



HuMoSC, une nouvelle thérapie pour le traitement des maladies dysimmunitaires et fibrosantes

Coraline Genet

► To cite this version:

Coraline Genet. HuMoSC, une nouvelle thérapie pour le traitement des maladies dysimmunitaires et fibrosantes. Immunologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. ⟨NNT : 2022UBFCE011⟩. ⟨tel-04001595⟩

HAL Id: tel-04001595

<https://theses.hal.science/tel-04001595v1>

Submitted on 23 Feb 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE, INSERM UMR 1098 RIGHT

Ecole doctorale n°554

Environnement - Santé

Doctorat d'immunologie

Par

Coraline Genet

HuMoSC, une nouvelle thérapie pour le traitement des maladies
dysimmunitaires et fibrosantes

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 21 décembre 2022

Composition du Jury

Pr. BONNOTTE Bernard	PU-PH, Université Bourgogne Franche-Comté	Président
Pr. SERVETTAZ Amélie	PU-PH, Université de Reims	Rapporteur
Pr. LARMONIER Nicolas	PU, Université de Bordeaux	Rapporteur
Pr. MOUTHON Luc	PU-PH, Université de Paris	Examineur
Pr. SAMSON Maxime	PU-PH, Université Bourgogne Franche-Comté	Directeur de thèse

« L'homme n'est qu'un roseau, le plus faible de la nature, mais c'est un roseau pensant »

Pensées, Blaise Pascal (1623-1662)

« Le hasard ne favorise l'invention que pour des esprits préparés aux découvertes par de patientes études et de persévérants efforts »

Louis Pasteur (1822-1895)

Remerciements

Au Président de mon Jury et Directeur d'équipe,

Monsieur le Professeur Bernard BONNOTTE

Il y a 3 ans, vous avez cru en moi en me donnant ma chance au concours de l'Ecole Doctorale. Depuis, j'essaie chaque jour de rester digne de la confiance que vous me portez. Nous en avons parcouru du chemin ensemble. Votre esprit critique et votre ambition nous ont conduit à approfondir tous les aspects de ce projet. Malgré certaines déceptions, nous avons pu apprivoiser davantage les propriétés des HuMoSC et leur fonctionnement. J'espère que ces travaux pourront être poursuivis.

Cette expérience de Thèse m'a fait grandir et je n'aurais voulu vivre cela nulle part ailleurs qu'à vos côtés. A travers ces quelques lignes, je tiens à vous témoigner toute ma gratitude.

A mon Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Maxime SAMSON

Ce serait te mentir que de dire que cette fin de thèse a été facile pour moi. Je te suis sincèrement reconnaissante pour tes messages d'encouragement et ton soutien. Tout au long de ces années, tu m'as fait progresser avec des remarques pertinentes sur les projets et tes milles idées à la fois. Je suis admirative de ta force de travail et je te remercie pour le temps que tu m'as accordé. Cela a été un honneur de travailler avec toi.

Aux membres du Jury

Madame la Professeur Amélie SERVETTAZ, Monsieur le Professeur Luc MOUTHON et Monsieur le Professeur Nicolas LARMONIER, malgré vos obligations vous me faites l'honneur de juger ce travail de thèse et je vous en remercie. A l'occasion de ces années de recherche, j'ai pu découvrir vos travaux. J'admire vos carrières respectives et l'étendue de votre savoir. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Aux membres de mon comité de suivi de Thèse

Docteur Laurent DELVA et Professeur Nona JANIKASHVILI, je vous remercie d'avoir accepté de juger et guider ce travail de thèse. Vos remarques m'ont permis de m'améliorer et elles ont contribué à la qualité de ce travail.

A mon référent de Thèse

Michael COEURDASSIER, je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien. Attentif, bienveillant et investi, nos entretiens ont été un réel plaisir. Je souhaite à tous les doctorants de pouvoir bénéficier d'un référent tel que vous.

A l'UMR 1098,

Je suis reconnaissante envers le Professeur Philippe SAAS de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche. Parmi mes collègues de Besançon, je tiens à remercier tout particulièrement Francis BONNEFOY, pour m'avoir fait bénéficier de son expérience en expérimentation animale, et Gwenaël ROLIN, pour avoir partagé ses connaissances avec moi. J'ai également une pensée pour Zélie et Marion, merci de votre aide pour l'organisation de la Fête de la Science, et merci également au service administratif.

Chère BB team,

Nous y sommes. Nous sommes arrivés au terme de ses 3 années passées ensemble. A l'aube de ce nouveau départ, c'est le cœur lourd mais rempli de souvenirs que je m'adresse à vous pour, une dernière fois, vous remercier.

Naïve de tout, mais prête à me lancer dans une aventure dont j'ignorais même l'ampleur, je suis arrivée dans votre équipe. Et quelle équipe !

Claudie, nos discussions du mercredi vont me manquer. Tu as été d'un grand soutien dans mes projets, dans mes calculs fous, dans ces journées à 2000 km/h, bref je n'aurais pas pu me passer de toi ! J'admire ta rigueur, rendant notre collaboration très agréable (bientôt un CDI ?!). Je te souhaite le meilleur dans ta vie professionnelle et personnelle.

Un grand merci à mes collègues de bureau, Hélène et Marion, pour votre bonne humeur. Personne ne nous avait dit qu'il était impossible de mener à bien une thèse, alors on l'a fait ! On va pouvoir profiter un peu maintenant. Marion, cette thèse n'aurait pas été la même sans toi. Tu m'as permis de démêler mes interrogations et tu m'as fait profiter de tes connaissances et de ton expérience. J'ai grandi à tes côtés. En dehors du labo, tu m'as donné le goût des spectacles. Je compte sur toi pour continuer à me conseiller !

A vos côtés, je retiendrais le meilleur : les fous rires, les parties de fléchette, les apéro (si si on travaillait aussi parfois). Mais la vie au laboratoire, c'est aussi se soutenir dans le pire. Une pensée particulière pour la soirée à essorer le sol inondé des toilettes, la séance

dégivrage du -80°C, les BAT surprises (et les BAT programmées aussi d'ailleurs), les LUMINEX sans les billes...

Florine, je te remercie pour ton travail sur mes projets et en particulier pour l'in vivo. Promis, c'est fini !

Au professeur Sylvain AUDIA, à Séthi, à Thibaut et à André, merci pour tous ces moments partagés.

Même si vous n'étiez que de passage dans l'équipe, Martin, Julie, votre rencontre a été très enrichissante personnellement. Je vous souhaite une bonne continuation.

Mes remerciements s'adressent également à toi Baptiste. Tu ne peux pas imaginer à quel point ton arrivée dans nos locaux a été bénéfique pour moi. Ta capacité d'analyse et ta rigueur scientifique sont des modèles que je veux suivre. Bon courage pour la suite.

Un mot enfin pour remercier le Professeur Laurent MARTIN, chef du service d'anatomopathologie, et Georges TARRIS. Georges, je te remercie d'avoir mis ton expertise au service de mon projet. On en a passé des heures sur ces lames ! J'ai un profond respect pour ton travail et je te souhaite d'aller le plus loin possible.

A l'équipe PAM,

Tracy, nos discussions au détour d'un couloir me manquent. Je te remercie pour ton soutien. Tu as été la belle rencontre à laquelle je ne m'attendais pas. Merci à Amandine et à Hervé pour toutes les fois où vous m'avez dépannée en termes de matériel ou de réactif. Je n'oublie pas non plus l'aide que tu as pu m'apporter Hervé sur mes analyses avec ImageJ. Louise, merci pour tes encouragements sur la dernière ligne droite !

A l'INSERM 1231,

Au sein de votre équipe, j'ai pu trouver toutes les compétences et les outils qu'il me manquait pour mener à bien mes projets. Vous m'avez toujours bien accueillie et j'ai énormément appris à vos côtés. Ainsi, j'adresse un grand remerciement à Laurence JEGO et Fatima pour le thermocycleur et la microscopie, Olivier BURGUY pour le nanosight, Cindy RACOEUR pour l'expérimentation animale, Jessica GOBBO et Valentin VAUTROT pour votre aide sur le projet VE et Jean-Paul PAIS DE BARROS pour le spectrophotomètre et la résolution de mes problèmes en biochimie et chimie.

Aux collaborateurs,

Merci à CellimaP, et en particulier à Audrey GEISLER qui a suivi tous mes projets in vivo. Merci à la plateforme DimaCell et surtout à Laure AVOSCAN pour sa disponibilité et son aide sur le projet VE. Merci à l'équipe de la plateforme de cytométrie avec Anabelle SEQUEIRA, Nicolas PERNET et Serge MONIER. Merci à l'EFS, au personnel de l'Animalerie et au service d'anatomopathologie. Merci enfin au service d'ophtalmologie et au service de chirurgie maxillo-faciale du CHU de Dijon.

Aux patients et aux donneurs, pour leur contribution à la recherche.

A ma famille, mes amis et mes proches,

Je sais bien que pour certains d'entre vous, cette Thèse et les débouchés qu'elle m'offrira sont un peu flous (pour moi aussi parfois), mais je vous remercie tous pour votre soutien sans faille, dans les bons comme dans les mauvais moments. Je n'aurais surement pas réussi cette aventure sans votre amour. Un clin d'œil aux cargaisons de gâteaux, chocolats, fruits/légumes qui ont été indispensables à la réussite de ce projet. Merci également aux nombreux pulls tricotés, j'étais parée pour survivre dans le nord. A présent, j'espère que nous prendrons plus de temps pour partager de nouveaux moments ensemble. Je vous aime.

