent with what was observed in the mouse models of dermal fibrosis [29]. This suggests that other cells are involved in the pathophysiology of CIA. This also highlights that DNAM-1 may be implicated in the development of a specific pathogenic phenotype, such as dermal fibrosis, encephalomyelitis and GVHD, but non RA.

In this report, we confirm that mice on a C57BL/6 background can develop clinical signs of arthritis with a high incidence around 100%, using a modified procedure. Incidence of arthritis in our study was much higher than in previous reports (60-70%) [27,28,41]. Several

differences may account for this discrepancy: first we used a concentration of CII equal to 4 mg/ml instead of 2mg/ml, secondly we performed immunization only on male mice and thirdly male were younger than in previous studies. This slightly modified procedure (previously used by our team (unpublished results)) could increase the incidence of arthritis in C57/BL6 mice, but should be evaluated in further studies. This is of interest, since most of the knock-out mice are on a C57/BL6 background. Nonetheless, the severity of clinical arthritis was lower in C57/BL6 mice than in DBA/1 mice, which is consistent with a previous study [27]. In this report, we also confirmed that arthritis develops later in mice on a C57/BL6 background (around



40th day) as compared to DBA/1 mice (on the 20th day) [27,28,41]. However, we observed a lower incidence and severity at histological assessment with low inflammatory scores in C57/BL6 mice than in DBA/1 mice.

US was proved to be a valuable method for evaluating arthritic lesions in mice on a DBA/1 background [34]. Here we confirm these results and suggest that US could also be used in other background, such as C57/BL6 with preliminary results, revealing high concordance with clinical analysis. Moreover, power Doppler allows visualizing and quantifying joint vascularization during the course of the disease. Therefore, the ability of US in investigating arthritic lesions in C57/BL6 mice should be evaluated in further studies.

Our study should be interpreted within its limitations. First, we could not exclude an immunization of our mice against this antibody. However, there were a significant reduction of infiltrating T cells, especially those expressing DNAM-1, following treatment with anti-DNAM-1 mAb suggesting that the Ab was biologically effective on these mice, despite no effect on the arthritic phenotype was detected. Moreover, we did not observe any bone

and cartilage erosions unlike previous publications and induction of arthritis on the C57/BL6 background was challenging [27,28,41]. However, there was evidence of induction of arthritis with clinical signs of arthritis, inflammatory infiltrates at histology and production of CII antibodies. Nevertheless, we can suggest using other models, such as antigen-induced arthritis using mBSA or K/BxN serum-induced arthritis, to confirm our results.

In addition, we could not assess the correlation between clinical and US assessments for all joints, since some joints were assessed only clinically (i.e. wrists and fingers), whereas knees only were evaluated by US alone. However, our results demonstrate a high correlation between clinical and US evaluations for all joints investigated. Moreover, US is an operator-dependent method and here the assessment was only performed by one examiner. Nevertheless, this was performed by a trained investigator, who developed this strategy [34].

Conclusion

Inhibition of DNAM-1, a critical new genetic factor in autoimmune disorders, does not prevent the

development of CIA, despite its efficacy in other models of inflammatory diseases, such as bleomycin-induced fibrosis, encephalomyelitis and GVHD. This interesting result suggests that DNAM-1 might be involved in the development of a specific autoimmune phenotype and not in all inflammatory diseases. It remains to assess the efficacy of inhibition of DNAM-1 *in vivo* in other autoimmune diseases, in which *CD226* was identified as a susceptibility genetic factor, such as type 1 diabetes and systemic lupus erythematosus [11,13,36].

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Treatment with anti-DNAM-1 monoclonal antibody was associated with a decrease in infiltrating T cells and in T cells expressing DNAM-1 (a) Representative pictures showing decreased T cell infiltrates in mice injected with anti-DNAM-1 monoclonal antibody. T cells are identified by CD3 staining (in green), whereas nuclei are stained in blue. (b) Reduction of infiltrating T cells in the group of mice treated with the monoclonal antibody against anti-DNAM-1 (n = 4), compared to those treated with control IgG antibody (n = 4) and those injected with PBS (n = 4). (c) The number of infiltrating T cells expressing DNAM-1 was significantly lower in mice treated with the anti-DNAM1 monoclonal antibody (n = 4) as compared to those receiving either control IgG (n = 4) either PBS (n = 4). Values are the median \pm IQR. **: p < 0.01.

Abbreviations

CI: collagen I; CIA: collagen induced-arthritis; CFA: complete Freund's adjuvant; DNAM-1: DNAX accessory molecule 1; GVHD: graft-versus-host disease; IFA: incomplete Freund's adjuvant; mAb: monoclonal antibody; RA: rheumatoid arthritis; SNP: single nucleotide polymorphism; US: ultrasound.

Competing interests

All the authors declare to have no competing interests.

Authors' contributions

Study conception and design: ME, G.C, M.C, G.B, Y.A, J.A. Acquisition of data: M.E, G.C, C.M, F.L, G.R. Analysis and interpretation of data: M.E, G.C, C.M, G.R, Y.A, J.A. All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published.

Acknowledgements

We thank the Small Animal Imaging Facility INSERM U1016 (Didier Fradelizi), the Histology Department, INSERM U1016 (Maryline Favier and Corinne Lesaffre) and the Cochin Imaging facility (Pierre Bourdoncle) for excellent technical assistance. We thank Melanie Piedavent and Manuel Friese for providing us the monoclonal antibody anti-DNAM-1.

Grant supports

INSERM, Société Française de Rhumatologie, Fondation pour la recherche Médicale, Arthritis Foundation.

Author details

¹Rheumatology A department, Cochin Hospital, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France. ²Cochin Institut, INSERM U1016, UMR 8104, Team ATIP/AVENIR, Paris Descartes University, Paris, France. ³Inserm U987, Université Versailles-Saint-Quentin, Montigny-Le-Bretonneux, France. ⁴Small Animal Imaging Facility, Paris Descartes University, INSERM U1016, Institut Cochin, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁵Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine, St Louis, USA. ⁶Institute of Immunology, Hannover Medical School, Hannover, Germany.

Received: 10 June 2014 Accepted: 26 January 2015

Published online: 08 February 2015

References

- Blom M, Kievit W, Fransen J, Kuper IH, den Broeder AA, De Gendt CMA, et al. The reason for discontinuation of the first tumor necrosis factor (TNF) blocking agent does not influence the effect of a second TNF blocking agent in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2009;36(10):2171–7.
- Tak PP, Kalden JR. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther*. 2011;13 Suppl 1:S5.
- Upchurch KS, Kay J. Evolution of treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2012;51 Suppl 6vi28–36.
- Boissier MC. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. 2011;78(3):230–4.
- Fournier C. Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? *Jt Bone Spine Rev Rhum*. 2005;72(6):527–32.
- Dieudé P. Rheumatic diseases: environment and genetics. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. 2009;76(6):602–7.
- Bax M, van Heemst J, Huizinga TWJ, Toes REM. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics*. 2011;63(8):459–66.
- Deshmukh H, Kim-Howard X, Nath SK. Replication of recently identified associated single-nucleotide polymorphisms from six autoimmune diseases in Genetic Analysis Workshop 16 rheumatoid arthritis data. *BMC Proc*. 2009;3 Suppl 7:S31.
- Lettre G, Rioux JD. Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. *Hum Mol Genet*. 2008;17(R2):R116–21.
- Anaya J-M. The autoimmune tautology. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6):147.
- Haffer JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, et al. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun*. 2009;10(1):5–10.
- Dieudé P, Guedj M, Truchetet ME, Wipff J, Revillon L, Riemekasten G, et al. Association of the CD226 Ser(307) variant with systemic sclerosis: evidence of a contribution of costimulation pathways in systemic sclerosis pathogenesis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(4):1097–105.
- Maiti AK, Kim-Howard X, Viswanathan P, Guillén L, Qian X, Rojas-Villarraga A, et al. Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatol Oxf Engl*. 2010;49(7):1239–44.
- Qiu Z-X, Zhang K, Qiu X-S, Zhou M, Li W-M. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2013;74(2):249–55.
- Du Y, Shen L-X, Yu L-K, Song Y, Zhu J-F, Du R. The CD226 gene in susceptibility of rheumatoid arthritis in the Chinese Han population. *Rheumatol Int*. 2012;32(5):1299–304.
- Liu R, Xu N, Wang X, Shen L, Zhao G, Zhang H, et al. Influence of MIF, CD40, and CD226 polymorphisms on risk of rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(6):6915–22.
- Deshmukh HA, Maiti AK, Kim-Howard XR, Rojas-Villarraga A, Guthridge JM, Anaya J-M, et al. Evaluation of 19 autoimmune disease-associated loci with rheumatoid arthritis in a Colombian population: evidence for replication and gene-gene interaction. *J Rheumatol*. 2011;38(9):1866–70.
- Suzuki T, Ikari K, Kawaguchi Y, Yano K, Iwamoto T, Kawamoto M, et al. Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility in Japanese rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol Jpn Rheum Assoc*. 2013;23(1):200–2.
- Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*. 1996;4(6):573–81.
- Boissier M-C, Semerano L, Challal S, Saldenber-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun*. 2012;39(3):222–8.
- Fasth AER, Björkstöm NK, Anthoni M, Malmberg K-J, Malmström V. Activating NK-cell receptors co-stimulate CD4(+)CD28(-) T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2010;40(2):378–87.
- Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci*. 1997;61(19):1861–78.
- Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. 1980;283(5748):666–8.
- Durie FH, Fava RA, Noelle RJ. Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;73(1):1–8.

25. Gilfillan S, Chan CJ, Cella M, Haynes NM, Rapaport AS, Boles KS, et al. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med*. 2008;205(13):2965–73.
26. Guéry L, Batteux F, Bessis N, Breban M, Boissier MC, Fournier C, et al. Expression of Fas ligand improves the effect of IL-4 in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol*. 2000;30(1):308–15.
27. Inglis JJ, Criado G, Medghalchi M, Andrews M, Sandison A, Feldmann M, et al. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(5):R113.
28. Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2000;30(6):1568–75.
29. Avouac J, Elhai M, Tomcik M, Ruiz B, Friese M, Piedavent M, et al. Critical role of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of inflammation-driven dermal fibrosis in a mouse model of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(6):1089–98.
30. Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Kai H, Miyamoto A, Morikawa Y, Ohkochi N, et al. Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood*. 2006;107(4):1491–6.
31. Yamashita Y, Abe F, Hirochika R, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A, Shibuya K. Establishment and characterization of a novel anti-DNAM-1 monoclonal antibody. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2013;32(1):60–4. doi: 10.1089/mab.2012.0083.
32. Glatigny S, Blaton M-A, Mencher SK, Mistou S, Lucas B, Fournier C, et al. Treatment of collagen-induced arthritis by Natura-alpha via regulation of Th-1/Th-17 responses. *Eur J Immunol*. 2010;40(2):460–9.
33. Elhai M, Jérôme A, Marchiol C, Renault G, Ruiz B, Fréchet M, et al. Performance of skin ultrasound to measure skin involvement in different animal models of systemic sclerosis. *Ultrasound Med Biol*. 2013;39(5):845–52.
34. Clavel G, Marchiol-Fournigault C, Renault G, Boissier M-C, Fradelizi D, Bessis N. Ultrasound and Doppler micro-imaging in a model of rheumatoid arthritis in mice. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(12):1765–72.
35. Saidenberg-Kermanach N, Bessis N, Lemeiter D, de Vernejoul M-C, Boissier M-C, Cohen-Solal M. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. *J Clin Immunol*. 2004;24(4):370–8.
36. Song G, Bae S-C, Choi S, Ji J, Lee Y. Association between the CD226 rs763361 polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Lupus*. 2012;21(14):1522–30.
37. Gan EH, Mitchell AL, Macarthur K, Pearce SHS. The role of a nonsynonymous CD226 (DNAX-accessory molecule-1) variant (Gly 307Ser) in isolated Addison's disease and autoimmune polyendocrinopathy type 2 pathogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(2):165–8.
38. Nabekura T, Shibuya K, Takenaka E, Kai H, Shibata K, Yamashita Y, et al. Critical role of DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of acute graft-versus-host disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18593–8.
39. Anaya J-M, Gómez L, Castiblanco J. Is there a common genetic basis for autoimmune diseases? *Clin Dev Immunol*. 2006;13(2–4):185–95.
40. Dardalhon V, Schubart AS, Reddy J, Meyers JH, Monney L, Sabatos CA, et al. CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005;175(3):1558–65.
41. Kai H, Shibuya K, Wang Y, Kameta H, Kameyama T, Tahara-Hanaoka S, et al. Critical role of M. tuberculosis for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. *Immunology*. 2006;118(2):233–9.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



BIBLIOGRAPHIE

1. Elhai M, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis: Recent insights. *Jt Bone Spine Rev Rhum.* 31 déc 2014;
2. Elhai M, Avouac J, Walker UA, Matucci-Cerinic M, Riemekasten G, Airò P, et al. A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Ann Rheum Dis.* 23 oct 2014;
3. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TAJ, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* févr 1988;15(2):202-5.
4. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 1 nov 2013;72(11):1747-55.
5. 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.* mai 1980;23(5):581-90.
6. Meier FMP, Frommer KW, Dinser R, Walker UA, Czirjak L, Denton CP, et al. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis.* août 2012;71(8):1355-60.
7. Chiffлот H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* févr 2008;37(4):223-35.
8. El Adssi H, Cirstea D, Virion J-M, Guillemin F, de Korwin J-D. Estimating the prevalence of systemic sclerosis in the Lorraine region, France, by the capture-recapture method. *Semin Arthritis Rheum.* avr 2013;42(5):530-8.
9. Le Guern V, Mahr A, Mouthon L, Jeanneret D, Carzon M, Guillemin L. Prevalence of systemic sclerosis in a French multi-ethnic county. *Rheumatol Oxf Engl.* sept 2004;43(9):1129-37.
10. Medsger TAJ, Masi AT. Epidemiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Intern Med.* mai 1971;74(5):714-21.

11. Michet CJJ, McKenna CH, Elveback LR, Kaslow RA, Kurland LT. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc.* févr 1985;60(2):105-13.
12. Silman AJ, Howard Y, Hicklin AJ, Black C. Geographical clustering of scleroderma in south and west London. *Br J Rheumatol.* avr 1990;29(2):93-6.
13. Valesini G, Litta A, Bonavita MS, Luan FL, Purpura M, Mariani M, et al. Geographical clustering of scleroderma in a rural area in the province of Rome. *Clin Exp Rheumatol.* févr 1993;11(1):41-7.
14. Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatol Oxf Engl.* juin 2012;51(6):1017-26.
15. Koumakis E, Dieudé P, Avouac J, Kahan A, Allanore Y, Association des Sclérodermiques de France. Familial autoimmunity in systemic sclerosis -- results of a French-based case-control family study. *J Rheumatol.* mars 2012;39(3):532-8.
16. Hudson M, Rojas-Villarraga A, Coral-Alvarado P, López-Guzmán S, Mantilla RD, Chalem P, et al. Polyautoimmunity and familial autoimmunity in systemic sclerosis. *J Autoimmun.* sept 2008;31(2):156-9.
17. Elhai M, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis at the crossroad of polyautoimmunity. *Autoimmun Rev.* sept 2013;12(11):1052-7.
18. Avouac J, Airò P, Dieude P, Caramaschi P, Tiev K, Diot E, et al. Associated autoimmune diseases in systemic sclerosis define a subset of patients with milder disease: results from 2 large cohorts of European Caucasian patients. *J Rheumatol.* mars 2010;37(3):608-14.
19. Hachulla E, Clerson P, Launay D, Lambert M, Morell-Dubois S, Queyrel V, et al. Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. *J Rheumatol.* déc 2007;34(12):2423-30.
20. Clements PJ, Lachenbruch PA, Seibold JR, Zee B, Steen VD, Brennan P, et al. Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J Rheumatol.* nov 1993;20(11):1892-6.
21. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airò P, Cozzi F, Carreira PE, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* oct 2010;69(10):1809-15.

22. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* oct 2014;44(2):208-19.
23. Cappelli S, Bellando Randone S, Camiciottoli G, De Paulis A, Guiducci S, Matucci-Cerinic M. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: where do we stand? *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* sept 2015;24(137):411-9.
24. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* sept 1994;37(9):1283-9.
25. Solomon JJ, Olson AL, Fischer A, Bull T, Brown KK, Raghu G. Scleroderma lung disease. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* 1 mars 2013;22(127):6-19.
26. Schoindre Y, Meune C, Dinh-Xuan AT, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Lack of specificity of the 6-minute walk test as an outcome measure for patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* juill 2009;36(7):1481-5.
27. Herzog EL, Mathur A, Tager AM, Feghali-Bostwick C, Schneider F, Varga J. Review: interstitial lung disease associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis: how similar and distinct? *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* août 2014;66(8):1967-78.
28. Shah RM, Jimenez S, Wechsler R. Significance of ground-glass opacity on HRCT in long-term follow-up of patients with systemic sclerosis. *J Thorac Imaging.* mai 2007;22(2):120-4.
29. Launay D, Remy-Jardin M, Michon-Pasturel U, Mastora I, Hachulla E, Lambert M, et al. High resolution computed tomography in fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* sept 2006;33(9):1789-801.
30. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juin 2002;165(12):1581-6.
31. Picano E, Semelka R, Ravenel J, Matucci-Cerinic M. Rheumatological diseases and cancer: the hidden variable of radiation exposure. *Ann Rheum Dis.* déc 2014;73(12):2065-8.
32. Barskova T, Gargani L, Guiducci S, Randone SB, Bruni C, Carnesecchi G, et al. Lung ultrasound for the screening of interstitial lung disease in very early systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* mars 2013;72(3):390-5.
33. Frauenfelder T, Winklehner A, Nguyen TDL, Dobrota R, Baumüller S, Maurer B, et al. Screening for interstitial lung disease in systemic sclerosis: performance of high-

- resolution CT with limited number of slices: a prospective study. *Ann Rheum Dis.* déc 2014;73(12):2069-73.
34. Winklehner A, Berger N, Maurer B, Distler O, Alkadhi H, Frauenfelder T. Screening for interstitial lung disease in systemic sclerosis: the diagnostic accuracy of HRCT image series with high increment and reduced number of slices. *Ann Rheum Dis.* avr 2012;71(4):549-52.
 35. Goh NSL, Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Copley SJ, Maher TM, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 juin 2008;177(11):1248-54.
 36. Moore OA, Goh N, Corte T, Rouse H, Hennessy O, Thakkar V, et al. Extent of disease on high-resolution computed tomography lung is a predictor of decline and mortality in systemic sclerosis-related interstitial lung disease. *Rheumatol Oxf Engl.* janv 2013;52(1):155-60.
 37. Perera A, Fertig N, Lucas M, Rodriguez-Reyna TS, Hu P, Steen VD, et al. Clinical subsets, skin thickness progression rate, and serum antibody levels in systemic sclerosis patients with anti-topoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum.* août 2007;56(8):2740-6.
 38. Assassi S, Sharif R, Lasky RE, McNearney TA, Estrada-Y-Martin RM, Draeger H, et al. Predictors of interstitial lung disease in early systemic sclerosis: a prospective longitudinal study of the GENISOS cohort. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):R166.
 39. Greidinger EL, Flaherty KT, White B, Rosen A, Wigley FM, Wise RA. African-American race and antibodies to topoisomerase I are associated with increased severity of scleroderma lung disease. *Chest.* sept 1998;114(3):801-7.
 40. Cappelli S, Bellando Randone S, Camiciottoli G, De Paulis A, Guiducci S, Matucci-Cerinic M. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: where do we stand? *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* sept 2015;24(137):411-9.
 41. Authors/Task Force Members:, Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 29 août 2015;
 42. Proceedings of the 4th World Symposium on Pulmonary Hypertension, February 2008, Dana Point, California, USA. *J Am Coll Cardiol.* 30 juin 2009;54(1 Suppl):S1-117.

43. Avouac J, Airò P, Meune C, Beretta L, Dieude P, Caramaschi P, et al. Prevalence of pulmonary hypertension in systemic sclerosis in European Caucasians and metaanalysis of 5 studies. *J Rheumatol.* nov 2010;37(11):2290-8.
44. Iudici M, Codullo V, Giuggioli D, Riccieri V, Cuomo G, Breda S, et al. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: prevalence, incidence and predictive factors in a large multicentric Italian cohort. *Clin Exp Rheumatol.* avr 2013;31(2 Suppl 76):31-6.
45. Volkmann ER, Saggar R, Khanna D, Torres B, Flora A, Yoder L, et al. Improved transplant-free survival in patients with systemic sclerosis-associated pulmonary hypertension and interstitial lung disease. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 11 avr 2014;
46. Fischer A, Bull TM, Steen VD. Practical approach to screening for scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Care Res.* mars 2012;64(3):303-10.
47. Allanore Y, Borderie D, Avouac J, Zerkak D, Meune C, Hachulla E, et al. High N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels and low diffusing capacity for carbon monoxide as independent predictors of the occurrence of precapillary pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* janv 2008;58(1):284-91.
48. Coghlan JG, Denton CP, Grünig E, Bonderman D, Distler O, Khanna D, et al. Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis.* 18 mai 2013;
49. Lau EMT, Humbert M, Celermajer DS. Early detection of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol.* mars 2015;12(3):143-55.
50. Valenzuela A, Nandagopal S, Steen VD, Chung L. Monitoring and Diagnostic Approaches for Pulmonary Arterial Hypertension in Patients with Systemic Sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* août 2015;41(3):489-506.
51. Chung L, Domsic RT, Lingala B, Alkassab F, Bolster M, Csuka ME, et al. Survival and predictors of mortality in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension: outcomes from the pulmonary hypertension assessment and recognition of outcomes in scleroderma registry. *Arthritis Care Res.* mars 2014;66(3):489-95.
52. Avouac J, Clements PJ, Khanna D, Furst DE, Allanore Y. Articular involvement in systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl.* août 2012;51(8):1347-56.
53. Avouac J, Walker U, Tyndall A, Kahan A, Matucci-Cerinic M, Allanore Y, et al. Characteristics of joint involvement and relationships with systemic inflammation in systemic sclerosis: results from the EULAR Scleroderma Trial and Research Group (EUSTAR) database. *J Rheumatol.* juill 2010;37(7):1488-501.

54. Elhai M, Guerini H, Bazeli R, Avouac J, Freire V, Drapé J-L, et al. Ultrasonographic hand features in systemic sclerosis and correlates with clinical, biologic, and radiographic findings. *Arthritis Care Res.* août 2012;64(8):1244-9.
55. Avouac J, Walker UA, Hachulla E, Riemekasten G, Cuomo G, Carreira PE, et al. Joint and tendon involvement predict disease progression in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Ann Rheum Dis.* 27 août 2014;
56. Marie I. [Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. déc 2006;35(12 Pt 2):1952-65.
57. Wipff J, Coriat R, Masciocchi M, Caramaschi P, Derk CT, Hachulla E, et al. Outcomes of Barrett's oesophagus related to systemic sclerosis: a 3-year EULAR Scleroderma Trials and Research prospective follow-up study. *Rheumatol Oxf Engl.* août 2011;50(8):1440-4.
58. Traub YM, Shapiro AP, Rodnan GP, Medsger TA, McDonald RHJ, Steen VD, et al. Hypertension and renal failure (scleroderma renal crisis) in progressive systemic sclerosis. Review of a 25-year experience with 68 cases. *Medicine (Baltimore).* nov 1983;62(6):335-52.
59. Allanore Y, Meune C, Vonk MC, Airo P, Hachulla E, Caramaschi P, et al. Prevalence and factors associated with left ventricular dysfunction in the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) database of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* janv 2010;69(1):218-21.
60. Sobanski V, Dauchet L, Lefèvre G, Lambert M, Morell-Dubois S, Sy T, et al. Prevalence of anti-RNA polymerase III antibodies in systemic sclerosis: New data from a French cohort and a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* févr 2014;66(2):407-17.
61. Walker JG, Fritzler MJ. Update on autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* nov 2007;19(6):580-91.
62. Mehra S, Walker J, Patterson K, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* janv 2013;12(3):340-54.
63. Op De Beéck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun Rev.* déc 2012;12(2):137-43.
64. Tamby MC, Servettaz A, Guilpain P, Tamas N, Berezné A, Batteux F, et al. Immunoblotting on HEp-2 cells increases the detection of antitopoisomerase 1 antibodies in patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol Orlando Fla.* avr 2007;123(1):82-8.

65. Reveille JD, Fischbach M, McNearney T, Friedman AW, Aguilar MB, Lisse J, et al. Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants. *Semin Arthritis Rheum.* avr 2001;30(5):332-46.
66. Hudson M, Mahler M, Pope J, You D, Tatibouet S, Steele R, et al. Clinical correlates of CENP-A and CENP-B antibodies in a large cohort of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* avr 2012;39(4):787-94.
67. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis.* juil 2007;66(6):754-63.
68. Onishi A, Sugiyama D, Kumagai S, Morinobu A. Cancer incidence in systemic sclerosis: meta-analysis of population-based cohort studies. *Arthritis Rheum.* juil 2013;65(7):1913-21.
69. Moinzadeh P, Fonseca C, Hellmich M, Shah AA, Chighizola C, Denton CP, et al. Association of anti-RNA polymerase III autoantibodies and cancer in scleroderma. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):R53.
70. Joseph CG, Darrah E, Shah AA, Skora AD, Casciola-Rosen LA, Wigley FM, et al. Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science.* 10 janv 2014;343(6167):152-7.
71. Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, Oddis CV, Medsger TA. Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* avr 2009;60(4):1112-8.
72. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F, et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R172.
73. Ghrénassia E, Avouac J, Khanna D, Derk CT, Distler O, Suliman YA, et al. Prevalence, correlates and outcomes of gastric antral vascular ectasia in systemic sclerosis: a EUSTAR case-control study. *J Rheumatol.* janv 2014;41(1):99-105.
74. Elhai M, Meunier M, Matucci-Cerinic M, Maurer B, Riemekasten G, Leturcq T, et al. Outcomes of patients with systemic sclerosis-associated polyarthritis and myopathy treated with tocilizumab or abatacept: a EUSTAR observational study. *Ann Rheum Dis.* juil 2013;72(7):1217-20.
75. Beyer C, Dees C, Distler JHW. Morphogen pathways as molecular targets for the treatment of fibrosis in systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res.* janv 2013;305(1):1-8.