A tout ceux qui ne sont plus à mes côtés,

J'apprends encore chaque jour à avancer sans votre main dans la mienne. Chacun à votre façon, vous avez contribué à faire de moi ce que je suis aujourd'hui et pour cela, je vous remercie.

Table des matières

Remerciements	4
Liste des figures	11
Liste des tableaux	13
Abréviations	14
Résumé	18
INTRODUCTION	19
Chapitre I - Thérapies cellulaires immunosuppressives d'origine myéloïde	20
Partie I : Les cellules souches hématopoïétiques	20
1/ Généralités	20
2/ Intérêt thérapeutique	24
3/ Les enjeux et limites pour demain	26
Partie II : Les cellules suppressives d'origine myéloïde	27
1/ Généralités	27
2/ Expansion et activation	30
3/ Mécanismes d'action	32
4/ Intérêts thérapeutiques	35
5/ Génération <i>ex vivo</i> et limites	36
6/ MDSC et vésicules extracellulaires	36
Partie III : Les cellules dendritiques tolérogènes	39
1/ Généralités et diversité	39
2/ Rôle des DC dans l'activation immunitaire adaptative et le maintien de la tolérance immunitaire périphérique	42
3/ Mécanismes immunosuppresseurs	44
4/ Intérêts thérapeutiques	47
5/ Génération <i>ex vivo</i>	49
Partie IV : Les macrophages régulateurs	49
1/ Généralités	49
2/ Induction des Mreg <i>in vivo</i>	51
3/ Mécanismes d'action	53
4/ Intérêts thérapeutiques	54
5/ Génération <i>ex vivo</i> et limites	56

Partie V : Les HuMoSC	56
1/ Généralités	56
2/ Génération <i>ex vivo</i>	57
3/ Propriétés immunosuppressives.....	58
4/ Perspectives cliniques et limites	62
5/ Mécanismes d'action	63
 Chapitre II - Maladies auto-inflammatoires et systémiques	65
Partie I : L'Artérite à Cellules Géantes.....	65
1/ Introduction et épidémiologie	65
A) Le rôle de la génétique	65
B) L'influence de l'épigénétique	66
C) Les facteurs environnementaux	67
2/ Physiopathologie.....	67
A) Rupture de la tolérance immunitaire	68
B) Recrutement, activation et polarisation des LT CD4	68
C) Recrutement des LT CD8 et des monocytes.....	68
D) Remodelage vasculaire.....	68
3/ Manifestations cliniques et signes paracliniques	92
4/ Diagnostic.....	92
5/ Traitements.....	93
 Partie II : La Sclérodémie Systémique	95
1/ Introduction et épidémiologie	95
A) Le rôle de la génétique	95
B) Les facteurs environnementaux	96
2/ Manifestations cliniques	97
A) Symptômes.....	97
B) Complications	99
3/ Marqueurs biologiques	102
4/ Diagnostic.....	103
5/ Traitements	104
6/ Physiopathologie.....	106
A) Vasculopathie	107
B) Dérégulation de la réponse immunitaire	109
C) Fibrose	113

7/ Modèles <i>in vivo</i>	125
A) Modèles génétiques	125
B) Modèles transgéniques	125
C) Modèles induits	126
OBJECTIFS DE LA THESE	127
RESULTATS.....	129
Intérêt thérapeutique des HuMoSC pour le traitement de l'artérite à cellules géantes	130
Etude de l'intérêt thérapeutique des HuMoSC pour le traitement de la sclérodermie systémique ..	161
Isolement et caractérisation des fibroblastes humains	161
Modèle de fibrose <i>in vitro</i> et effet du surnageant de HuMoSC	166
Modèle de fibrose induite <i>in vivo</i>	174
Mécanismes d'action des HuMoSC	180
Paramètres impactant potentiellement le processus de production des HuMoSC.....	180
Rôle des VE	182
Identification et rôles des facteurs solubles	186
Conservation du surnageant	191
DISCUSSION & PERSPECTIVES	193
Intérêt des HuMoSC dans l'inflammation et le remodelage tissulaire	194
Mécanismes d'action du surnageant	196
Evolution vers une utilisation en clinique	202
CONCLUSION.....	205
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	206
ANNEXES.....	236

Liste des figures

Figure 1 : Schéma général présentant l'hématopoïèse	21
Figure 2 : Différenciation des CSH.....	23
Figure 3 : Présentation de la thérapie génique	25
Figure 4 : Schéma de la génération des MDSC au cours de la myélopoïèse.....	28
Figure 5 : Voies de signalisation impliquées dans l'expansion et l'activation des MDSC	30
Figure 6 : Les principaux mécanismes d'immunosuppression des MDSC.....	34
Figure 7 : Biogénèse des vésicules extracellulaires.....	37
Figure 8 : Structure d'une vésicule extracellulaire.....	38
Figure 9 : Schéma de la génération des DC.....	40
Figure 10 : Caractérisation et activation des DC	42
Figure 11 : Activation des lymphocytes T par les DC matures	43
Figure 12 : Les principaux mécanismes d'immunosuppression des TolDC.....	47
Figure 13 : Classification et polarisation des macrophages	50
Figure 14 : Facteurs et voies impliqués dans l'expansion et l'activation des Mreg	52
Figure 15 : Les principaux mécanismes d'immunosuppression des Mreg.....	54
Figure 16 : Evaluation des capacités sécrétoires des HuMoSC.....	57
Figure 17 : Schéma de génération des HuMoSC et de leur surnageant ex vivo	58
Figure 18 : Les HuMoSC inhibent l'activation et la prolifération des LT in vitro.....	59
Figure 19 : Les HuMoSC favorisent l'expansion des Treg in vitro et in vivo.....	60
Figure 20 : Les HuMoSC protègent de la GVHD in vivo	60
Figure 21 : Le surnageant des HuMoSC inhibe la prolifération des LT in vitro	61
Figure 22 : Les propriétés des HuMoSC sont maintenues dans un contexte inflammatoire in vitro ...	61
Figure 23 : L'effet de la cyclophosphamide est renforcé par les HuMoSC, permettant de mieux contrôler la GVHD in vivo	62
Figure 24 : L'activité suppressive des HuMoSC est dépendante du facteur de transcription STAT3 ...	63
Figure 25 : Les HuMoSC séquestrent des acides aminés essentiels via l'engagement de STAT3	64
Figure 26 : Principales manifestations cliniques de la SSc	98
Figure 27 : Physiopathologie de la SSc reprenant les principaux acteurs cellulaires et moléculaires conduisant à la fibrose	107
Figure 28 : Origine cellulaire et propriétés des myofibroblastes dans la SSc	116
Figure 29 : Facteurs impliqués dans l'activation des fibroblastes sclérodermiques.....	118
Figure 30 : Voie de signalisation du TGF- β	120

Figure 31 : Caractérisation des fibroblastes extraits des biopsies de peau humaine	165
Figure 32 : Transition phénotypique des fibroblastes	168
Figure 33 : Effet du surnageant de HuMoSC sur l'expression des protéines de la MEC.....	169
Figure 34 : Effet du surnageant de HuMoSC sur l'expression des facteurs pro-fibrosants	170
Figure 35 : Impact du surnageant de HuMoSC sur des fibroblastes pré-activés	172
Figure 36 : Effet du surnageant de HuMoSC sur la prolifération des fibroblastes.....	173
Figure 37 : Schéma expérimental du modèle HOCl in vivo	175
Figure 38 : Test de l'innocuité du surnageant de HuMoSC injecté	177
Figure 39 : Développement d'une fibrose cutanée et évaluation des propriétés anti-fibrosantes du surnageant de HuMoSC in vivo	179
Figure 40 : Variables pouvant influencer les propriétés suppressives du surnageant de HuMoSC....	182
Figure 41 : Isolement et caractérisation des VE issues des HuMoSC.....	184
Figure 42 : Evaluation du potentiel suppresseur des VE.....	185
Figure 43 : Identification et rôle des facteurs solubles dans le surnageant de HuMoSC.....	190
Figure 44 : Evaluation des propriétés suppressives du surnageant de HuMoSC conservé 6 mois à -20°C	191
Figure 45 : Analyse protéomique de la composition du surnageant de HuMoSC par rapport à celui des monocytes	201
Figure 46 : Comparaison des fonctions suppressives du surnageant CD14+ HuMoSC et CD33+ HuMoSC	204

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux miR impliqués dans la fibrose	97
Tableau 2 : Critères de classification de la SSc d'après l'EULAR et l'ACR (2013)	103
Tableau 3 : Corrélation entre la fibrose cutanée et l'expression relative des protéines matricielles	195

Abréviations

A

α -SMA : *alpha-smooth muscle actin*

auto-Ac : auto-anticorps

ACA : anticorps anti-centromères

ACG : Artérite à Cellules Géantes

ACR : *American college of Rheumatology*

ADAM : *a disintegrin and metalloprotease domain*

ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANA : antigène nucléaire

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

AQP4 : aquaporine 4

ARG-1 : arginase-1

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATA : anti-topoisomérase de type 1