76. Gordon JK, Martyanov V, Magro C, Wildman HF, Wood TA, Huang W-T, et al. Nilotinib (TasignaTM) in the treatment of early diffuse systemic sclerosis: an open-label, pilot clinical trial. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):213.
77. Iwamoto N, Distler JHW, Distler O. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of systemic sclerosis: from animal models to clinical trials. *Curr Rheumatol Rep.* févr 2011;13(1):21-7.
78. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med.* 20 août 2015;373(8):782-782.
79. Huang J, Beyer C, Palumbo-Zerr K, Zhang Y, Ramming A, Distler A, et al. Nintedanib inhibits fibroblast activation and ameliorates fibrosis in preclinical models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 9 avr 2015;
80. Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, Kamen DL, Nelson LM, Norris JM, et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun.* déc 2012;39(4):259-71.
81. Marie I, Gehanno J-F, Bubenheim M, Duval-Modeste A-B, Joly P, Dominique S, et al. Prospective study to evaluate the association between systemic sclerosis and occupational exposure and review of the literature. *Autoimmun Rev.* févr 2014;13(2):151-6.
82. Goldman JA. Connective tissue disease in people exposed to organic chemical solvents: systemic sclerosis (scleroderma) in dry cleaning plant and aircraft industry workers. *J Clin Rheumatol Pract Rep Rheum Musculoskelet Dis.* août 1996;2(4):185-90.
83. Farina A, Cirone M, York M, Lenna S, Padilla C, McLaughlin S, et al. Epstein-Barr virus infection induces aberrant TLR activation pathway and fibroblast-myofibroblast conversion in scleroderma. *J Invest Dermatol.* avr 2014;134(4):954-64.
84. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* juill 2003;48(7):1956-63.
85. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* juill 2003;48(7):1956-63.
86. Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatol Oxf Engl.* févr 2010;49(2):203-10.

87. Zhou X, Tan FK, Xiong M, Arnett FC, Feghali-Bostwick CA. Monozygotic twins clinically discordant for scleroderma show concordance for fibroblast gene expression profiles. *Arthritis Rheum.* oct 2005;52(10):3305-14.
88. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum.* juin 2001;44(6):1359-62.
89. Arnett FC, Howard RF, Tan F, Moulds JM, Bias WB, Durban E, et al. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum.* août 1996;39(8):1362-70.
90. Broen JCA, Coenen MJH, Radstake TRDJ. Genetics of systemic sclerosis: an update. *Curr Rheumatol Rep.* févr 2012;14(1):11-21.
91. Lambert NC, Distler O, Müller-Ladner U, Tylee TS, Furst DE, Nelson JL. HLA-DQA1*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum.* sept 2000;43(9):2005-10.
92. Kuwana M, Inoko H, Kameda H, Nojima T, Sato S, Nakamura K, et al. Association of human leukocyte antigen class II genes with autoantibody profiles, but not with disease susceptibility in Japanese patients with systemic sclerosis. *Intern Med Tokyo Jpn.* avr 1999;38(4):336-44.
93. Ueki A, Isozaki Y, Tomokuni A, Ueki H, Kusaka M, Tanaka S, et al. Different distribution of HLA class II alleles in anti-topoisomerase I autoantibody responders between silicosis and systemic sclerosis patients, with a common distinct amino acid sequence in the HLA-DQB1 domain. *Immunobiology.* déc 2001;204(4):458-65.
94. Arnett FC, Gourh P, Shete S, Ahn CW, Honey RE, Agarwal SK, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis.* mai 2010;69(5):822-7.
95. Gilchrist FC, Bunn C, Foley PJ, Lympany PA, Black CM, Welsh KI, et al. Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP. *Genes Immun.* avr 2001;2(2):76-81.
96. Zhou X, Lee JE, Arnett FC, Xiong M, Park MY, Yoo YK, et al. HLA-DPB1 and DPB2 are genetic loci for systemic sclerosis: a genome-wide association study in Koreans with replication in North Americans. *Arthritis Rheum.* déc 2009;60(12):3807-14.

97. Radstake TRDJ, Gorlova O, Rueda B, Martin J-E, Alizadeh BZ, Palomino-Morales R, et al. Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat Genet.* mai 2010;42(5):426-9.
98. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Fajardy I, Diot E, et al. Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum.* janv 2009;60(1):225-33.
99. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Hikami K, et al. Association of a functional polymorphism in the IRF5 region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* juin 2009;60(6):1845-50.
100. Allanore Y, Saad M, Dieudé P, Avouac J, Distler JHW, Amouyel P, et al. Genome-wide scan identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as novel risk loci for systemic sclerosis. *PLoS Genet.* juill 2011;7(7):e1002091.
101. Gorlova O, Martin J-E, Rueda B, Koeleman BPC, Ying J, Teruel M, et al. Identification of novel genetic markers associated with clinical phenotypes of systemic sclerosis through a genome-wide association strategy. *PLoS Genet.* juill 2011;7(7):e1002178.
102. Arismendi M, Giraud M, Ruzehaji N, Dieudé P, Koumakis E, Ruiz B, et al. Identification of NF- κ B and PLCL2 as new susceptibility genes and highlights on a potential role of IRF8 through interferon signature modulation in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):71.
103. Carmona FD, Gutala R, Simeón CP, Carreira P, Ortego-Centeno N, Vicente-Rabaneda E, et al. Novel identification of the IRF7 region as an anticentromere autoantibody propensity locus in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* janv 2012;71(1):114-9.
104. Broen JCA, Bossini-Castillo L, van Bon L, Vonk MC, Knaapen H, Beretta L, et al. A rare polymorphism in the gene for Toll-like receptor 2 is associated with systemic sclerosis phenotype and increases the production of inflammatory mediators. *Arthritis Rheum.* janv 2012;64(1):264-71.
105. Dieudé P, Bouaziz M, Guedj M, Riemekasten G, Airò P, Müller M, et al. Evidence of the contribution of the X chromosome to systemic sclerosis susceptibility: association with the functional IRAK1 196Phe/532Ser haplotype. *Arthritis Rheum.* déc 2011;63(12):3979-87.
106. Carmona FD, Cénit MC, Diaz-Gallo L-M, Broen JCA, Simeón CP, Carreira PE, et al. New insight on the Xq28 association with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* déc 2013;72(12):2032-8.

107. Dieudé P, Boileau C, Guedj M, Avouac J, Ruiz B, Hachulla E, et al. Independent replication establishes the CD247 gene as a genetic systemic sclerosis susceptibility factor. *Ann Rheum Dis.* sept 2011;70(9):1695-6.
108. Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suárez H, et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum Mol Genet.* 1 juin 2009;18(11):2071-7.
109. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Hachulla E, Diot E, et al. STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum.* août 2009;60(8):2472-9.
110. Gourh P, Agarwal SK, Divecha D, Assassi S, Paz G, Arora-Singh RK, et al. Polymorphisms in TBX21 and STAT4 increase the risk of systemic sclerosis: evidence of possible gene-gene interaction and alterations in Th1/Th2 cytokines. *Arthritis Rheum.* déc 2009;60(12):3794-806.
111. Tsuchiya N, Kawasaki A, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kawaguchi Y, et al. Association of STAT4 polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis.* août 2009;68(8):1375-6.
112. Gourh P, Tan FK, Assassi S, Ahn CW, McNearney TA, Fischbach M, et al. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with anti-topoisomerase I- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* déc 2006;54(12):3945-53.
113. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Hachulla E, Diot E, et al. The PTPN22 620W allele confers susceptibility to systemic sclerosis: findings of a large case-control study of European Caucasians and a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* juill 2008;58(7):2183-8.
114. Diaz-Gallo LM, Gourh P, Broen J, Simeon C, Fonollosa V, Ortego-Centeno N, et al. Analysis of the influence of PTPN22 gene polymorphisms in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* mars 2011;70(3):454-62.
115. Dieudé P, Wipff J, Guedj M, Ruiz B, Melchers I, Hachulla E, et al. BANK1 is a genetic risk factor for diffuse cutaneous systemic sclerosis and has additive effects with IRF5 and STAT4. *Arthritis Rheum.* nov 2009;60(11):3447-54.
116. Rueda B, Gourh P, Broen J, Agarwal SK, Simeon C, Ortego-Centeno N, et al. BANK1 functional variants are associated with susceptibility to diffuse systemic sclerosis in Caucasians. *Ann Rheum Dis.* avr 2010;69(4):700-5.
117. Gourh P, Agarwal SK, Martin E, Divecha D, Rueda B, Bunting H, et al. Association of the C8orf13-BLK region with systemic sclerosis in North-American and European populations. *J Autoimmun.* mars 2010;34(2):155-62.

118. Coustet B, Dieudé P, Guedj M, Bouaziz M, Avouac J, Ruiz B, et al. C8orf13-BLK is a genetic risk locus for systemic sclerosis and has additive effects with BANK1: results from a large french cohort and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* juill 2011;63(7):2091-6.
119. Koumakis E, Bouaziz M, Dieudé P, Ruiz B, Riemekasten G, Airo P, et al. A regulatory variant in CCR6 is associated with susceptibility to antitopoisomerase-positive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* déc 2013;65(12):3202-8.
120. Ochoa E, Martin J-E, Assasi S, Beretta L, Carreira P, Guillén A, et al. Confirmation of CCR6 as a risk factor for anti-topoisomerase I antibodies in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* août 2015;33 Suppl 91(4):31-5.
121. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Riemekasten G, Matucci-Cerinic M, et al. Association of the TNFAIP3 rs5029939 variant with systemic sclerosis in the European Caucasian population. *Ann Rheum Dis.* nov 2010;69(11):1958-64.
122. Koumakis E, Giraud M, Dieudé P, Cohignac V, Cuomo G, Airò P, et al. Brief report: candidate gene study in systemic sclerosis identifies a rare and functional variant of the TNFAIP3 locus as a risk factor for polyautoimmunity. *Arthritis Rheum.* août 2012;64(8):2746-52.
123. Mayes MD, Bossini-Castillo L, Gorlova O, Martin JE, Zhou X, Chen WV, et al. ImmunoChip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. *Am J Hum Genet.* 2 janv 2014;94(1):47-61.
124. Bossini-Castillo L, Martin JE, Broen J, Simeon CP, Beretta L, Gorlova OY, et al. Confirmation of TNIP1 but not RHOB and PSORS1C1 as systemic sclerosis risk factors in a large independent replication study. *Ann Rheum Dis.* avr 2013;72(4):602-7.
125. López-Isac E, Bossini-Castillo L, Guerra SG, Denton C, Fonseca C, Assassi S, et al. Identification of IL12RB1 as a novel systemic sclerosis susceptibility locus. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* déc 2014;66(12):3521-3.
126. López-Isac E, Campillo-Davo D, Bossini-Castillo L, Guerra SG, Assassi S, Simeón CP, et al. Influence of TYK2 in systemic sclerosis susceptibility: a new locus in the IL-12 pathway. *Ann Rheum Dis.* 2 sept 2015;
127. Bossini-Castillo L, Martin J-E, Broen J, Gorlova O, Simeón CP, Beretta L, et al. A GWAS follow-up study reveals the association of the IL12RB2 gene with systemic sclerosis in Caucasian populations. *Hum Mol Genet.* 15 févr 2012;21(4):926-33.
128. Diaz-Gallo L-M, Simeon CP, Broen JC, Ortego-Centeno N, Beretta L, Vonk MC, et al. Implication of IL-2/IL-21 region in systemic sclerosis genetic susceptibility. *Ann Rheum Dis.* juill 2013;72(7):1233-8.

129. Zochling J, Newell F, Charlesworth JC, Leo P, Stankovich J, Cortes A, et al. An ImmunoChip-based interrogation of scleroderma susceptibility variants identifies a novel association at DNASE1L3. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(5):438.
130. Martin J-E, Broen JC, Carmona FD, Teruel M, Simeon CP, Vonk MC, et al. Identification of CSK as a systemic sclerosis genetic risk factor through Genome Wide Association Study follow-up. *Hum Mol Genet.* 15 juin 2012;21(12):2825-35.
131. Del Galdo F, Sotgia F, de Almeida CJ, Jasmin J-F, Musick M, Lisanti MP, et al. Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* sept 2008;58(9):2854-65.
132. Manetti M, Allanore Y, Saad M, Fatini C, Cohignac V, Guiducci S, et al. Evidence for caveolin-1 as a new susceptibility gene regulating tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* juin 2012;71(6):1034-41.
133. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med.* 27 oct 2011;365(17):1612-23.
134. Gardini A, Shiekhattar R. The many faces of long noncoding RNAs. *FEBS J.* mai 2015;282(9):1647-57.
135. Koumakis E, Dieudé P, Avouac J, Kahan A, Allanore Y, Association des Sclérodermiques de France. Familial autoimmunity in systemic sclerosis -- results of a French-based case-control family study. *J Rheumatol.* mars 2012;39(3):532-8.
136. Avouac J, Fürnrohr BG, Tomcik M, Palumbo K, Zerr P, Horn A, et al. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* mars 2011;63(3):800-9.
137. Mitchell AL, Macarthur KDR, Gan EH, Baggott LE, Wolff ASB, Skinningsrud B, et al. Association of autoimmune Addison's disease with alleles of STAT4 and GATA3 in European cohorts. *PloS One.* 2014;9(3):e88991.
138. Elshazli R, Settin A. Association of PTPN22 rs2476601 and STAT4 rs7574865 polymorphisms with rheumatoid arthritis: A meta-analysis update. *Immunobiology.* août 2015;220(8):1012-24.
139. Migita K, Nakamura M, Abiru S, Jiuchi Y, Nagaoka S, Komori A, et al. Association of STAT4 polymorphisms with susceptibility to type-1 autoimmune hepatitis in the Japanese population. *PloS One.* 2013;8(8):e71382.
140. Ji JD, Lee WJ, Kong KA, Woo JH, Choi SJ, Lee YH, et al. Association of STAT4 polymorphism with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* janv 2010;37(1):141-7.