ATG5 : protéines d'autophagie 5

AT1R : récepteur de type 1 de l'angiotensine II

ATP : Adénosine triphosphate

B

BAT : biopsie d'artère temporale

BLK : tyrosine kinase lymphoïde B

BPF : bonne pratique de fabrication

C

CB : récepteur cannabinoïde

CCL2 : *Monocyte chemoattractant protein-1*

CCR : récepteur de chimiokine

cDC : cellule dendritique conventionnelle

c-FLIP : *Cellular caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CML : cellule musculaire lisse

CMV : cytomégalovirus

COL : gène du collagène

COX2 : cyclooxygénase 2

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CRH : *Corticotropin Releasing Hormone*

CRISPR/cas : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / associated protein*

CRP : protéine C-réactive

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSK : tyrosine kinase c-SRC

CSM : cellule souche mésenchymateuse

CTGF : *Connective Tissue Growth Factor*

CVF : capacité vitale forcée

CXCL : *chemokine (C-X-C motif) ligand*

CXCR : *chemokine receptor*

CYC : cyclophosphamide

D

DAMP : motifs moléculaires associés aux dégâts

DC : cellule dendritique

DLCO : diffusion du monoxyde de carbone

DNASE1L3 : *désoxyribonucléase 1-like 3*

DNMT1 : ADN méthyltransférase 1

DT1 : diabète de type 1

E

ECM : matrice extracellulaire

EDN1 : gène de l'endothéline-1

EFS : Etablissement Français du Sang

EMT : transition épithéliale-mésenchymateuse

EndoMT : transition endothéliale-mésenchymateuse

ET-1 : endothéline-1

ET-1RA : récepteur de l'endothéline-1

EULAR : *European Alliance of Associations for Rheumatology*

EUSTAR : *European Scleroderma Trials and Research group*

F

FAK : focal adhésion kinase

Fc : Fragment cristallisable

FGF-2 : facteur de croissance des fibroblastes

FIZZ1 : *resistin-like molecule-α*

Fli-1 : *Friend leukemia integration 1*

FLT3 : *fms-like tyrosine kinase 3*

FN1 : gène de la fibronectine-1

Fn-EDA : *fibronectin containing extra domain A*

Fra2 : *Fos-related antigen-2*

G

G-CSF : *granulocyte colony-stimulating factor*

GM-CSF : *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*

GPNMB : glycoprotéine NMB

GVHD : réaction du greffon contre l'hôte

GWAS : étude d'association pangénomique

H

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HDL : *high-density lipoproteins*

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

HO-1 : hème oxygenase-1

HOCl : acide hypochloreux

HTAP : hypertension artérielle pulmonaire

HuMoSC : *Human Monocyte-derived Suppressor Cells*

I

ICAM : molécule d'adhésion intracellulaire

ICOS : *Inducible Co-Stimulator*

IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN : interféron

IL : interleukine

IL-1RA : antagoniste du récepteur à l'IL-1

ILC : *Innate Lymphoid Cells*

ILT : immunoglobuline

ILV : vésicule intraluminale

iNOS : *inducible nitric oxide synthase*

iPS : *induced pluripotent stem cell*

IRF : *Interferon Response Factor*

IRM : imagerie par résonnance magnétique

ISEV : société internationale des vésicules extra-cellulaires

IT-CSH : cellule souche hématopoïétique à moyen terme

J

JAK : janus kinase

K

KH₂PO₄ : phosphate de monopotassium

L

LPS : lipopolysaccharide

LT ou **LB** : lymphocyte T ou B

LT-CSH : cellule souche hématopoïétique à long terme

M

M1 ou **M2** : macrophage 1 ou 2

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MBD : *methyl-CpG-binding domain protein*

M-CSF : *monocyte colony-stimulating factor*

MDSC : cellule suppressive d'origine myéloïde

MET : microscope électronique à transmission

MF : myofibroblastes

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

miR : micro ARN

MKL : facteur de transcription lié à la myocardine

M-MDSC : monocytiques-cellule suppressive d'origine myéloïde

MMF : mycophénolate mofétil

MMP : métalloprotéinase matricielle

Mo-DC : cellule dendritique dérivée de monocyte

MPP : progéniteurs multipotents

Mreg : macrophage régulateur

mRSS : score cutané de Rodnan modifié

mTOR : *mammalian target of rapamycin*

MTX : methotrexate

MVE : endosomes multivésiculaires

N

NaClO : hypochlorite de sodium

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NET : *neutrophil extracellular traps*

NF-κB : *nuclear factor-kappa B*

NK : *natural killer*

NO : monoxyde d'azote

NOX : NADPH oxydase

NPM1 : nucléophosmine 1

NTA : *nanoparticle tracking analysis*

O

O₂⁻ : superoxyde

ONOO⁻ : peroxydinitrite

P

P4HA2 : sous-unité alpha-2 de la prolyl 4-hydroxylase

PAMP : motif moléculaire associé aux pathogènes

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique

PD-1 : *Programmed cell Death protein 1*

pDC : cellule dendritique plasmacytoïde

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDGFR : récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes

PD-L1 : *Programmed Death-Ligand 1*

PGE2 : prostaglandine E2

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PID : pneumopathie interstitielle diffuse

PLG : plasminogène

PMN : polynucléaires neutrophiles

PMN-MDSC : polymorphonucléaires-cellule suppressive d'origine myéloïde

PPAR-γ : récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes

PPR : pseudopolyarthrite rhizomélique

PTPN22 : *protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22*

R

RB1 : gène du rétinoblastome 1

RNAP : anti-ARN polymérase III

RNS : espèce réactive de l'azote

Rock : *rho-associated protein kinase*

ROS : espèce réactive de l'oxygène

S

SAP : protéine amyloïde P sérique

SCF : facteur de croissance des cellules souches

ST-CSH : cellule souche hématopoïétique à court terme

SOCS : suppresseurs de signalisation des cytokines

SRF : facteur de réponse sérique

SSc : sclérodémie systémique

STAT : transducteur de signal et activateur de la transcription

T

TβR : récepteur du facteur de croissance transformant

TAZ : co-activateur transcriptionnel avec motif de liaison PDZ

TCR : récepteur des lymphocytes T

TEP-scanner : tomographie par émission de positons - scanner

TGF : facteur de croissance transformant

Th : lymphocyte T auxiliaire

TIMP : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases

TLR : *Toll like receptor*

TNF : facteur de nécrose tumorale

TNFR : récepteur du facteur de nécrose tumorale

ToIDC : cellule dendritique tolérogène

Treg : lymphocyte T régulateur

TSK : *Tight skin*

TSP : thrombospondine

V

VCAM : molécule d'adhésion des cellules vasculaires

VE (ou EV) : vésicule extracellulaire

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VS : vitesse de sédimentation

VZV : virus varicelle zona

Y

YAP : *Yes associated protein*

Résumé

HuMoSC, une nouvelle thérapie pour le traitement des maladies dysimmunitaires et fibrosantes

Notre équipe a développé une méthode expérimentale pour générer des cellules immunosuppressives d'origine monocytaire baptisées les *Human Monocyte-derived Suppressor Cells* (HuMoSC). Si leurs propriétés immunosuppressives ont déjà été montrées, aucune étude n'avait encore évalué leurs intérêts sur le remodelage tissulaire.

L'objectif de cette thèse était d'une part, d'évaluer le potentiel thérapeutique des HuMoSC et de leur surnageant pour le traitement du remodelage tissulaire. D'autre part, nous avons cherché à identifier les mécanismes d'action impliqués dans les fonctions du surnageant. L'effet des HuMoSC a d'abord été évalué dans l'artérite à cellules géantes en utilisant un modèle de culture d'artères temporales *ex vivo*, puis dans un modèle de fibrose *in vitro* et *in vivo*, similaire à celle décrite dans la Sclérodémie Systémique.

Nos résultats ont montré que le surnageant de HuMoSC diminuait l'expression des protéines matricielles et des facteurs pro-fibrosants ainsi que la prolifération cellulaire.

En conclusion, ce travail de thèse a mis en avant les propriétés anti-remodelage du surnageant de HuMoSC, représentant ainsi un nouvel espoir dans le traitement des maladies fibrosantes.

Mots clés : cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes ; immunorégulation ; remodelage vasculaire ; fibrose ; artérite à cellules géantes ; sclérodémie systémique

HuMoSC, a new therapy for the treatment of auto-immune diseases and fibrosis

Our team has developed an experimental method to generate immunosuppressive cells of monocyte origin called Human Monocyte-derived Suppressor Cells (HuMoSC). Although their immunosuppressive properties have already been shown, no study had yet evaluated their interest in tissue remodeling.

The objective of this thesis was to evaluate the therapeutic potential of HuMoSCs and their supernatant for the treatment of tissue remodeling. On the other hand, we sought to identify the mechanisms of action involved in the functions of the supernatant of HuMoSC. The effect of HuMoSCs was first evaluated in giant cell arteritis using an *ex vivo* temporal artery culture model, and then in an *in vitro* and *in vivo* fibrosis model, similar to that described in Systemic Scleroderma.

Our results showed that HuMoSC supernatant decreased the expression of matrix proteins and pro-fibrosing factors as well as cell proliferation.

In conclusion, this thesis work has highlighted the anti-remodeling properties of HuMoSC supernatant thus representing a new hope in the treatment of fibrosing diseases.

Keywords: myeloid derived suppressor cells ; immunoregulation; vascular remodeling ; fibrosis ; giant cell arteritis ; systemic sclerosis

INTRODUCTION

Chapitre I - Thérapies cellulaires immunosuppressives d'origine myéloïde

Le système immunitaire est responsable de la défense de l'organisme face à des agents exogènes, généralement infectieux, ou endogènes, comme par exemple les cellules cancéreuses. Le dysfonctionnement du système immunitaire, que ce soit par excès ou par défaut, peut mettre en péril l'équilibre de l'organisme en provoquant des maladies auto-immunes ou des déficit immunitaires.

Le traitement de maladies auto-immunes fait appel à la prescription d'immunomodulateurs et d'immunosuppresseurs, qui manquent souvent de spécificité ce qui est à l'origine des effets indésirables de ces traitements. De plus, ces traitements sont souvent suspensifs et non curatifs, si bien que leur arrêt conduit à la rechute de la maladie.

Les cellules immunosuppressives sont apparues comme une stratégie prometteuse pour le traitement de ces pathologies. Depuis les années 1990, les essais cliniques concernant ces thérapies se sont multipliés. Dans ce chapitre, nous détaillerons quelques thérapies encourageantes dans le traitement de pathologies auto-immunes et/ou auto-inflammatoires. Nous aborderons en particulier les thérapies cellulaires d'origine myéloïde comme les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC), les cellules dendritiques (DC) et les macrophages régulateurs (Mreg). La dernière partie sera consacrée à la présentation d'une nouvelle thérapie cellulaire développée au sein de notre équipe de recherche et appelée *Human Monocyte Suppressive Cells* (HuMoSC).

Partie I : Les cellules souches hématopoïétiques

1/ Généralités

L'existence des CSH a été mise en évidence en 1961 chez des souris irradiées puis greffées de moelle osseuse (1). Les CSH sont à l'origine de l'hématopoïèse, un processus continu qui est responsable de la production de l'ensemble des cellules sanguines tout au long de la vie (figure 1). Un défaut d'hématopoïèse peut conduire à des maladies sévères comme les leucémies ou les déficits immunitaires.

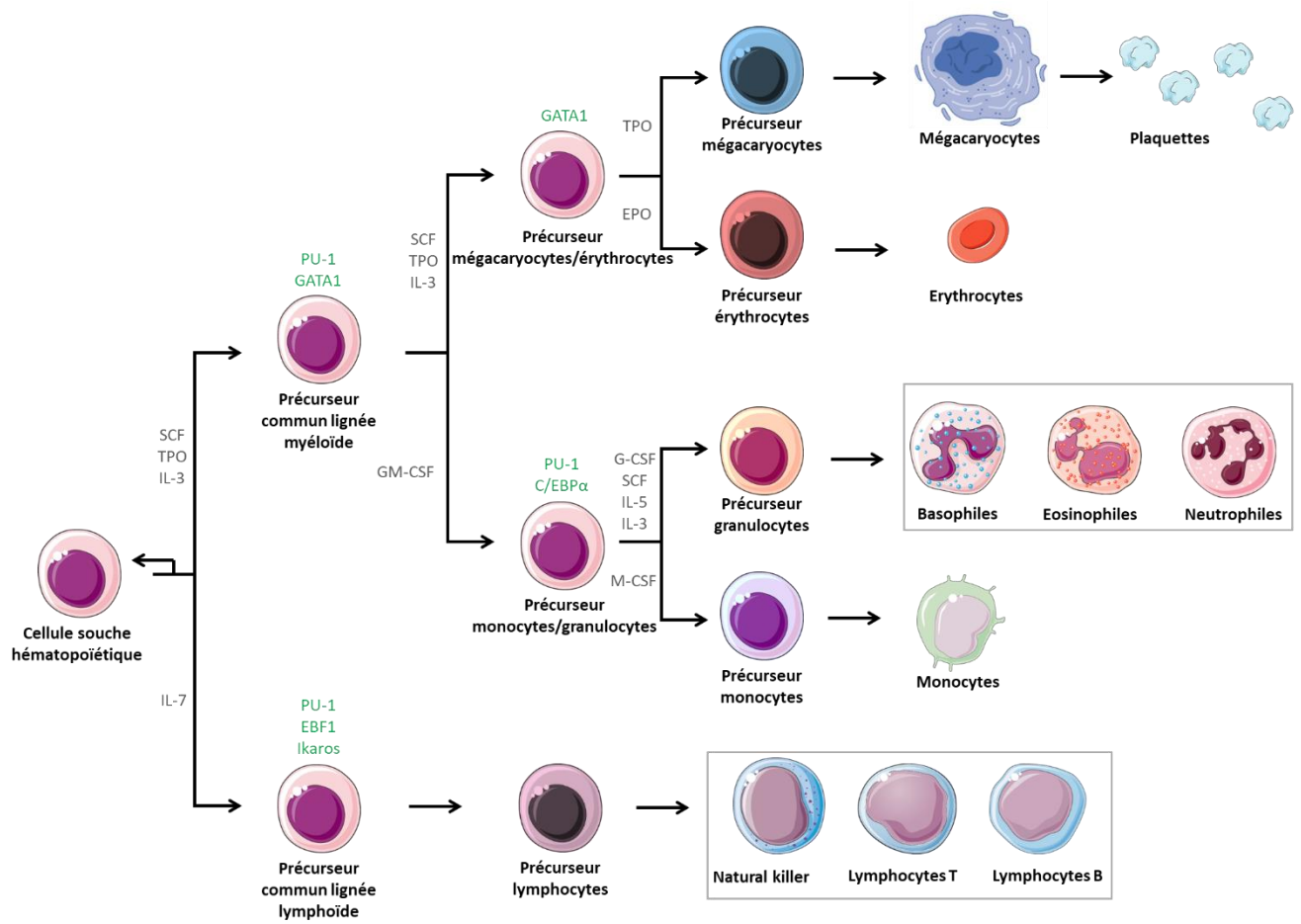


Figure 1 : Schéma général présentant l'hématopoïèse, inspiré de Cheng *et al.* 2020

Les CSH se situent au sommet de l'hématopoïèse. En aval, une séparation entre la branche des cellules myéloïdes et celle des cellules lymphoïdes se produit. Les précurseurs myéloïdes génèrent d'un côté les mégacaryocytes/plaquettes, et de l'autre les monocytes/granulocytes. Les précurseurs lymphoïdes donnent naissance à des lymphocytes T ou B ainsi qu'aux cellules *natural killer*. La différenciation hématopoïétique est contrôlée par des cytokines extrinsèques (en gris) et des facteurs de transcription intrinsèques (en vert).

SCF = facteur de croissance des cellules souches ; TPO = thrombopoïétine ; GM-CSF = *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor* ; EPO = érythropoïétine ; G-CSF = *granulocyte colony-stimulating factor* ; M-CSF = *monocyte colony-stimulating factor*

Les CSH ont été identifiées à différents stades du développement embryonnaire. Chez l'adulte, ces cellules peuvent être isolées à partir du sang périphérique, de la moelle osseuse ou du sang de cordon ombilical. Il s'agit de cellules rares dont la fréquence est estimée à 1 cellule sur 10 000 dans la moelle osseuse (2). Ces cellules présentent des propriétés singulières, les rendant très attractives dans le développement de nouvelles thérapies cellulaires. En effet, ce sont des cellules multipotentes qui ont donc la capacité de se différencier en différents types cellulaires spécialisées et qui sont également capables de s'auto-renouveler pour générer de nouvelles cellules souches. Cependant, le caractère multipotent des CSH a été remis en question car certaines études ont suggéré que les CSH étaient des

cellules pluripotentes en raison de leur capacité à donner des types cellulaires plus larges que les cellules sanguines, comme des hépatocytes par exemple (3).

En réalité, les CSH peuvent être divisées en trois grandes sous-populations. Les CSH à long terme (LT-CSH), caractérisées par un phénotype $CD34^{-}flt3^{-}$, et qui sont placées au sommet de l'hématopoïèse (4). Ces cellules sont capables de reconstituer l'intégralité des cellules sanguines en trois à quatre mois (5). Dans des conditions physiologiques, les LT-CSH sont dans un état majoritairement quiescent et forment un réservoir. En réponse à une lésion, à un stress ou à une stimulation, ces cellules rentrent dans une forme active en reprenant le cycle cellulaire (6).

Les LT-CSH se différencient en CSH à court terme (ST-CSH) qui ont un phénotype $CD34^{+}flt3^{-}$. Dans un contexte de transplantation, elles ont une capacité de reconstitution plus rapide que les LT-CSH, de l'ordre de quatre à six semaines (7). Dans une étude menée chez la souris, une équipe a montré que l'hématopoïèse de l'adulte était largement dépendante des ST-CSH alors que les LT-CSH intervenaient davantage au cours de la vie fœtale et postnatale précoce (8).

Les ST-CSH donnent naissance à des progéniteurs multipotents (MPP). Ces progéniteurs sont caractérisés par un phénotype $CD34^{+}flt3^{+}$ et ont perdu la capacité de s'auto-renouveler (7, 9).