141. Wang C, Sandling JK, Hagberg N, Berggren O, Sigurdsson S, Karlberg O, et al. Genome-wide profiling of target genes for the systemic lupus erythematosus-associated transcription factors IRF5 and STAT4. *Ann Rheum Dis.* janv 2013;72(1):96-103.
142. Avouac J, Elhai M, Tomcik M, Ruiz B, Friese M, Piedavent M, et al. Critical role of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of inflammation-driven dermal fibrosis in a mouse model of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* juin 2013;72(6):1089-98.
143. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity.* juin 1996;4(6):573-81.
144. Maiti AK, Kim-Howard X, Viswanathan P, Guillén L, Qian X, Rojas-Villarraga A, et al. Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatol Oxf Engl.* juill 2010;49(7):1239-44.
145. Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, et al. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun.* janv 2009;10(1):5-10.
146. Du Y, Shen L-X, Yu L-K, Song Y, Zhu J-F, Du R. The CD226 gene in susceptibility of rheumatoid arthritis in the Chinese Han population. *Rheumatol Int.* mai 2012;32(5):1299-304.
147. Deshmukh HA, Maiti AK, Kim-Howard XR, Rojas-Villarraga A, Guthridge JM, Anaya J-M, et al. Evaluation of 19 autoimmune disease-associated loci with rheumatoid arthritis in a Colombian population: evidence for replication and gene-gene interaction. *J Rheumatol.* sept 2011;38(9):1866-70.
148. Elhai M, Chiochia G, Marchiol C, Lager F, Renault G, Colonna M, et al. Targeting CD226/DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in collagen-induced arthritis mouse models. *J Inflamm Lond Engl.* 2015;12:9.
149. Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Jt Bone Spine Rev Rhum.* janv 2013;80(1):23-8.
150. Luo Y, Wang Y, Wang Q, Xiao R, Lu Q. Systemic sclerosis: genetics and epigenetics. *J Autoimmun.* mars 2013;41:161-7.
151. Costenbader KH, Gay S, Alarcón-Riquelme ME, Iaccarino L, Doria A. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmun Rev.* juin 2012;11(8):604-9.

152. Hemmatazad H, Rodrigues HM, Maurer B, Brentano F, Pilecky M, Distler JHW, et al. Histone deacetylase 7, a potential target for the antifibrotic treatment of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* mai 2009;60(5):1519-29.
153. Lei W, Luo Y, Lei W, Luo Y, Yan K, Zhao S, et al. Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis. *Scand J Rheumatol.* 2009;38(5):369-74.
154. Lian X, Xiao R, Hu X, Kanekura T, Jiang H, Li Y, et al. DNA demethylation of CD401 in CD4+ T cells from women with systemic sclerosis: a possible explanation for female susceptibility. *Arthritis Rheum.* juill 2012;64(7):2338-45.
155. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:509-37.
156. Shanahan WR, Korn JH. Cytotoxic activity of sera from scleroderma and other connective tissue diseases. Lack of cellular and disease specificity. *Arthritis Rheum.* déc 1982;25(12):1391-5.
157. Ghatnekar A, Chrobak I, Reese C, Stawski L, Seta F, Wirrig E, et al. Endothelial GATA-6 deficiency promotes pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol.* juin 2013;182(6):2391-406.
158. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet M-E. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* mars 2011;10(5):276-81.
159. Kråling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol.* 1995;63(1):48-56.
160. Ishikawa O, Ishikawa H. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* août 1992;19(8):1202-6.
161. Kraaij MD, van Laar JM. The role of B cells in systemic sclerosis. *Biol Targets Ther.* sept 2008;2(3):389-95.
162. Bosello S, Pers J-O, Rochas C, Devauchelle V, De Santis M, Daridon C, et al. BAFF and rheumatic autoimmune disorders: implications for disease management and therapy. *Int J Immunopathol Pharmacol.* mars 2007;20(1):1-8.
163. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 5 oct 1998;188(7):1359-68.

164. Greeno EW, Bach RR, Moldow CF. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* août 1996;75(2):281-9.
165. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. *Arthritis Rheum.* août 2013;65(8):1953-62.
166. Denton CP, Shi-Wen X, Sutton A, Abraham DJ, Black CM, Pearson JD. Scleroderma fibroblasts promote migration of mononuclear leucocytes across endothelial cell monolayers. *Clin Exp Immunol.* nov 1998;114(2):293-300.
167. Kirk TZ, Mark ME, Chua CC, Chua BH, Mayes MD. 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.* 17 févr 1995;270(7):3423-8.
168. Zvaifler NJ. Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(3):210.
169. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, et al. 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.* nov 2001;44(11):2653-64.
170. Avouac J, Vallucci M, Smith V, Senet P, Ruiz B, Sulli A, et al. Correlations between angiogenic factors and capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(2):R55.
171. Avouac J, Juin F, Wipff J, Couraud PO, Chiochia G, Kahan A, et al. Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity. *Ann Rheum Dis.* oct 2008;67(10):1455-60.
172. Del Papa N, Quirici N, Scavullo C, Gianelli U, Corti L, Vitali C, et al. Antiendothelial cell antibodies induce apoptosis of bone marrow endothelial progenitors in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* oct 2010;37(10):2053-63.
173. Manetti M, Guiducci S, Romano E, Avouac J, Rosa I, Ruiz B, et al. Decreased expression of the endothelial cell-derived factor EGFL7 in systemic sclerosis: potential contribution to impaired angiogenesis and vasculogenesis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R165.
174. Kuwana M, Okazaki Y. Brief report: impaired in vivo neovascularization capacity of endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* mai 2014;66(5):1300-5.

175. Laplante P, Raymond M-A, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM-J, Langelier Y, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 mai 2005;174(9):5740-9.
176. Maurer B, Reich N, Juengel A, Kriegsmann J, Gay RE, Schett G, et al. Fra-2 transgenic mice as a novel model of pulmonary hypertension associated with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. août 2012;71(8):1382-7.
177. Maurer B, Busch N, Jünger A, Pileckyte M, Gay RE, Michel BA, et al. Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation*. 8 déc 2009;120(23):2367-76.
178. Maurer B, Distler A, Suliman YA, Gay RE, Michel BA, Gay S, et al. Vascular endothelial growth factor aggravates fibrosis and vasculopathy in experimental models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. oct 2014;73(10):1880-7.
179. Manetti M, Rosa I, Milia AF, Guiducci S, Carmeliet P, Ibba-Manneschi L, et al. Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? *Ann Rheum Dis*. sept 2014;73(9):1700-9.
180. Manetti M, Rosa I, Fazi M, Guiducci S, Carmeliet P, Ibba-Manneschi L, et al. Systemic sclerosis-like histopathological features in the myocardium of uPAR-deficient mice. *Ann Rheum Dis*. 12 août 2015;
181. Prager GW, Mihaly J, Brunner PM, Koshelnick Y, Hoyer-Hansen G, Binder BR. Urokinase mediates endothelial cell survival via induction of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Blood*. 5 févr 2009;113(6):1383-90.
182. Ho YY, Lagares D, Tager AM, Kapoor M. Fibrosis--a lethal component of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. juill 2014;10(7):390-402.
183. Liu S, Parapuram SK, Leask A. Fibrosis caused by loss of PTEN expression in mouse fibroblasts is crucially dependent on CCN2. *Arthritis Rheum*. nov 2013;65(11):2940-4.
184. van Bon L, Affandi AJ, Broen J, Christmann RB, Marijnissen RJ, Stawski L, et al. Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. *N Engl J Med*. 30 janv 2014;370(5):433-43.
185. Dees C, Akhmetshina A, Zerr P, Reich N, Palumbo K, Horn A, et al. Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J Exp Med*. 9 mai 2011;208(5):961-72.

186. Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl.* oct 2008;47 Suppl 5:v2-4.
187. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JHW. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum.* oct 2010;62(10):2831-44.
188. Shimizu K, Ogawa F, Yoshizaki A, Akiyama Y, Kuwatsuka Y, Okazaki S, et al. Increased serum levels of soluble CD163 in patients with scleroderma. *Clin Rheumatol.* juill 2012;31(7):1059-64.
189. Christmann RB, Sampaio-Barros P, Stifano G, Borges CL, de Carvalho CR, Kairalla R, et al. Association of Interferon- and transforming growth factor β -regulated genes and macrophage activation with systemic sclerosis-related progressive lung fibrosis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* mars 2014;66(3):714-25.
190. Seibold JR, Giorno RC, Claman HN. Dermal mast cell degranulation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* nov 1990;33(11):1702-9.
191. Walker M, Harley R, Maize J, DeLustro F, LeRoy EC. Mast cells and their degranulation in the Tsk mouse model of scleroderma. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* nov 1985;180(2):323-8.
192. Shiota N, Kakizoe E, Shimoura K, Tanaka T, Okunishi H. Effect of mast cell chymase inhibitor on the development of scleroderma in tight-skin mice. *Br J Pharmacol.* juin 2005;145(4):424-31.
193. Yamamoto T, Takahashi Y, Takagawa S, Katayama I, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice. *J Rheumatol.* déc 1999;26(12):2628-34.
194. Hussein MR, Hassan HI, Hofny ERM, Elkholy M, Fatehy NA, Abd Elmoniem AEA, et al. 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.* févr 2005;58(2):178-84.
195. Foerster J, Storch A, Fleischanderl S, Wittstock S, Pfeiffer S, Riemekasten G, et al. Neutrophil respiratory burst is decreased in scleroderma and normalized by near-infrared mediated hyperthermia. *Clin Exp Dermatol.* nov 2006;31(6):799-806.
196. Barnes TC, Spiller DG, Anderson ME, Edwards SW, Moots RJ. Endothelial activation and apoptosis mediated by neutrophil-dependent interleukin 6 trans-signalling: a novel target for systemic sclerosis? *Ann Rheum Dis.* févr 2011;70(2):366-72.

197. Maslen CL, Hall ND, Woolf AD, Maddison PJ. Enhanced oxidative metabolism of neutrophils from patients with systemic sclerosis. *Br J Rheumatol.* avr 1987;26(2):113-7.
198. Stevens TR, Hall ND, McHugh NJ, Maddison PJ. Spontaneous neutrophil activation in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Br J Rheumatol.* déc 1992;31(12):856.
199. Kim D, Peck A, Santer D, Patole P, Schwartz SM, Molitor JA, et al. Induction of interferon-alpha by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I: association of higher interferon-alpha activity with lung fibrosis. *Arthritis Rheum.* juill 2008;58(7):2163-73.
200. Tan FK, Zhou X, Mayes MD, Gourh P, Guo X, Marcum C, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatol Oxf Engl.* juin 2006;45(6):694-702.
201. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum.* mars 2007;56(3):1010-20.
202. Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, Gourh P, Agarwal SK, McNearney TA, et al. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum.* févr 2010;62(2):589-98.
203. O'Reilly S. Innate immunity in systemic sclerosis pathogenesis. *Clin Sci Lond Engl* 1979. mars 2014;126(5):329-37.
204. Bhattacharyya S, Kelley K, Melichian DS, Tamaki Z, Fang F, Su Y, et al. Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor- β responses: a novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *Am J Pathol.* janv 2013;182(1):192-205.
205. Palumbo K, Zerr P, Tomcik M, Vollath S, Dees C, Akhmetshina A, et al. The transcription factor JunD mediates transforming growth factor {beta}-induced fibroblast activation and fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* juill 2011;70(7):1320-6.
206. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim J-Y, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 27 févr 2004;279(9):7370-7.

207. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol.* mars 1992;166(3):255-63.
208. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Yanaba K, Hayakawa I, et al. Serum soluble CTLA-4 levels are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl.* oct 2004;43(10):1261-6.
209. Gustafsson R, Tötterman TH, Klareskog L, Hällgren R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* janv 1990;49(1):40-5.
210. Lambert N-C. [Microchimerism in scleroderma: ten years later]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Francaise Médecine Interne.* juill 2010;31(7):523-9.
211. Scharffetter K, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization. *Eur J Clin Invest.* févr 1988;18(1):9-17.
212. Kähäri VM, Sandberg M, Kalimo H, Vuorio T, Vuorio E. Identification of fibroblasts responsible for increased collagen production in localized scleroderma by in situ hybridization. *J Invest Dermatol.* mai 1988;90(5):664-70.
213. Hoffmann KF, McCarty TC, Segal DH, Chiaramonte M, Hesse M, Davis EM, et al. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* nov 2001;15(13):2545-7.
214. Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 oct 2003;171(7):3655-67.
215. Salmon-Ehr V, Serpier H, Nawrocki B, Gillery P, Clavel C, Kalis B, et al. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Arch Dermatol.* juill 1996;132(7):802-6.
216. Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, et al. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol.* déc 1997;151(6):1751-8.
217. Scaletti C, Vultaggio A, Bonifacio S, Emmi L, Torricelli F, Maggi E, et al. Th2-oriented profile of male offspring T cells present in women with systemic sclerosis and reactive with maternal major histocompatibility complex antigens. *Arthritis Rheum.* févr 2002;46(2):445-50.

218. Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer J-M, Roosnek E, Chizzolini C. 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.* oct 2007;56(10):3459-67.
219. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* août 2004;4(8):583-94.
220. Aliprantis AO, Wang J, Fathman JW, Lemaire R, Dorfman DM, Lafyatis R, et al. Transcription factor T-bet regulates skin sclerosis through its function in innate immunity and via IL-13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 févr 2007;104(8):2827-30.
221. Fuschiotti P, Medsger TA, Morel PA. Effector CD8+ T cells in systemic sclerosis patients produce abnormally high levels of interleukin-13 associated with increased skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* avr 2009;60(4):1119-28.
222. O'Reilly S. Role of interleukin-13 in fibrosis, particularly systemic sclerosis. *BioFactors Oxf Engl.* déc 2013;39(6):593-6.
223. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J Rheumatol.* févr 2006;33(2):275-84.
224. Brembilla NC, Chizzolini C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. *Eur Cytokine Netw.* déc 2012;23(4):128-39.
225. Truchetet M-E, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R166.
226. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* janv 1992;35(1):67-72.
227. Komura K, Fujimoto M, Hasegawa M, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. Increased serum interleukin 23 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* janv 2008;35(1):120-5.
228. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* nov 2000;43(11):2455-63.

229. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *J Dermatol Sci.* juin 2008;50(3):240-2.
230. Truchetet M-E, Brembilla N-C, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S, et al. Interleukin-17A+ cell counts are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated with the extent of skin involvement. *Arthritis Rheum.* mai 2013;65(5):1347-56.
231. Mi S, Li Z, Yang H-Z, Liu H, Wang J-P, Ma Y-G, et al. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta1-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 sept 2011;187(6):3003-14.
232. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis Rheum.* nov 2012;64(11):3726-35.
233. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med.* 15 mars 2010;207(3):535-52.
234. Brembilla NC, Montanari E, Truchetet M-E, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R151.
235. Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, Valente AJ, Steffensen B, Vincenti M, et al. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta, NF-kappaB, and AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* déc 2007;293(6):H3356-65.
236. Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *J Rheumatol.* mars 2008;35(3):515-9.
237. Antiga E, Quaglino P, Bellandi S, Volpi W, Del Bianco E, Comessatti A, et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea. *Br J Dermatol.* mai 2010;162(5):1056-63.
238. Banica L, Besliu A, Pistol G, Stavaru C, Ionescu R, Forsea A-M, et al. Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases. *Autoimmunity.* janv 2009;42(1):41-9.

239. Papp G, Horvath IF, Barath S, Gyimesi E, Sipka S, Szodoray P, et al. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol*. mai 2011;40(3):205-10.
240. Fenoglio D, Battaglia F, Parodi A, Stringara S, Negrini S, Panico N, et al. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. *Clin Immunol Orlando Fla*. juin 2011;139(3):249-57.
241. Brembilla NC, Chizzolini C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. *Eur Cytokine Netw*. déc 2012;23(4):128-39.
242. Kataoka H, Yasuda S, Fukaya S, Oku K, Horita T, Atsumi T, et al. Decreased expression of Runx1 and lowered proportion of Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in systemic sclerosis. *Mod Rheumatol Jpn Rheum Assoc*. janv 2015;25(1):90-5.
243. Fenoglio D, Battaglia F, Parodi A, Stringara S, Negrini S, Panico N, et al. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. *Clin Immunol Orlando Fla*. juin 2011;139(3):249-57.
244. Mathian A, Parizot C, Dorgham K, Trad S, Arnaud L, Larsen M, et al. Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Ann Rheum Dis*. juill 2012;71(7):1227-34.
245. MacDonald KG, Dawson NAJ, Huang Q, Dunne JV, Levings MK, Broady R. Regulatory T cells produce profibrotic cytokines in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2015;135(4):946-55.e9.
246. Jaffee BD, Claman HN. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell Immunol*. 1 avr 1983;77(1):1-12.
247. McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 nov 1999;163(10):5693-9.
248. Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 mars 2002;168(6):3088-98.
249. Zhang Y, McCormick LL, Gilliam AC. Latency-associated peptide prevents skin fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma. *J Invest Dermatol*. oct 2003;121(4):713-9.
250. Ong C, Wong C, Roberts CR, Teh HS, Jirik FR. Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma. *Eur J Immunol*. sept 1998;28(9):2619-29.

251. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol.* avr 1999;112(4):456-62.
252. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. IV: induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell independent. *J Invest Dermatol.* oct 2001;117(4):999-1001.
253. Dodig TD, Mack KT, Cassarino DF, Clark SH. Development of the tight-skin phenotype in immune-deficient mice. *Arthritis Rheum.* mars 2001;44(3):723-7.
254. Siracusa LD, McGrath R, Fisher JK, Jimenez SA. The mouse tight skin (Tsk) phenotype is not dependent on the presence of mature T and B lymphocytes. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* nov 1998;9(11):907-9.
255. Lafyatis R, O'Hara C, Feghali-Bostwick CA, Matteson E. B cell infiltration in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* sept 2007;56(9):3167-8.
256. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi J-T, Pergamenschikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 oct 2003;100(21):12319-24.
257. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 déc 2000;165(11):6635-43.
258. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Koder M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum.* janv 2006;54(1):192-201.
259. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol.* juin 2008;172(6):1650-63.
260. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest.* juin 2002;109(11):1453-62.
261. Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, Bouaziz J-D, Uchida J, Fujimoto M, et al. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. *Am J Pathol.* sept 2006;169(3):954-66.
262. Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, Matsushita Y, Komura K, Ogawa F, et al. BAFF antagonist attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Invest Dermatol.* déc 2007;127(12):2772-80.

263. Komura K, Fujimoto M, Yanaba K, Matsushita T, Matsushita Y, Horikawa M, et al. Blockade of CD40/CD40 ligand interactions attenuates skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *Ann Rheum Dis.* juin 2008;67(6):867-72.
264. Cepeda EJ, Reveille JD. Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. *Curr Opin Rheumatol.* nov 2004;16(6):723-32.
265. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* déc 2008;58(12):3902-12.
266. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* mai 2003;48(5):1363-73.
267. Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mai 2009;182(9):5855-64.
268. Hénault J, Tremblay M, Clément I, Raymond Y, Sénécal J-L. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* oct 2004;50(10):3265-74.
269. Hénault J, Robitaille G, Sénécal J-L, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* mars 2006;54(3):963-73.
270. Arcand J, Robitaille G, Koenig M, Sénécal J-L, Raymond Y. The autoantigen DNA topoisomerase I interacts with chemokine receptor 7 and exerts cytokine-like effects on dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* mars 2012;64(3):826-34.
271. Arcand J, Robitaille G, Koenig M, Sénécal J-L, Raymond Y. Heparin inhibits the interaction of DNA topoisomerase I/anti-topoisomerase I immune complexes with heparan sulfate on dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* mai 2012;64(5):1632-41.
272. Robitaille G, Hénault J, Christin M-S, Sénécal J-L, Raymond Y. The nuclear autoantigen CENP-B displays cytokine-like activities toward vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum.* nov 2007;56(11):3814-26.
273. Robitaille G, Christin M-S, Clément I, Sénécal J-L, Raymond Y. Nuclear autoantigen CENP-B transactivation of the epidermal growth factor receptor via chemokine receptor 3 in vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum.* sept 2009;60(9):2805-16.

274. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* juin 2002;46(6):1602-13.
275. Fineschi S, Goffin L, Rezzonico R, Cozzi F, Dayer J-M, Meroni PL, et al. Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. *Arthritis Rheum.* déc 2008;58(12):3913-23.
276. Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ, Milford Ward A, Greaves M, Hughes P. Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Clin Exp Immunol.* déc 1996;106(3):491-7.
277. Ronda N, Gatti R, Giacosa R, Raschi E, Testoni C, Meroni PL, et al. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum.* juin 2002;46(6):1595-601.
278. Svegliati S, Olivieri A, Campelli N, Luchetti M, Poloni A, Trappolini S, et al. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 1 juill 2007;110(1):237-41.
279. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 22 juin 2006;354(25):2667-76.
280. Dragun D, Distler JHW, Riemekasten G, Distler O. Stimulatory autoantibodies to platelet-derived growth factor receptors in systemic sclerosis: what functional autoimmunity could learn from receptor biology. *Arthritis Rheum.* avr 2009;60(4):907-11.
281. Classen J-F, Henrohn D, Rorsman F, Lennartsson J, Lauwerys BR, Wikström G, et al. Lack of evidence of stimulatory autoantibodies to platelet-derived growth factor receptor in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* avr 2009;60(4):1137-44.
282. Tan FK, Arnett FC, Antohi S, Saito S, Mirarchi A, Spiera H, et al. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin-1, in patients with scleroderma and other connective tissue diseases. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 juill 1999;163(2):1066-72.
283. Murai C, Saito S, Kasturi KN, Bona CA. Spontaneous occurrence of anti-fibrillin-1 autoantibodies in tight-skin mice. *Autoimmunity.* 1998;28(3):151-5.
284. Zhou X, Tan FK, Milewicz DM, Guo X, Bona CA, Arnett FC. Autoantibodies to fibrillin-1 activate normal human fibroblasts in culture through the TGF-beta pathway to

- recapitulate the « scleroderma phenotype ». *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 oct 2005;175(7):4555-60.
285. Negi VS, Tripathy NK, Misra R, Nityanand S. Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. *J Rheumatol.* mars 1998;25(3):462-6.
286. Mihai C, Tervaert JWC. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* févr 2010;69(2):319-24.
287. Riccieri V, Germano V, Alessandri C, Vasile M, Ceccarelli F, Sciarra I, et al. More severe nailfold capillaroscopy findings and anti-endothelial cell antibodies. Are they useful tools for prognostic use in systemic sclerosis? *Clin Exp Rheumatol.* déc 2008;26(6):992-7.
288. Corallo C, Franci B, Lucani B, Montella A, Chirico C, Gonnelli S, et al. From microvasculature to fibroblasts: Contribution of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* mars 2015;28(1):93-103.
289. Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* avr 2003;120(4):542-7.
290. Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, Komura K, Hasegawa M, Takehara K, et al. Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* nov 2004;138(2):357-63.
291. Avouac J, Riemekasten G, Meune C, Ruiz B, Kahan A, Allanore Y. Autoantibodies against Endothelin 1 Type A Receptor Are Strong Predictors of Digital Ulcers in Systemic Sclerosis. *J Rheumatol.* 1 août 2015;
292. Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, et al. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 oct 2014;190(7):808-17.
293. Fleming JN, Nash RA, McLeod DO, Fiorentino DF, Shulman HM, Connolly MK, et al. Capillary regeneration in scleroderma: stem cell therapy reverses phenotype? *PloS One.* 2008;3(1):e1452.
294. Daley E, Emson C, Guignabert C, de Waal Malefyt R, Louten J, Kurup VP, et al. Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *J Exp Med.* 18 févr 2008;205(2):361-72.
295. Iannone F, Riccardi MT, Guiducci S, Bizzoca R, Cinelli M, Matucci-Cerinic M, et al. Bosentan regulates the expression of adhesion molecules on circulating T cells and

- serum soluble adhesion molecules in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Rheum Dis.* août 2008;67(8):1121-6.
296. Castellino FV, Varga J. Emerging cellular and molecular targets in fibrosis: implications for scleroderma pathogenesis and targeted therapy. *Curr Opin Rheumatol.* nov 2014;26(6):607-14.
297. Guilbert T, Odin C, Le Grand Y, Gailhouste L, Turlin B, Ezan F, et al. A robust collagen scoring method for human liver fibrosis by second harmonic microscopy. *Opt Express.* 6 déc 2010;18(25):25794-807.
298. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol.* janv 2012;8(1):42-54.
299. Varga JA, Trojanowska M. Fibrosis in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* févr 2008;34(1):115-43; vii.
300. Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* juill 2001;44(7):1667-76.
301. Wong VW, Rustad KC, Akaishi S, Sorkin M, Glotzbach JP, Januszyk M, et al. Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling. *Nat Med.* janv 2012;18(1):148-52.
302. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Constitutive phosphorylation of focal adhesion kinase is involved in the myofibroblast differentiation of scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol.* mai 2005;124(5):886-92.
303. Altorok N, Tsou P-S, Coit P, Khanna D, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Ann Rheum Dis.* 8 mai 2014;
304. Wang Y, Fan P-S, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* juill 2006;54(7):2271-9.
305. Noda S, Asano Y, Nishimura S, Taniguchi T, Fujiu K, Manabe I, et al. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun.* 2014;5:5797.
306. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* avr 2012;180(4):1340-55.

307. Hu B, Gharaee-Kermani M, Wu Z, Phan SH. Essential role of MeCP2 in the regulation of myofibroblast differentiation during pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* avr 2011;178(4):1500-8.
308. Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, et al. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 mars 2002;99(6):3908-13.
309. Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med.* mai 2010;16(5):544-50.
310. Ghosh AK, Mori Y, Dowling E, Varga J. Trichostatin A blocks TGF-beta-induced collagen gene expression in skin fibroblasts: involvement of Sp1. *Biochem Biophys Res Commun.* 9 mars 2007;354(2):420-6.
311. Huber LC, Distler JHW, Moritz F, Hemmatazad H, Hauser T, Michel BA, et al. Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* août 2007;56(8):2755-64.
312. Holmes A, Abraham DJ, Chen Y, Denton C, Shi-wen X, Black CM, et al. Constitutive connective tissue growth factor expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *J Biol Chem.* 24 oct 2003;278(43):41728-33.
313. Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* juin 2010;62(6):1733-43.
314. Cushing L, Kuang PP, Qian J, Shao F, Wu J, Little F, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* août 2011;45(2):287-94.
315. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 sept 2008;105(35):13027-32.
316. Iwamoto N, Vettori S, Maurer B, Brock M, Pachera E, Jüngel A, et al. Downregulation of miR-193b in systemic sclerosis regulates the proliferative vasculopathy by urokinase-type plasminogen activator expression. *Ann Rheum Dis.* 10 nov 2014;
317. Mann J, Chu DCK, Maxwell A, Oakley F, Zhu N-L, Tsukamoto H, et al. MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology.* févr 2010;138(2):705-14, 714.e1-4.

318. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med.* 2 août 2010;207(8):1589-97.
319. Zhu H, Luo H, Li Y, Zhou Y, Jiang Y, Chai J, et al. MicroRNA-21 in scleroderma fibrosis and its function in TGF- β -regulated fibrosis-related genes expression. *J Clin Immunol.* août 2013;33(6):1100-9.
320. Bhattacharyya S, Wu M, Fang F, Tourtellotte W, Feghali-Bostwick C, Varga J. Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* mai 2011;30(4):235-42.
321. Svegliati S, Canello R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G, et al. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem.* 28 oct 2005;280(43):36474-82.
322. Amico D, Spadoni T, Rovinelli M, Serafini M, D'Amico G, Campelli N, et al. Intracellular free radical production by peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis: role of NADPH oxidase and ERK1/2. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:68.
323. Dees C, Tomcik M, Zerr P, Akhmetshina A, Horn A, Palumbo K, et al. Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* juill 2011;70(7):1304-10.
324. Nosedà M, Fu Y, Niessen K, Wong F, Chang L, McLean G, et al. Smooth Muscle α -actin is a direct target of Notch/CSL. *Circ Res.* 23 juin 2006;98(12):1468-70.
325. Liu T, Hu B, Choi YY, Chung M, Ullenbruch M, Yu H, et al. Notch1 signaling in FIZZ1 induction of myofibroblast differentiation. *Am J Pathol.* mai 2009;174(5):1745-55.
326. Dees C, Zerr P, Tomcik M, Beyer C, Horn A, Akhmetshina A, et al. Inhibition of Notch signaling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum.* mai 2011;63(5):1396-404.
327. Gardner H, Shearstone JR, Bandaru R, Crowell T, Lynes M, Trojanowska M, et al. Gene profiling of scleroderma skin reveals robust signatures of disease that are imperfectly reflected in the transcript profiles of explanted fibroblasts. *Arthritis Rheum.* juin 2006;54(6):1961-73.
328. Wei J, Fang F, Lam AP, Sargent JL, Hamburg E, Hinchcliff ME, et al. Wnt/ β -catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells. *Arthritis Rheum.* août 2012;64(8):2734-45.

329. Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R, et al. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum.* juin 2011;63(6):1707-17.
330. Maurer B, Distler A, Dees C, Khan K, Denton CP, Abraham D, et al. Levels of target activation predict antifibrotic responses to tyrosine kinase inhibitors. *Ann Rheum Dis.* déc 2013;72(12):2039-46.
331. Zerr P, Distler A, Palumbo-Zerr K, Tomcik M, Vollath S, Dees C, et al. Combined inhibition of c-Abl and PDGF receptors for prevention and treatment of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Am J Pathol.* nov 2012;181(5):1672-80.
332. Prey S, Ezzedine K, Doussau A, Grandoulier A-S, Barcat D, Chatelus E, et al. Imatinib mesylate in scleroderma-associated diffuse skin fibrosis: a phase II multicentre randomized double-blinded controlled trial. *Br J Dermatol.* nov 2012;167(5):1138-44.
333. Pope J, McBain D, Petrlich L, Watson S, Vanderhoek L, de Leon F, et al. Imatinib in active diffuse cutaneous systemic sclerosis: Results of a six-month, randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept pilot study at a single center. *Arthritis Rheum.* nov 2011;63(11):3547-51.
334. Kapoor M, McCann M, Liu S, Huh K, Denton CP, Abraham DJ, et al. Loss of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in mouse fibroblasts results in increased susceptibility to bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* sept 2009;60(9):2822-9.
335. Palumbo-Zerr K, Zerr P, Distler A, Fliehr J, Mancuso R, Huang J, et al. Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- β signaling and fibrosis. *Nat Med.* févr 2015;21(2):150-8.
336. Hu B, Wu YM, Wu Z, Phan SH. Nkx2.5/Csx represses myofibroblast differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* févr 2010;42(2):218-26.
337. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* mars 2007;117(3):557-67.
338. Distler JHW, Jünger A, Pileckyte M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, et al. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* déc 2007;56(12):4203-15.
339. Marangoni RG, Korman BD, Wei J, Wood TA, Graham LV, Whitfield ML, et al. Myofibroblasts in Murine Cutaneous Fibrosis Originate From Adiponectin-Positive Intra-dermal Progenitors: Adipocyte-Myofibroblast Transition in Skin Fibrosis. *Arthritis Rheumatol.* avr 2015;67(4):1062-73.

340. Tanjore H, Lawson WE, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress as a pro-fibrotic stimulus. *Biochim Biophys Acta*. juill 2013;1832(7):940-7.
341. Lenna S, Trojanowska M. The role of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in fibrosis. *Curr Opin Rheumatol*. nov 2012;24(6):663-8.
342. Castello-Cros R, Whitaker-Menezes D, Molchansky A, Purkins G, Soslowsky LJ, Beason DP, et al. Scleroderma-like properties of skin from caveolin-1-deficient mice: implications for new treatment strategies in patients with fibrosis and systemic sclerosis. *Cell Cycle Georget Tex*. 1 juill 2011;10(13):2140-50.
343. Wrighton KH, Lin X, Feng X-H. Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 juill 2008;105(27):9244-9.
344. Tomcik M, Zerr P, Pitkowski J, Palumbo-Zerr K, Avouac J, Distler O, et al. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis. *Ann Rheum Dis*. juin 2014;73(6):1215-22.
345. Milano A, Pendergrass SA, Sargent JL, George LK, McCalmont TH, Connolly MK, et al. Molecular subsets in the gene expression signatures of scleroderma skin. *PloS One*. 2008;3(7):e2696.
346. Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, Keene DR, He R, Adams HP, et al. Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum*. janv 2007;56(1):334-44.
347. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 nov 2010;107(46):20009-14.
348. Zhou F, Drabsch Y, Dekker TJA, de Vinuesa AG, Li Y, Hawinkels LJAC, et al. Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling. *Nat Commun*. 2014;5:3388.
349. Rice LM, Padilla CM, McLaughlin SR, Mathes A, Ziemek J, Goummih S, et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J Clin Invest*. 1 juill 2015;125(7):2795-807.
350. Varga J, Pasche B. Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. avr 2009;5(4):200-6.

351. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Haberberger T, Kelly M, Robertson J, et al. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 oct 2003;168(7):770-8.
352. Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, Naff K, Van Pelt CS, Nakamura H, et al. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* mai 2010;62(5):1523-32.
353. Liu S, Shi-wen X, Abraham DJ, Leask A. CCN2 is required for bleomycin-induced skin fibrosis in mice. *Arthritis Rheum.* janv 2011;63(1):239-46.
354. Ludwicka A, Ohba T, Trojanowska M, Yamakage A, Strange C, Smith EA, et al. Elevated levels of platelet derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma. *J Rheumatol.* oct 1995;22(10):1876-83.
355. Olson LE, Soriano P. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell.* févr 2009;16(2):303-13.
356. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* oct 2001;27(2):140-6.
357. Khan K, Xu S, Nihtyanova S, Derrett-Smith E, Abraham D, Denton CP, et al. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* juill 2012;71(7):1235-42.
358. Kitaba S, Murota H, Terao M, Azukizawa H, Terabe F, Shima Y, et al. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol.* janv 2012;180(1):165-76.
359. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis Rheum.* nov 2011;63(11):3575-85.
360. Desallais L, Avouac J, Fréchet M, Elhai M, Ratsimandresy R, Montes M, et al. Targeting IL-6 by both passive or active immunization strategies prevents bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(4):R157.
361. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Xu SW, et al. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol.* sept 1997;151(3):831-41.

362. Xu S, Howat SL, Renzoni EA, Holmes A, Pearson JD, Dashwood MR, et al. Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK. *J Biol Chem.* 28 mai 2004;279(22):23098-103.
363. Castelino FV, Seiders J, Bain G, Brooks SF, King CD, Swaney JS, et al. Amelioration of dermal fibrosis by genetic deletion or pharmacologic antagonism of lysophosphatidic acid receptor 1 in a mouse model of scleroderma. *Arthritis Rheum.* mai 2011;63(5):1405-15.
364. Ohashi T, Yamamoto T. Antifibrotic effect of lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 antagonist on experimental murine scleroderma induced by bleomycin. *Exp Dermatol.* sept 2015;24(9):698-702.
365. Leask A. Thrombin-induced CCN2 expression as a target for anti-fibrotic therapy in scleroderma. *J Cell Commun Signal.* juin 2010;4(2):111-2.
366. Hernández-Rodríguez NA, Cambrey AD, Harrison NK, Chambers RC, Gray AJ, Southcott AM, et al. Role of thrombin in pulmonary fibrosis. *Lancet Lond Engl.* 21 oct 1995;346(8982):1071-3.
367. Atanelishvili I, Liang J, Akter T, Spyropoulos DD, Silver RM, Bogatkevich GS. Thrombin increases lung fibroblast survival while promoting alveolar epithelial cell apoptosis via the endoplasmic reticulum stress marker, CCAAT enhancer-binding homologous protein. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mai 2014;50(5):893-902.
368. Bogatkevich GS, Tourkina E, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem.* 30 nov 2001;276(48):45184-92.
369. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Silver RM. Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, demonstrates antifibrotic effects on lung fibroblasts. *Arthritis Rheum.* nov 2009;60(11):3455-64.
370. Biondi ML, Marasini B, Bianchi E, Agostoni A. Plasma free and intraplatelet serotonin in patients with Raynaud's phenomenon. *Int J Cardiol.* juin 1988;19(3):335-9.
371. Welsh DJ, Harnett M, MacLean M, Peacock AJ. Proliferation and signaling in fibroblasts: role of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor and transporter. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 août 2004;170(3):252-9.
372. Fabre A, Marchal-Sommé J, Marchand-Adam S, Quesnel C, Borie R, Dehoux M, et al. Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by serotonin receptor antagonists in mice. *Eur Respir J.* août 2008;32(2):426-36.

373. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* juill 1999;117(1):159-65.
374. Yamamoto T, Eckes B, Hartmann K, Krieg T. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the lesional skin of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* juin 2001;26(2):133-9.
375. Galindo M, Santiago B, Rivero M, Rullas J, Alcamí J, Pablos JL. Chemokine expression by systemic sclerosis fibroblasts: abnormal regulation of monocyte chemoattractant protein 1 expression. *Arthritis Rheum.* juin 2001;44(6):1382-6.
376. Yamamoto T, Nishioka K. Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol.* sept 2003;121(3):510-6.
377. Solans R, Motta C, Solá R, La Ville AE, Lima J, Simeón P, et al. Abnormalities of erythrocyte membrane fluidity, lipid composition, and lipid peroxidation in systemic sclerosis: evidence of free radical-mediated injury. *Arthritis Rheum.* avr 2000;43(4):894-900.
378. Allanore Y, Borderie D, Lemaréchal H, Ekindjian OG, Kahan A. Acute and sustained effects of dihydropyridine-type calcium channel antagonists on oxidative stress in systemic sclerosis. *Am J Med.* 1 mai 2004;116(9):595-600.
379. Sambo P, Jannino L, Candela M, Salvi A, Donini M, Dusi S, et al. Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. *J Invest Dermatol.* janv 1999;112(1):78-84.
380. Allanore Y, Borderie D, Périanin A, Lemaréchal H, Ekindjian OG, Kahan A. Nifedipine protects against overproduction of superoxide anion by monocytes from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R93-100.
381. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med.* 7 mai 2009;360(19):1989-2003.
382. Avouac J, Borderie D, Ekindjian OG, Kahan A, Allanore Y. High DNA oxidative damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* déc 2010;37(12):2540-7.
383. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med.* sept 2009;15(9):1077-81.

384. Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *HepatoL Baltim Md.* avr 2008;47(4):1394-400.
385. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech.* 5 janv 2010;43(1):146-55.
386. Georges PC, Hui J-J, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, et al. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* déc 2007;293(6):G1147-54.
387. Buscemi L, Ramonet D, Klingberg F, Formey A, Smith-Clerc J, Meister J-J, et al. The single-molecule mechanics of the latent TGF- β 1 complex. *Curr Biol CB.* 20 déc 2011;21(24):2046-54.
388. Wipff P-J, Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *Eur J Cell Biol.* sept 2008;87(8-9):601-15.
389. Meyringer R, Neumann E, Judex M, Landthaler M, Kullmann F, Scholmerich J, et al. Analysis of gene expression patterns in systemic sclerosis fibroblasts using RNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction for differential display. *J Rheumatol.* avr 2007;34(4):747-53.
390. Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, McCauley S, Rodriguez HM, Oyasu M, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med.* sept 2010;16(9):1009-17.
391. Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep.* févr 2010;11(2):97-105.
392. Gerber EE, Gallo EM, Fontana SC, Davis EC, Wigley FM, Huso DL, et al. Integrin-modulating therapy prevents fibrosis and autoimmunity in mouse models of scleroderma. *Nature.* 7 nov 2013;503(7474):126-30.
393. Menton DN, Hess RA, Lichtenstein JR, Eisen A. The structure and tensile properties of the skin of tight-skin (Tsk) mutant mice. *J Invest Dermatol.* janv 1978;70(1):4-10.
394. Menton DN, Hess RA. The ultrastructure of collagen in the dermis of tight-skin (Tsk) mutant mice. *J Invest Dermatol.* mars 1980;74(3):139-47.
395. Eferl R, Hasselblatt P, Rath M, Popper H, Zenz R, Komnenovic V, et al. Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 juill 2008;105(30):10525-30.