Une division en deux branches se produit ensuite avec la différenciation des MPP en précurseurs communs de la lignée myéloïde d'une part (voie de production des granulocytes/monocytes, DC et plaquettes/érythrocytes), et en précurseurs communs de la lignée lymphoïde d'autre part (lymphocytes et DC).

La différenciation progressive des CSH et leur maturation en différents types cellulaires sont régulées par de multiples cytokines extrinsèques et par des facteurs de transcription intrinsèques (5,10). Par exemple, la double expression des facteurs de transcription PU-1 et GATA1 induit la différenciation des CSH en précurseurs communs de la lignée myéloïde. La forte expression de PU-1 oriente ensuite la différenciation vers les progéniteurs granulocytes/monocytes, tandis que l'expression de GATA1 dirige la différenciation vers les précurseurs des mégacaryocytes/érythrocytes. Parmi les cytokines contrôlant la différenciation hématopoïétique, le *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor* (GM-CSF) oriente la différenciation vers la voie des granulocytes/monocytes. L'engagement et la maturation granulocytaire est ensuite favorisée par le *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) notamment et la présence d'interleukines dans l'environnement comme l'interleukine (IL)-3, alors que le *monocyte colony-stimulating factor* (M-CSF) favorise plutôt une différenciation vers les monocytes (10).

Avec l'évolution des techniques et l'amélioration des modèles d'étude, ce modèle classique d'hématopoïèse a été remis en question suggérant que les populations de CSH sont encore plus complexes. Chez la souris, une étude a mis en évidence l'existence de CSH à moyen terme (IT-CSH), qui se situeraient entre les LT-CSH et les ST-CSH, et contribueraient à la reconstitution des cellules sanguines entre six et huit mois après transplantation (11). Par ailleurs, une autre équipe a proposé une division de la population MPP en quatre groupes : MPP1, MPP2, MPP3 et MPP4 (12) (figure 2). Bien que ces précurseurs soient capables de donner des cellules de différentes lignées, les MPP2 favoriseraient la production de plaquettes/érythrocytes, les MPP3 des granulocytes/monocytes et les MPP4 la lignée lymphoïde. Quant aux MPP1, ils seraient similaires aux ST-CSH.

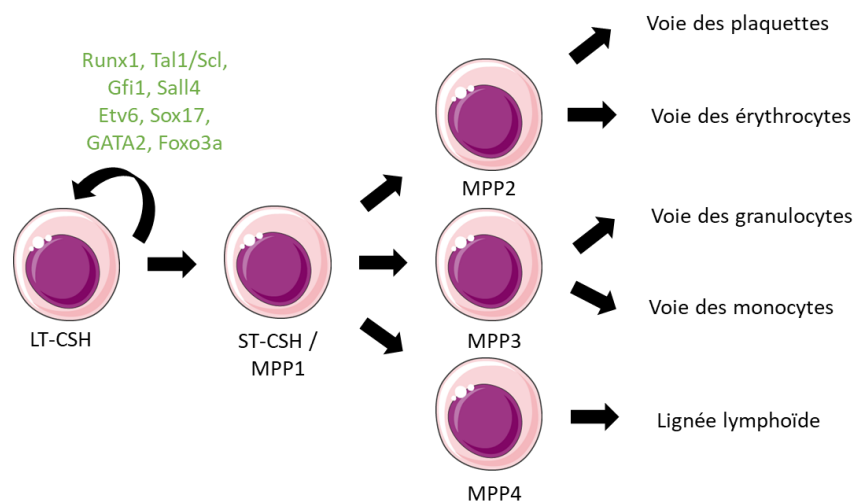


Figure 2 : Différenciation des CSH, inspiré de Cheng *et al.* 2020

Les LT-CSH se différencient en ST-CSH / MPP1, eux-mêmes donnant trois types de MPP dont l'engagement sera différent. Les facteurs de transcription intervenant dans le maintien de la capacité à s'auto-renouveler, apparaissent en vert.

LT-CSH ou ST-CSH = cellules souches hématopoïétiques à long ou court terme ; MPP = progéniteurs multipotents ; Runx1 = facteurs de transcription à domaine Runt ; Tal1/Scl = *T-cell acute leukemia 1 / stem cell leukemia gene* ; Gfi1 = *Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor* ; Sall4 = *Sal-Like Protein 4* ; Etv6 = *ETS Variant Transcription Factor 6* ; Sox17 = *SRY-Box Transcription Factor 17* ; Foxo3a = *Forkhead Box O3*.

Cependant, il est important de noter que l'ensemble des connaissances actuelles portant sur les CSH ont été majoritairement obtenues à partir d'études *in vitro* et de modèles de transplantation *in vivo*. Il s'agit donc d'un contexte potentiellement éloigné de l'environnement dans lequel évoluent les CSH dans des conditions physiologiques. Les CSH résident dans une niche dans la moelle osseuse, un environnement permettant de maintenir les capacités « souches » de ces cellules. En effet, cette structure présente des caractéristiques particulières. Par des mesures directes de l'oxygène dans la moelle osseuse de souris vivantes, une équipe a notamment montré que cette niche correspondait à un environnement hypoxique (13).

2/ Intérêt thérapeutique

La greffe allogénique de CSH est principalement utilisée pour le traitement des hémopathies malignes, en particulier les leucémies, et les hémopathies non-malignes, comme les déficits immunitaires primitifs sévères. Au cours des hémopathies, l'objectif est d'obtenir une immunothérapie (effet *Graft versus Leukemia* (GvL)). Une étude de 2005 avait établi que sur une cohorte de 854 patients atteints de différents cancers (leucémie myéloïde aiguë, lymphome non hodgkinien...) et ayant tous reçu une greffe autologue de CSH, 68,8% étaient toujours en vie dix ans après la transplantation (14). Pour le traitement des hémopathies non-malignes ou après une chimiothérapie lourde par exemple, la greffe de CSH est recommandée dans le but de reconstruire un système hématopoïétique fonctionnel. La greffe allogénique de CSH nécessite de surmonter d'importantes barrières immunologiques. En particulier, il est nécessaire d'atteindre un haut degré d'appariement du système *Human Leukocyte Antigen* (HLA) entre le donneur et le receveur afin de limiter le rejet de greffe ou une réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) (15). Toutefois, ces précautions ne garantissent pas le succès de la greffe. En effet, cette procédure entraîne un haut risque de complications potentiellement mortelles (infections) et une mortalité supérieure à 30% (16). La prévention et le traitement de la GVHD nécessite le recours à des traitements immunosuppresseurs. Des antibiotiques, antifongiques et antiviraux sont également utilisés pour diminuer le risque d'infection (16).

Parmi les maladies hématologiques non malignes, la β -thalassémie a fait l'objet d'études portant sur l'intérêt de l'allogreffe de CSH et des thérapies géniques. La β -thalassémie est une maladie génétique, caractérisée par une déficience au niveau des chaînes β de l'hème. L'allogreffe de CSH est considérée comme le traitement curatif classique pour ces patients permettant, en cas de compatibilité donneur-receveur, d'obtenir une guérison dans 80 à 87% des cas (17). Cependant, il s'agit d'une procédure lourde et qui nécessite un donneur compatible, ce qui n'est pas toujours possible. D'où l'intérêt de la thérapie génique. Une étude de phase I/II a rapporté les résultats obtenus chez 22 patients après l'isolement des cellules CD34⁺ autologues, leur transduction *ex vivo* avec le vecteur LentiGlobin BB305 (lentivirus) codant pour le gène déficient dans la β -thalassémie (*β A-T87Q-globine*) et leur réinjection chez les patients (18) (figure 3). Ces patients ont été suivis jusqu'à trois ans après la greffe. Le traitement permettait de réduire voire de supprimer le besoin transfusionnel chez l'ensemble des patients, sans événements indésirables graves liés à l'injection des CSH transfectées.

La leucodystrophie métachromatique est une maladie héréditaire, caractérisée par une accumulation de sulfatides dans le système nerveux du fait d'un déficit de l'enzyme arylsulfatase A. Bien qu'aucun traitement curatif n'existe à ce jour, une équipe a montré qu'il était possible de corriger génétiquement les CSH défectueuses et de les réinjecter (19). *Ex vivo*, ils ont utilisé un vecteur viral similaire à l'équipe de Thomson *et al.* (lentivirus) pour transférer un gène *ARSA* fonctionnel dans des

CSH de trois patients pré-symptomatiques. Après transplantation des CSH corrigées les patients ont été suivi pendant deux ans. Les analyses ont révélé une bonne intégration du gène avec une augmentation de l'expression de l'enzyme et aucune manifestation symptomatique n'a été enregistrée sept à vingt-et-un mois après l'âge théorique d'apparition des symptômes.

En plus de la thérapie génique basée sur l'emploi de vecteurs lentiviraux, quelques essais cliniques de phase I/II ont évalué des approches d'édition génique comme la méthode *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / associated protein* (CRISPR/Cas) 9 (figure 3). Fin 2020, une équipe a publié les résultats obtenus chez un patient atteint de β -thalassémie et un second atteint de drépanocytose (20). Dans le cadre de cette étude, les patients ont reçu des CSH CD34⁺ autologues modifiées par CRISPR-Cas9 pour diminuer l'expression du facteur de transcription BCL11A. Ce facteur diminue l'expression de l'hémoglobine fœtale qui est composée de deux chaînes alpha et deux chaînes gamma. Une forte concentration en hémoglobine fœtale est donc associée à une meilleure survie des patients atteints de drépanocytose ou de β -thalassémie. Plus d'un an après l'intervention, les résultats étaient encourageants puisque les deux patients présentaient une augmentation de l'hémoglobine fœtale et n'étaient plus dépendants des transfusions.

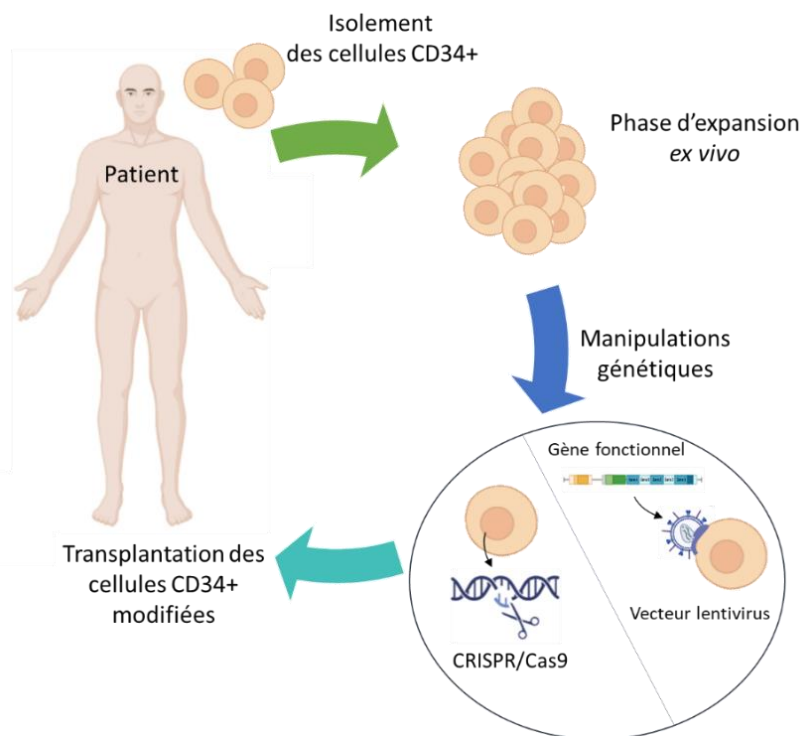


Figure 3 : Présentation de la thérapie génique, inspiré de Rattanont *et al.* 2021

Isolement des CSH CD34⁺ autologues, transduction avec un vecteur ou modification par CRISPR-Cas9 et réinjection chez le patient.

3/ Les enjeux et limites pour demain

L'enjeu de ces nouvelles thérapies de pointe est à présent d'améliorer la compréhension des niches et des régulateurs intrinsèques/extrinsèques des CSH et également de développer de nouvelles méthodes pour augmenter le nombre de cellules. En effet, le faible nombre de cellules disponibles représente le principal frein dans l'utilisation des CSH à des fins thérapeutiques. C'est dans ce contexte que les travaux d'une équipe japonaise, dirigée par le médecin chercheur Shinya Yamanaka, ont été récompensés en 2012 par le prix Nobel de physiologie ou médecine. A partir de fibroblastes murins « reprogrammés », l'équipe a obtenu *ex vivo* des cellules dont les capacités étaient similaires à celles des cellules souches embryonnaires (21). La « reprogrammation » des fibroblastes a été rendue possible par l'intégration dans ces cellules de quatre gènes spécifiques qui ont permis leur dédifférenciation : *c-Myc*, *Oct3/4*, *SOX2*, et *Klf4*.

La génération de ces cellules pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cell* ou iPS) représente une avancée majeure dans le domaine des thérapies cellulaires qui emploient des CSH, en particulier pour pallier au faible nombre de cellules disponibles chez l'homme. Cette voie innovante est aujourd'hui reprise par de nombreuses équipes de recherche. Les objectifs sont d'augmenter le rendement des iPS, maîtriser l'insertion des gènes et améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la reprogrammation. Dès 2007, les travaux menés sur la souris ont été étendus à l'Homme avec les mêmes résultats encourageants (22).

Le traitement de la maladie de Parkinson par l'injection iPS a fait l'objet de nombreux travaux de recherche. Il s'agit d'une maladie neurologique dégénérative liée à un déficit en dopamine, un neurotransmetteur essentiel au fonctionnement du système nerveux central. L'équipe japonaise référente dans ce domaine a créé une lignée d'iPS humaines (QHJI01s04) dérivée de cellules sanguines périphériques de volontaires sains. Elles ont ensuite été différenciées en neurones capable de produire de la dopamine avant d'être transplantées chez des patients. Préalablement, dans un modèle de souris immunodéficientes, la transplantation de 200 000 cellules directement dans le cerveau des souris (striatum) n'avait montré ni toxicité ni induction de tumeur pendant les cinquante-deux semaines d'observation (23). L'efficacité des cellules a également été confirmée dans un modèle de la maladie de Parkinson chez le rat (6-OHDA) (24). De la même façon, 400 000 cellules ont été transplantées dans le striatum du côté lésé des rats et, après vingt semaines de suivi, le comportement des rats s'était amélioré et les neurones présentaient une bonne survie.

Finalement, en 2018, le premier essai de transplantation d'iPS chez l'homme pour le traitement de la maladie de Parkinson a été lancé au Japon (25). L'objectif était d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de la transplantation de 5 millions de ces cellules dans une zone cérébrale précise (putamen) des patients.

Il s'agissait d'une étude de phase I/II, incluant 7 patients avec une période d'observation de deux ans. D'autres essais cliniques similaires à celui-ci sont en cours, notamment en Australie et en Chine. Mais à notre connaissance, aucun résultat n'a été encore publié. En 2020, une étude a rapporté le cas d'un patient parkinsonien chez lequel les cellules greffées ont survécu pendant deux ans (26). De plus, les symptômes cliniques de la maladie se seraient stabilisés voire améliorés.

Une autre étude publiée en 2020 s'est intéressée à la transplantation de CSH génétiquement corrigées dans un modèle de souris thalassémiques (27). Ces cellules étaient issues de cellules de patients β -thalassémiques reprogrammées en iPS, corrigées par CRISPR/cas9, puis différenciées en CSH. Elles ont survécu chez la souris et se sont différenciées en érythrocytes. Comme dans les études sur la maladie de Parkinson, aucune formation de tumeur n'a été observée sur les dix semaines après transplantation. Cependant, les résultats n'ont pas atteint l'effet thérapeutique attendu car l'anémie n'a pas été corrigée.

Ainsi, cette approche moderne combinée à l'ingénierie génétique offre de nouvelles perspectives prometteuses pour les patients. Mais pour l'heure, la différenciation des iPS en CSH possédant une bonne capacité de greffe *in vivo* et un maintien des propriétés « souches » des cellules restent difficiles (28).

Partie II : Les cellules suppressives d'origine myéloïde

1/ Généralités

Comme mentionné précédemment, les CSH sont à l'origine de la myélopoïèse. Les MDSC sont issues de ce processus (29). Elles sont définies comme étant une population de cellules hétérogènes, d'origine myéloïde (figure 4). Dans des conditions physiologiques, les cellules myéloïdes immatures migrent vers les organes lymphoïdes où elles peuvent se différencier en monocytes ou en granulocytes. Cependant, diverses conditions pathologiques peuvent perturber la différenciation de ces cellules. Les MDSC sont des cellules immatures caractérisées par leur capacité à inhiber les réponses immunitaires adaptatives et innées.

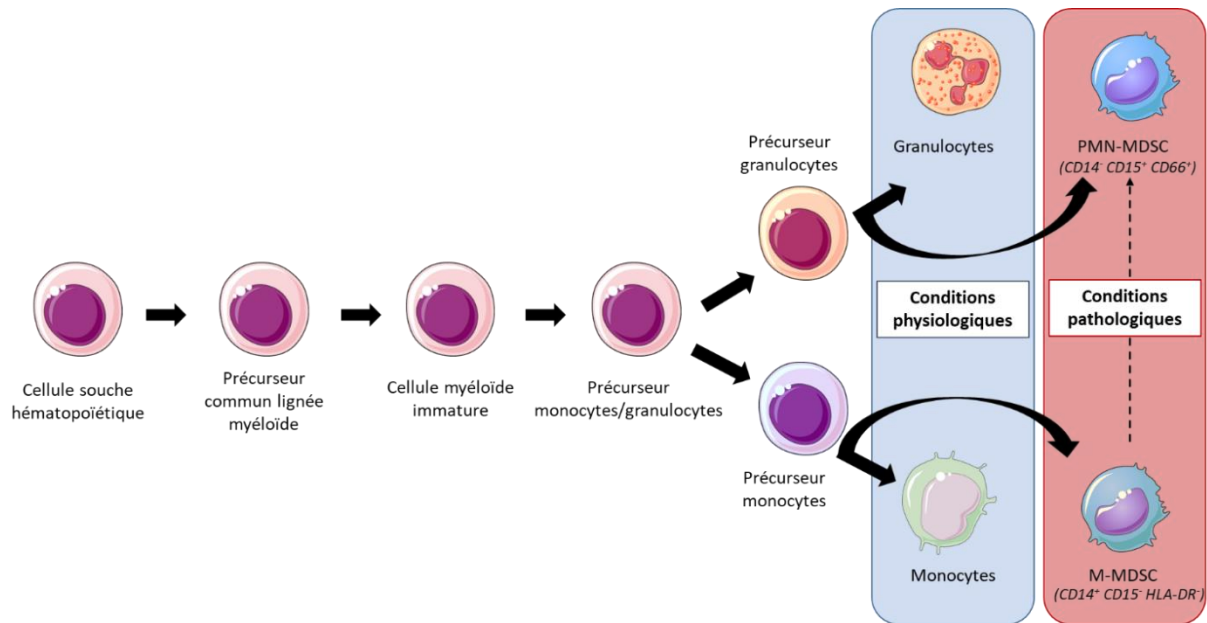


Figure 4 : Schéma de la génération des MDSC au cours de la myélopoïèse

Le processus est initié dans la moelle osseuse où la cellule souche se différencie jusqu'à devenir le précurseur des monocytes ou des granulocytes. Dans un contexte pathologique le précurseur des monocytes donnera plutôt des M-MDSC tandis que le précurseur des granulocytes se différenciera en PMN-MDSC. Il a été également démontré que les M-MDSC pouvaient se différencier en PMN-MDSC.