396. Venalis P, Kumánovics G, Schulze-Koops H, Distler A, Dees C, Zerr P, et al. Cardiomyopathy in murine models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. févr 2015;67(2):508-16.
397. Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, Sugamura K. OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv Immunol*. 2010;105:63-98.
398. Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev*. mai 2009;229(1):173-91.
399. Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol*. juin 2004;4(6):420-31.
400. Kashiwakura J, Yokoi H, Saito H, Okayama Y. T cell proliferation by direct cross-talk between OX40 ligand on human mast cells and OX40 on human T cells: comparison of gene expression profiles between human tonsillar and lung-cultured mast cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 oct 2004;173(8):5247-57.
401. Weinberg AD, Wegmann KW, Funatake C, Whitham RH. Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 févr 1999;162(3):1818-26.
402. Gwyer Findlay E, Danks L, Madden J, Cavanagh MM, McNamee K, McCann F, et al. OX40L blockade is therapeutic in arthritis, despite promoting osteoclastogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 févr 2014;111(6):2289-94.
403. Soroosh P, Ine S, Sugamura K, Ishii N. OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 mai 2006;176(10):5975-87.
404. Imura A, Hori T, Imada K, Ishikawa T, Tanaka Y, Maeda M, et al. The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells. *J Exp Med*. 1 mai 1996;183(5):2185-95.
405. Matsumura Y, Hori T, Kawamata S, Imura A, Uchiyama T. Intracellular signaling of gp34, the OX40 ligand: induction of c-jun and c-fos mRNA expression through gp34 upon binding of its receptor, OX40. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 sept 1999;163(6):3007-11.
406. Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, et al. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 mars 2004;172(6):3580-9.

407. Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity*. sept 2001;15(3):445-55.
408. Toennies HM, Green JM, Arch RH. Expression of CD30 and OX40 on T lymphocyte subsets is controlled by distinct regulatory mechanisms. *J Leukoc Biol*. févr 2004;75(2):350-7.
409. Redmond WL, Ruby CE, Weinberg AD. The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Crit Rev Immunol*. 2009;29(3):187-201.
410. Verdeil G, Puthier D, Nguyen C, Schmitt-Verhulst A-M, Auphan-Anezin N. STAT5-mediated signals sustain a TCR-initiated gene expression program toward differentiation of CD8 T cell effectors. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 avr 2006;176(8):4834-42.
411. Song J, Salek-Ardakani S, Rogers PR, Cheng M, Van Parijs L, Croft M. The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nat Immunol*. févr 2004;5(2):150-8.
412. Song J, So T, Cheng M, Tang X, Croft M. Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity*. mai 2005;22(5):621-31.
413. Song J, So T, Croft M. Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 juin 2008;180(11):7240-8.
414. Webb GJ, Hirschfield GM, Lane PJJ. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 28 juill 2015;
415. Weatherill AR, Maxwell JR, Takahashi C, Weinberg AD, Vella AT. OX40 ligation enhances cell cycle turnover of Ag-activated CD4 T cells in vivo. *Cell Immunol*. 10 avr 2001;209(1):63-75.
416. Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, Takeda K, Nohara C, Futagawa T, et al. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J Exp Med*. 17 janv 2000;191(2):375-80.
417. Ishii N, Ndhlovu LC, Murata K, Sato T, Kamanaka M, Sugamura K. OX40 (CD134) and OX40 ligand interaction plays an adjuvant role during in vivo Th2 responses. *Eur J Immunol*. sept 2003;33(9):2372-81.
418. Seshasayee D, Lee WP, Zhou M, Shu J, Suto E, Zhang J, et al. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest*. déc 2007;117(12):3868-78.

419. Ito T, Wang Y-H, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med*. 7 nov 2005;202(9):1213-23.
420. Zhang Z, Zhong W, Hinrichs D, Wu X, Weinberg A, Hall M, et al. Activation of OX40 augments Th17 cytokine expression and antigen-specific uveitis. *Am J Pathol*. déc 2010;177(6):2912-20.
421. Xiao X, Balasubramanian S, Liu W, Chu X, Wang H, Taparowsky EJ, et al. OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat Immunol*. oct 2012;13(10):981-90.
422. Li J, Li L, Shang X, Benson J, Merle Elloso M, Schantz A, et al. Negative regulation of IL-17 production by OX40/OX40L interaction. *Cell Immunol*. juin 2008;253(1-2):31-7.
423. So T, Croft M. Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+Foxp3+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2007;179(3):1427-30.
424. Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, et al. OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood*. 1 oct 2007;110(7):2501-10.
425. Xiao X, Kroemer A, Gao W, Ishii N, Demirci G, Li XC. OX40/OX40L costimulation affects induction of Foxp3+ regulatory T cells in part by expanding memory T cells in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 sept 2008;181(5):3193-201.
426. Duan W, So T, Croft M. Antagonism of airway tolerance by endotoxin/lipopolysaccharide through promoting OX40L and suppressing antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 déc 2008;181(12):8650-9.
427. Valzasina B, Guiducci C, Dislich H, Killeen N, Weinberg AD, Colombo MP. Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood*. 1 avr 2005;105(7):2845-51.
428. Ruby CE, Yates MA, Hirschhorn-Cymerman D, Chlebeck P, Wolchok JD, Houghton AN, et al. Cutting Edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 oct 2009;183(8):4853-7.
429. Murata K, Nose M, Ndhlovu LC, Sato T, Sugamura K, Ishii N. Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 oct 2002;169(8):4628-36.

430. Weinberg AD, Wallin JJ, Jones RE, Sullivan TJ, Bourdette DN, Vandenbark AA, et al. Target organ-specific up-regulation of the MRC OX-40 marker and selective production of Th1 lymphokine mRNA by encephalitogenic T helper cells isolated from the spinal cord of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 mai 1994;152(9):4712-21.
431. Weinberg AD, Bourdette DN, Sullivan TJ, Lemon M, Wallin JJ, Maziarz R, et al. Selective depletion of myelin-reactive T cells with the anti-OX-40 antibody ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* févr 1996;2(2):183-9.
432. Ndhlovu LC, Ishii N, Murata K, Sato T, Sugamura K. Critical involvement of OX40 ligand signals in the T cell priming events during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 sept 2001;167(5):2991-9.
433. Pakala SV, Bansal-Pakala P, Halteman BS, Croft M. Prevention of diabetes in NOD mice at a late stage by targeting OX40/OX40 ligand interactions. *Eur J Immunol.* nov 2004;34(11):3039-46.
434. Blazar BR, Sharpe AH, Chen AI, Panoskaltsis-Mortari A, Lees C, Akiba H, et al. Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Blood.* 1 mai 2003;101(9):3741-8.
435. Chen M, Xiao X, Demirci G, Li XC. OX40 controls islet allograft tolerance in CD154 deficient mice by regulating FOXP3+ Tregs. *Transplantation.* 15 juin 2008;85(11):1659-62.
436. Yoshioka T, Nakajima A, Akiba H, Ishiwata T, Asano G, Yoshino S, et al. Contribution of OX40/OX40 ligand interaction to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* oct 2000;30(10):2815-23.
437. Jember AG, Zuberi R, Liu FT, Croft M. Development of allergic inflammation in a murine model of asthma is dependent on the costimulatory receptor OX40. *J Exp Med.* 5 févr 2001;193(3):387-92.
438. Arestides RSS, He H, Westlake RM, Chen AI, Sharpe AH, Perkins DL, et al. Costimulatory molecule OX40L is critical for both Th1 and Th2 responses in allergic inflammation. *Eur J Immunol.* oct 2002;32(10):2874-80.
439. Salek-Ardakani S, Song J, Halteman BS, Jember AG-H, Akiba H, Yagita H, et al. OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation. *J Exp Med.* 21 juill 2003;198(2):315-24.

440. Totsuka T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Yamazaki M, Akiba H, et al. Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAbs in a murine model of chronic colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* avr 2003;284(4):G595-603.
441. Pohl M, Kawakami N, Kitic M, Bauer J, Martins R, Fischer M-T, et al. T cell-activation in neuromyelitis optica lesions plays a role in their formation. *Acta Neuropathol Commun.* 2013;1:85.
442. Boot EPJ, Koning GA, Storm G, Wagenaar-Hilbers JPA, van Eden W, Everse LA, et al. CD134 as target for specific drug delivery to auto-aggressive CD4+ T cells in adjuvant arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):R604-15.
443. Cunninghame Graham DS, Graham RR, Manku H, Wong AK, Whittaker JC, Gaffney PM, et al. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* janv 2008;40(1):83-9.
444. Chang YK, Yang W, Zhao M, Mok CC, Chan TM, Wong RWS, et al. Association of BANK1 and TNFSF4 with systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese. *Genes Immun.* juill 2009;10(5):414-20.
445. Delgado-Vega AM, Abelson A-K, Sánchez E, Witte T, D'Alfonso S, Galeazzi M, et al. Replication of the TNFSF4 (OX40L) promoter region association with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* avr 2009;10(3):248-53.
446. Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, Liu Y, Narayanan P, Seneschal J, et al. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity.* 16 juin 2015;42(6):1159-70.
447. van Wanrooij EJA, van Puijvelde GHM, de Vos P, Yagita H, van Berkel TJC, Kuiper J. Interruption of the Tnfrsf4/Tnfsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 2007;27(1):204-10.
448. Wang X, Ria M, Kelmenson PM, Eriksson P, Higgins DC, Samnegård A, et al. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility. *Nat Genet.* avr 2005;37(4):365-72.
449. Matsumura Y, Imura A, Hori T, Uchiyama T, Imamura S. Localization of OX40/gp34 in inflammatory skin diseases: a clue to elucidate the interaction between activated T cells and endothelial cells in infiltration. *Arch Dermatol Res.* oct 1997;289(11):653-6.
450. Humphreys IR, de Trez C, Kinkade A, Benedict CA, Croft M, Ware CF. Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *J Exp Med.* 14 mai 2007;204(5):1217-25.

451. Munks MW, Mourich DV, Mittler RS, Weinberg AD, Hill AB. 4-1BB and OX40 stimulation enhance CD8 and CD4 T-cell responses to a DNA prime, poxvirus boost vaccine. *Immunology*. août 2004;112(4):559-66.
452. Obermeier F, Schwarz H, Dunger N, Strauch UG, Grunwald N, Schölmerich J, et al. OX40/OX40L interaction induces the expression of CXCR5 and contributes to chronic colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Eur J Immunol*. déc 2003;33(12):3265-74.
453. Malmström V, Shipton D, Singh B, Al-Shamkhani A, Puklavec MJ, Barclay AN, et al. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 juin 2001;166(11):6972-81.
454. Griseri T, Asquith M, Thompson C, Powrie F. OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. *J Exp Med*. 12 avr 2010;207(4):699-709.
455. Higgins LM, McDonald SA, Whittle N, Crockett N, Shields JG, MacDonald TT. Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 janv 1999;162(1):486-93.
456. Wu X, Rosenbaum JT, Adamus G, Zhang GL, Duan J, Weinberg A, et al. Activation of OX40 prolongs and exacerbates autoimmune experimental uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. oct 2011;52(11):8520-6.
457. Martin-Orozco N, Chen Z, Poirot L, Hyatt E, Chen A, Kanagawa O, et al. Paradoxical dampening of anti-islet self-reactivity but promotion of diabetes by OX40 ligand. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 déc 2003;171(12):6954-60.
458. Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh CS, Ohshima H, et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: a critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 févr 2001;166(3):2108-15.
459. Gaspal F, Withers D, Saini M, Bekiaris V, McConnell FM, White A, et al. Abrogation of CD30 and OX40 signals prevents autoimmune disease in FoxP3-deficient mice. *J Exp Med*. 1 août 2011;208(8):1579-84.
460. Humphreys IR, Walzl G, Edwards L, Rae A, Hill S, Hussell T. A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection. *J Exp Med*. 20 oct 2003;198(8):1237-42.

461. Hoshino A, Tanaka Y, Akiba H, Asakura Y, Mita Y, Sakurai T, et al. Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *Eur J Immunol.* avr 2003;33(4):861-9.
462. Gauvreau GM, Boulet L-P, Cockcroft DW, FitzGerald JM, Mayers I, Carlsten C, et al. OX40L blockade and allergen-induced airway responses in subjects with mild asthma. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* janv 2014;44(1):29-37.
463. Gourh P, Arnett FC, Tan FK, Assassi S, Divecha D, Paz G, et al. Association of TNFSF4 (OX40L) polymorphisms with susceptibility to systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* mars 2010;69(3):550-5.
464. Bossini-Castillo L, Broen JCA, Simeon CP, Beretta L, Vonk MC, Ortego-Centeno N, et al. A replication study confirms the association of TNFSF4 (OX40L) polymorphisms with systemic sclerosis in a large European cohort. *Ann Rheum Dis.* avr 2011;70(4):638-41.
465. Coustet B, Bouaziz M, Dieudé P, Guedj M, Bossini-Castillo L, Agarwal S, et al. Independent replication and meta analysis of association studies establish TNFSF4 as a susceptibility gene preferentially associated with the subset of anticentromere-positive patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* mai 2012;39(5):997-1003.
466. Cunninghame Graham DS, Graham RR, Manku H, Wong AK, Whittaker JC, Gaffney PM, et al. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* janv 2008;40(1):83-9.
467. Komura K, Yoshizaki A, Koder M, Iwata Y, Ogawa F, Shimizu K, et al. Increased serum soluble OX40 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* déc 2008;35(12):2359-62.
468. Fang F, Shangguan AJ, Kelly K, Wei J, Gruner K, Ye B, et al. Early growth response 3 (Egr-3) is induced by transforming growth factor- β and regulates fibrogenic responses. *Am J Pathol.* oct 2013;183(4):1197-208.
469. Rabieyousefi M, Soroosh P, Satoh K, Date F, Ishii N, Yamashita M, et al. Indispensable roles of OX40L-derived signal and epistatic genetic effect in immune-mediated pathogenesis of spontaneous pulmonary hypertension. *BMC Immunol.* 2011;12:67.
470. Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol.* janv 2010;37(1):26-41.
471. Wells DJ. Animal welfare and the 3Rs in European biomedical research. *Ann N Y Acad Sci.* déc 2011;1245:14-6.