PMN ou M-MDSC = polymorphonucléaires ou monocytyques - cellules suppressives d'origine myéloïde

En 2020, Yaseen *et al.* ont proposé une réévaluation de la définition des MDSC en s'appuyant sur le constat que l'état immature de ces cellules, qui était initialement admis, n'était en réalité pas vérifié (30). En effet, la présence de populations MDSC présentant des caractéristiques matures remet en cause la première définition proposée. Une étude publiée en 2016 a rapporté, par exemple, que la plupart des MDSC isolées dans la circulation des patients atteints de lymphome de Hodgkin, présentaient une expression augmentée de CD66b, un marqueur exprimé également par les neutrophiles et directement lié à la fonction suppressive des MDSC (31).

L'environnement dans lequel se trouve les MDSC joue un rôle primordial dans la régulation de leur fonction suppressive. Ainsi, il a été montré dans un modèle inflammatoire spécifique de la prostate et dans un modèle de cancer de la prostate, que les MDSC provenant du site inflammatoire ou du tissu tumoral possédaient de fortes capacités suppressives, tandis que les MDSC isolées du foie ou de la rate présentaient des capacités inhibitrices bien moindres (32). Ainsi, le microenvironnement semble jouer un rôle majeur dans la régulation des fonctions des MDSC. Ces cellules pourraient finalement être définies comme une population hétérogène comprenant un mélange de cellules myéloïdes immatures et matures avec des capacités de suppression variables au sein même d'un individu en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent (30).

Les MDSC sont caractérisées par un phénotype CD11b⁺ CD33⁺ chez l'Homme et CD11b⁺ Gr1⁺ chez la souris. Il est communément admis l'existence de deux populations distinctes de MDSC : d'une part des MDSC présentant une morphologie proche de celle des granulocytes, baptisées PMN-MDSC, et d'autre part des MDSC ressemblant à des monocytes, appelées M-MDSC. Bien que les M-MDSC et PMN-MDSC soient proches des monocytes/macrophages et des neutrophiles respectivement, des études ont cependant confirmé qu'il s'agissait bien de cellules différentes de par leur fonction, leurs profils protéiques, leur phénotype et leurs caractéristiques biochimiques (30,33).

Les PMN-MDSC ont un fort niveau d'expression de ROS et sont définies par une expression LY6G⁺ LY6C^{low} chez la souris et CD14⁻ CD15⁺ CD66⁺ chez l'homme (34). D'un autre côté, les M-MDSC sont caractérisées par un phénotype LY6G⁻ LY6C^{high} chez la souris et CD14⁺ CD15⁻ HLA-DR⁻ or ^{low} chez l'homme. Ces dernières expriment fortement le monoxyde d'azote (NO).

L'expression d'autres marqueurs a également été décrite chez les MDSC comme le récepteur 1 des LDL (LOX-1) (impliqué dans le métabolisme des lipides), CD40, CD66b, CD80 (molécule de co-stimulation), CD115 (récepteur du M-CSF), CD124 (récepteur IL-4Rα), S100A8/A9 (protéines pro-inflammatoires) et SPARC (protéine associée à la matrice extracellulaire) (30,34–36). Aucun marqueur n'est spécifique des MDSC. Quelques-uns peuvent en revanche permettre une distinction entre le groupe des M-MDSC et le groupe des PMN-MDSC. C'est le cas des marqueurs CD66b et LOX-1, qui sont spécifiques des PMN-MDSC (31). Outre leurs différences morphologiques et phénotypiques, ces deux groupes présentent également des fonctions différentes, qui seront détaillées plus loin dans ce chapitre.

Un troisième groupe de MDSC est également décrit. Il s'agit des « *early-stage* MDSC » ou « e-MDSC ». Ces cellules regroupent des cellules progénitrices et des précurseurs immatures et sont définies par un phénotype CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR⁻ CD14⁻ CD15⁻ (34).

Enfin, un dernier groupe de MDSC associées aux fibroblastes a été décrit au cours des cancers : les F-MDSC (37).

La différenciation des MDSC est régulée par plusieurs facteurs. Condamine *et al.* proposait en 2015 un modèle basé sur deux signaux majeurs : le premier intervenant dans l'expansion des MDSC et le second déclenchant leur activation (38).

2/ Expansion et activation

En condition pathologique, des signaux persistants provenant du site tumoral ou d'une inflammation chronique vont stimuler l'expansion et l'activation des MDSC (34). Les cellules myéloïdes immatures se différencient de leurs progéniteurs/précurseurs grâce à la présence dans l'environnement d'un ensemble de facteurs incluant des facteurs de croissance (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, facteur de croissance des cellules souches (SCF), facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)), des cytokines (IL-3, IL-6), de l'adénosine, du FLT3 (*fms-like tyrosine kinase 3*), la prostaglandine E2 (PGE2) générée par la cyclooxygénase 2 (COX2), et des acides gras (29,38–40).

Une grande variété de cytokines pro-inflammatoires intervient dans l'acquisition des capacités suppressives des MDSC. Interféron (IFN)- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-13, facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , facteur de croissance transformant (TGF)- β et indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) sont les cytokines les plus couramment citées (29,39). Ces molécules sont relarguées dans l'environnement par les cellules du système immunitaire, les cellules tumorales ou infectées, ou encore directement par des organismes pathogènes. La liaison de l'ensemble de ces molécules à leurs récepteurs va conduire à l'activation de voies de signalisation cellulaire spécifiques (figure 5).

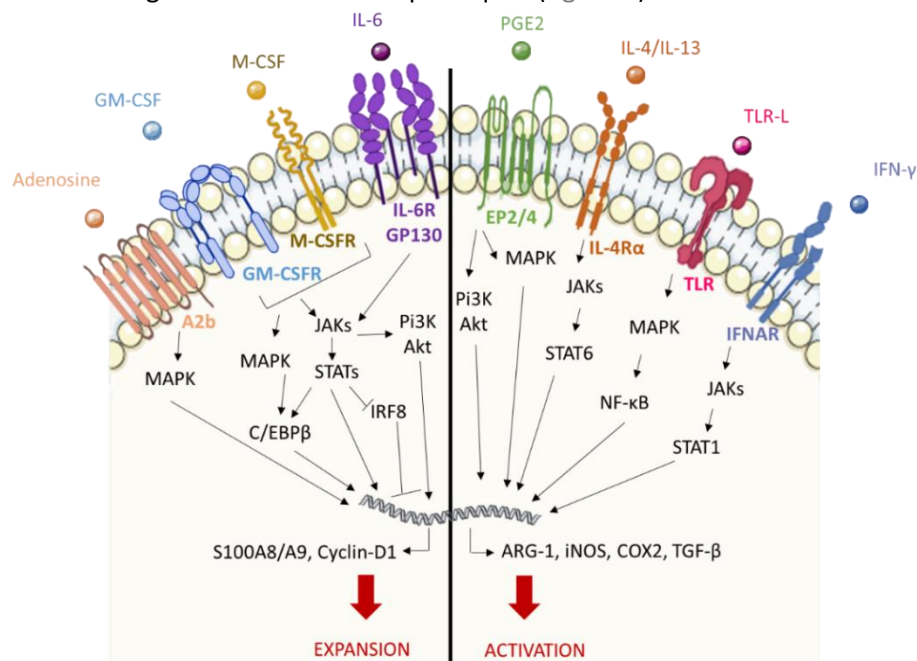


Figure 5 : Voies de signalisation impliquées dans l'expansion et l'activation des MDSC, inspiré de Li *et al.* 2021. Les facteurs de croissance comme le GM-CSF et le M-CSF, l'adénosine ou les cytokines comme l'IL-6 sont les promoteurs de l'expansion des MDSC. Les voies de signalisation activées sont JAKs-STATs, PI3K-Akt et MAPK, conduisant à l'expression notamment de la cycline-D1 et des protéines S100A8/A9 (alarmines). Les facteurs de croissance régulent à la baisse l'expression d'IRF-8, un inhibiteur de l'expansion des MDSC. Bien que les acteurs soient différents, les mêmes voies de signalisation sont impliquées pour l'activation des MDSC. L'activation de ces voies aboutie à la synthèse de facteurs inhibiteurs, tels que l'arginase-1 (ARG-1), *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), NADPH oxydase 2 (NOX-2), cyclooxygénase 2 (COX2) et le facteur de croissance transformant (TGF)- β .