472. Akesson A, Hesselstrand R, Scheja A, Wildt M. Longitudinal development of skin involvement and reliability of high frequency ultrasound in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* juill 2004;63(7):791-6.
473. El-Zawahry MBM, Abdel El-Hameed El-Cheweikh HM, Abd-El-Rahman Ramadan S, Ahmed Bassiouny D, Mohamed Fawzy M. Ultrasound biomicroscopy in the diagnosis of skin diseases. *Eur J Dermatol EJD.* déc 2007;17(6):469-75.
474. Hesselstrand R, Scheja A, Wildt M, Akesson A. High-frequency ultrasound of skin involvement in systemic sclerosis reflects oedema, extension and severity in early disease. *Rheumatol Oxf Engl.* janv 2008;47(1):84-7.
475. Kaloudi O, Bandinelli F, Filippucci E, Conforti ML, Miniati I, Guiducci S, et al. High frequency ultrasound measurement of digital dermal thickness in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* juin 2010;69(6):1140-3.
476. Kleinerman R, Whang TB, Bard RL, Marmor ES. Ultrasound in dermatology: principles and applications. *J Am Acad Dermatol.* sept 2012;67(3):478-87.
477. Li SC, Liebling MS. The use of Doppler ultrasound to evaluate lesions of localized scleroderma. *Curr Rheumatol Rep.* juill 2009;11(3):205-11.
478. Wortsman X, Wortsman J, Sazunic I, Carreño L. Activity assessment in morphea using color Doppler ultrasound. *J Am Acad Dermatol.* nov 2011;65(5):942-8.
479. Tedstone JL, Richards SM, Garman RD, Ruzek MC. Ultrasound imaging accurately detects skin thickening in a mouse scleroderma model. *Ultrasound Med Biol.* août 2008;34(8):1239-47.
480. Avouac J, Palumbo K, Tomcik M, Zerr P, Dees C, Horn A, et al. Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor β -mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum.* mai 2012;64(5):1642-52.
481. Tsukada N, Akiba H, Kobata T, Aizawa Y, Yagita H, Okumura K. Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1 avr 2000;95(7):2434-9.
482. Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol.* mars 1976;82(3):493-512.
483. Bocchieri MH, Jimenez SA. Animal models of fibrosis. *Rheum Dis Clin North Am.* févr 1990;16(1):153-67.

484. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol.* avr 1988;41(4):467-70.
485. Allanore Y, Distler O. Systemic sclerosis in 2014: Advances in cohort enrichment shape future of trial design. *Nat Rev Rheumatol.* févr 2015;11(2):72-4.
486. Foks AC, van Puijvelde GHM, Bot I, ter Borg MND, Habets KLL, Johnson JL, et al. Interruption of the OX40-OX40 ligand pathway in LDL receptor-deficient mice causes regression of atherosclerosis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 nov 2013;191(9):4573-80.
487. Nakano M, Fukumoto Y, Satoh K, Ito Y, Kagaya Y, Ishii N, et al. OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization. *Cardiovasc Res.* 1 déc 2010;88(3):539-46.
488. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Roth MD, Furst DE, Silver RM, et al. Effects of 1-year treatment with cyclophosphamide on outcomes at 2 years in scleroderma lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 nov 2007;176(10):1026-34.
489. Imura A, Hori T, Imada K, Kawamata S, Tanaka Y, Imamura S, et al. OX40 expressed on fresh leukemic cells from adult T-cell leukemia patients mediates cell adhesion to vascular endothelial cells: implication for the possible involvement of OX40 in leukemic cell infiltration. *Blood.* 15 avr 1997;89(8):2951-8.
490. Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 oct 1997;159(8):3838-48.
491. Muangchan C, Pope JE. Interleukin 6 in systemic sclerosis and potential implications for targeted therapy. *J Rheumatol.* juin 2012;39(6):1120-4.
492. Distler JHW, Schett G, Gay S, Distler O. The controversial role of tumor necrosis factor alpha in fibrotic diseases. *Arthritis Rheum.* août 2008;58(8):2228-35.
493. Koca SS, Isik A, Ozercan IH, Ustundag B, Evren B, Metin K. Effectiveness of etanercept in bleomycin-induced experimental scleroderma. *Rheumatol Oxf Engl.* févr 2008;47(2):172-5.
494. Allanore Y, Devos-François G, Caramella C, Boumier P, Jounieaux V, Kahan A. Fatal exacerbation of fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis in a patient treated with adalimumab. *Ann Rheum Dis.* juin 2006;65(6):834-5.
495. Ostor AJK, Crisp AJ, Somerville MF, Scott DGI. Fatal exacerbation of rheumatoid arthritis associated fibrosing alveolitis in patients given infliximab. *BMJ.* 27 nov 2004;329(7477):1266.

496. Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol.* juin 2004;4(6):420-31.
497. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Highland KB, Hant F, Nietert PJ, Singleton CB, et al. Down-regulation of collagen and connective tissue growth factor expression with hepatocyte growth factor in lung fibroblasts from white scleroderma patients via two signaling pathways. *Arthritis Rheum.* oct 2007;56(10):3468-77.
498. Matsumura Y, Hori T, Kawamata S, Imura A, Uchiyama T. Intracellular signaling of gp34, the OX40 ligand: induction of c-jun and c-fos mRNA expression through gp34 upon binding of its receptor, OX40. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 sept 1999;163(6):3007-11.
499. Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Busch N, Zwerina J, Schett G, et al. Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum.* janv 2009;60(1):219-24.
500. Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, Sugamura K. OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv Immunol.* 2010;105:63-98.
501. Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev.* mai 2009;229(1):173-91.
502. Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci Transl Med.* 9 janv 2013;5(167):167sr1.
503. Jensen SM, Maston LD, Gough MJ, Ruby CE, Redmond WL, Crittenden M, et al. Signaling through OX40 enhances antitumor immunity. *Semin Oncol.* oct 2010;37(5):524-32.
504. Byun M, Ma CS, Akçay A, Pedergnana V, Palendira U, Myoung J, et al. Inherited human OX40 deficiency underlying classic Kaposi sarcoma of childhood. *J Exp Med.* 26 août 2013;210(9):1743-59.
505. Tuladhar R, Oghumu S, Dong R, Peterson A, Sharpe AH, Satoskar AR. Ox40L-Ox40 pathway plays distinct roles in regulating Th2 responses but does not determine outcome of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*. *Exp Parasitol.* janv 2015;148:49-55.
506. Morris NP, Peters C, Montler R, Hu H-M, Curti BD, Urba WJ, et al. Development and characterization of recombinant human Fc:OX40L fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. *Mol Immunol.* mai 2007;44(12):3112-21.

507. Song Y, Margolles-Clark E, Bayer A, Buchwald P. Small-molecule modulators of the OX40-OX40 ligand co-stimulatory protein-protein interaction. *Br J Pharmacol.* nov 2014;171(21):4955-69.
508. Chitnis T, Najafian N, Abdallah KA, Dong V, Yagita H, Sayegh MH, et al. CD28-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* mars 2001;107(5):575-83.
509. Odobasic D, Kitching AR, Tipping PG, Holdsworth SR. CD80 and CD86 costimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis by different mechanisms. *Kidney Int.* août 2005;68(2):584-94.
510. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis Rheum.* nov 2011;63(11):3575-85.
511. Murata K, Nose M, Ndhlovu LC, Sato T, Sugamura K, Ishii N. Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 oct 2002;169(8):4628-36.
512. Bossini-Castillo L, López-Isac E, Martín J. Immunogenetics of systemic sclerosis: Defining heritability, functional variants and shared-autoimmunity pathways. *J Autoimmun.* 23 juill 2015;
513. Kong F, Li J-X, Li P, Li Y-Z, Zhang F-C, Zhang J. Association of TNFSF4 polymorphisms with susceptibility to primary Sjögren's syndrome and primary biliary cirrhosis in a Chinese Han population. *Clin Exp Rheumatol.* août 2013;31(4):546-51.
514. Dhirapong A, Yang G-X, Nadler S, Zhang W, Tsuneyama K, Leung P, et al. Therapeutic effect of cytotoxic T lymphocyte antigen 4/immunoglobulin on a murine model of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Baltim Md.* févr 2013;57(2):708-15.

RESUME

La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie auto-immune orpheline. Elle est caractérisée par une atteinte microvasculaire et une fibrose touchant la peau et les organes internes. La ScS est une maladie sévère avec une surmortalité significative. Jusqu'à présent, aucun essai thérapeutique n'a permis de démontrer qu'un produit ait une action anti-fibrosante et améliore significativement le pronostic de cette maladie.

La physiopathologie de la ScS fait intervenir une combinaison de facteurs environnementaux et de facteurs de susceptibilité génétique. Récemment *TNFSF4* a été identifié comme facteur de susceptibilité génétique à la ScS. *TNFSF4* code pour OX40 ligand (OX40 L). Le couple OX40-OX40L est impliqué dans la co-stimulation tardive des lymphocytes T, mais aussi dans la genèse et la réactivation de lymphocytes T mémoires et dans la prolifération et différenciation des lymphocytes B. Bloquer OX40L s'est avéré prometteur dans des modèles précliniques d'encéphalomyélite auto-immune, de polyarthrite rhumatoïde, de colite inflammatoire, de réaction du greffon contre l'hôte et d'asthme. Par ailleurs, ce blocage permettrait d'inhiber uniquement les lymphocytes T pathogènes récemment activés et d'éviter ainsi une immunosuppression globale, contrairement aux biothérapies actuellement disponibles en rhumatologie.

L'observation d'une surexpression de la protéine OX40L dans le derme des patients ScS nous a incités à étudier le rôle d'OX40L dans la ScS. L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier l'efficacité d'une thérapie ciblée anti-OX40L dans la ScS, par l'utilisation de modèles murins complémentaires de la maladie.

Nous avons tout d'abord cherché à optimiser le modèle de fibrose induite par la bléomycine, qui est un modèle bien validé, utilisé en général en première intention pour évaluer des anti-fibrosants potentiels, en particulier lorsqu'il s'agit de cibles inflammatoires. Nous avons également étudié si l'échographie à haute fréquence pouvait apporter une aide à l'évaluation cutanée chez ces animaux, mais nos résultats n'ont pas permis de démontrer une place spécifique à cet outil dans ce contexte. Les approches anti-OX40L ont débuté par l'utilisation de souris KO qui ont montré des résultats prometteurs dans le modèle induit par la bléomycine. Ensuite, des approches pharmacologiques ont été développées en utilisant un anticorps monoclonal neutralisant anti-OX40L dans le modèle de fibrose dermique induite par la bléomycine. L'intérêt du blocage d'OX40L a été conforté par la démonstration de propriétés non seulement de prévention mais aussi curatives contre la fibrose établie. L'étude des voies modulées par OX40L a mis en avant l'infiltrat inflammatoire et le relargage de cytokines pro-fibrotiques (IL-6 et TNF- α). De plus, le blocage d'OX40L semblait prévenir la fibrose dermique en inhibant l'activation des fibroblastes dépendant de la voie de signalisation AP-1.

Le rôle d'OX40L dans la phase inflammatoire du remodelage matriciel a été abordé par l'utilisation du modèle de cicatrisation cutanée. En revanche, le blocage d'OX40L n'a pas eu d'effet dans le modèle de fibrose non-inflammatoire qui caractérise les souris Tsk-1.

Etant donné le rôle clé en clinique de l'atteinte d'organe, notre approche a été enrichie par l'utilisation de souris transgéniques Fra2, qui sont un nouveau modèle de ScS caractérisé par une fibrose pulmonaire inflammatoire et une HTAP. L'effet de l'anticorps anti-OX40L a été remarquable dans ce contexte avec au scanner et à l'histologie une réduction significative de la fibrose pulmonaire, du remodelage vasculaire et des signes d'HTAP.

Enfin, l'étude longitudinale des sérums collectés dans notre cohorte de patients a montré que la forme soluble d'OX40L pourrait être un potentiel biomarqueur dans la ScS pour identifier les patients à risque de progression sévère.

Ainsi, nos résultats mettent en lumière le rôle d'OX40L dans la ScS et suggèrent que son blocage pourrait être un traitement potentiel dans la ScS et peut-être dans d'autres maladies fibrosantes. Ce travail met en exergue la relation inflammation-fibrose dans la physiopathologie de la ScS.

Ce travail de thèse souligne l'intérêt de combiner plusieurs modèles animaux dans l'approche préclinique de la ScS.

Mots-clés : Sclérodémie systémique, fibrose, auto-immunité, OX40 ligand, modèles murins