STAT3 est le facteur de transcription jouant un rôle prépondérant dans la régulation de l'expansion et des fonctions des MDSC. En effet, une inhibition de ce facteur empêche la différenciation des MDSC (38). Par ailleurs, STAT3 augmente l'expression du complexe nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) *via* une augmentation de l'expression des sous-unités gp47 et gp91, ce qui entraîne une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés (ROS) et favorise ainsi la fonction suppressive des MDSC (41).

L'*Interferon Response Factor 8* (IRF8) est un facteur de transcription qui intervient dans la myélopoïèse. Chez les souris, une déficience en IRF8 conduit à une accumulation de MDSC dans la rate et au niveau des tumeurs (42). Par conséquent, IRF8 régule à la baisse l'expansion des MDSC.

Les C/EBP représentent une famille de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire. Bien que quatre membres de cette famille soient exprimés dans les cellules de la lignée myéloïde, seul C/EBP β est impliqué dans l'expansion des MDSC. Dans un contexte tumoral, la fréquence et les capacités suppressives des MDSC étaient diminuées chez les souris invalidées pour le gène *C/EBP β* (43).

Parmi les récepteurs de l'adénosine, A2b a été spécifiquement impliqué dans l'expansion des MDSC. Dans un modèle de tumeur pulmonaire chez des souris déficientes pour A2b, ces dernières présentaient une diminution des PMN-MDSC (44).

La voie de signalisation *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) est associée à la mise en place d'une réponse inflammatoire. Au sein de cette famille, il existe 5 sous-unités : p50, p52, c-rel, p65 (relA) et relB. Cette voie est impliquée dans l'expansion des MDSC et dans l'acquisition de leurs fonctions suppressives. Le facteur nucléaire NF- κ B est activé par différentes liaisons ligands-récepteurs. Parmi les récepteurs les plus couramment mentionnés dans la littérature, nous trouvons les *Toll Like Receptor* (TLR). En 2009, une étude avait montré que les MDSC de souris TLR4 $-/-$ ne produisaient plus d'IL-10, malgré leur activation par du lipopolysaccharide (LPS) (45). D'autres récepteurs, comme le récepteur du facteur de nécrose (TNFR)2, sont impliqués dans l'activation de la voie NF- κ B. L'équipe de Zhao *et al.* a mis en évidence dans un modèle murin, le rôle de TNFR2 dans la survie et l'accumulation des MDSC *via* l'augmentation de l'expression de *cellular caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein* (c-FLIP) et la diminution de la caspase 8 (46).

Plusieurs études ont aussi mis en avant le rôle du facteur de transcription STAT1 dans l'activité suppressive des MDSC. STAT1 est phosphorylé en présence d'IFN- γ et est impliqué dans la régulation à la hausse de la synthèse d'*inducible nitric oxide synthase* (iNOS) et d'arginase-1 (ARG-1). L'induction de tumeurs chez des souris STAT1 $-/-$ a permis de mettre en évidence le caractère indispensable de STAT1 dans le maintien de l'activité suppressive des M-MDSC (47). Cependant, l'activité des PMN-

MDSC était maintenue dans cette étude, ce qui suggère que la voie STAT1 pourrait avoir des effets différents sur les sous-groupes de MDSC (38).

STAT6 est également impliqué dans les propriétés suppressives des MDSC. Cette voie est activée par l'IL-4 ou de l'IL-13, deux cytokines Th2 qui se lient au récepteur IL-4R α commun au récepteur de l'IL-4 (IL-4R α et IL-4R β) et IL-13 (IL-4R α et IL-13R α). L'expression de l'IL-4R α est augmentée à la surface des MDSC présentes dans l'environnement tumoral. L'IL-4R α médie la production d'ARG-1 et favorise ainsi la capacité suppressive des MDSC (48).

La liaison de PGE2 sur son récepteur EP2/4 participe également à l'induction des MDSC (49).

Les M-MDSC ont la capacité de se différencier en PMN-MDSC sous l'effet de modifications épigénétiques conduisant à l'extinction du gène *retinoblastome* (RB1). A l'inverse, une forte expression de *RB1* entraîne une différenciation des M-MDSC en macrophage et DC (50).

3/ Mécanismes d'action

L'interaction *monocyte chemoattractant protein-1* (CCL2) / récepteur de chimiokine (CCR) 2 est la principale voie impliquée dans la migration des monocytes et des MDSC, en particulier des M-MDSC (51). Le recrutement des neutrophiles et PMN-MDSC sur le site inflammatoire dépend de l'interaction *chemokine (C-X-C motif) ligand* (CXCL)s - *chemokine receptor* (CXCR) 1/2 (52).

L'activité suppressive des MDSC sur les lymphocytes T (LT) est largement décrite dans la littérature. Plus précisément, les MDSC ont la capacité d'inhiber la prolifération des LT, d'inhiber leurs capacités fonctionnelles et de favoriser l'expansion des lymphocytes T régulateurs (Treg) (figure 6). Outre ces caractéristiques, les MDSC agissent sur d'autres cellules du système immunitaire telles que les cellules *Natural Killer* (NK), les macrophages et les DC. Par exemple, une équipe a rapporté que les MDSC étaient capables de supprimer la cytotoxicité des cellules NK en interagissant avec leurs récepteurs NKp30 chez des patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire (53). Une autre équipe a montré que les MDSC favorisaient la différenciation macrophagique vers un phénotype M2 et diminuaient la production d'IL-12 par les macrophages (54).

Les propriétés des MDSC reposent en premier lieu sur le métabolisme d'un acide aminé particulier : la L-arginine. En présence de l'enzyme iNOS (NOS2), ce composé va être transformé en NO puis en peroxynitrite (ONOO $\cdot$). L'oxygène intervenant dans cette dernière réaction va contribuer à la formation d'espèces réactives. L'ensemble des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RNS) peuvent induire des altérations empêchant l'activation et la fonction des LT. Par exemple, le peroxynitrite libéré par les MDSC a une action de nitration/nitrosylation sur le récepteur des LT (TCR), causant alors une

perturbation de la reconnaissance des peptides présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (55). Par ailleurs, il a été constaté que les MDSC, chez les patients atteints d'un cancer, inhibaient les fonctions des cellules NK mais que ces fonctions étaient retrouvées *in vivo* par l'inhibition d'iNOS (56).

NOX2, une enzyme appartenant à la famille des NADPH oxydase (NOX) et qui est responsable de la formation d'une grande quantité de ROS, est particulièrement active dans les MDSC et contribue à leur activité suppressive. Dans des modèles de tumeurs induites chez la souris, l'absence de NOX2 conduisait à la perte de la fonction des MDSC avec une incapacité à inhiber les LT (41). De plus, la suppression de NOX2 favorisait une différenciation des MDSC en macrophages et en DC (41).

Les MDSC séquestrent également certains acides aminés comme la L-arginine et la L-cystéine, privant ainsi les LT d'un TCR fonctionnel (57). Plus précisément, cette séquestration entraîne une diminution de l'expression de la chaîne ζ du TCR et stoppe la prolifération des LT. Cette stratégie favoriserait aussi la différenciation des LT en Treg.

La fonction suppressive des MDSC s'explique également par la production d'un grand nombre de molécules incluant des facteurs impliqués dans l'inflammation et sa résolution comme la PGE2, le TGF- β , l'IL-10, CCL2 et l'IFN- γ . La production de TGF- β , d'IFN- γ et d'IL-10 faciliterait l'expansion des Treg (58,59). De plus, les MDSC orchestreraient la différenciation des cellules Th17 en Treg, *via* la production de TGF- β et d'acide rétinoïque (60).

Les MDSC expriment à leur surface la galectine-9 et *programmed death-ligand 1* (PD-L1), deux protéines transmembranaires. En présence des LT, ces protéines rentrent en interaction avec TIM3 et PD-1 respectivement. Ces liaisons activent des voies d'inhibitions conduisant à l'apoptose des LT (61,62). De plus, l'expression membranaire de la *disintegrin and metalloprotease domain* (ADAM) 17 par les MDSC limite la circulation des LT naïfs et leur activation en diminuant l'expression de la L-sélectine (CD62L) à la surface des LT (63).

Les MDSC expriment également des ectonucléotidases de surface, comme CD39 et CD73, qui permettent de produire de l'adénosine (64). L'adénosine inhibe la prolifération et les fonctions des LT, des cellules NK et des DC. De plus, l'adénosine stimule l'expansion des Treg et augmente l'activité suppressive de ces cellules.

Comme déjà évoqué, les fonctions des MDSC diffèrent selon les sous-groupes. Ainsi, les propriétés suppressives des M-MDSC ciblent à la fois les réponses spécifiques et non spécifiques à un antigène car elles dépendent principalement de l'ARG-1, du NO et des cytokines. Quant aux PMN-MDSC, elles

inhibent principalement les réponses des LT spécifiques à l'antigène car leurs fonctions dépendent principalement des ROS et des RNS (49).

Notre compréhension des mécanismes d'action des MDSC repose essentiellement sur des études de cancérologie. La pertinence de ces résultats doit encore être démontrée dans d'autres contextes pathologiques.

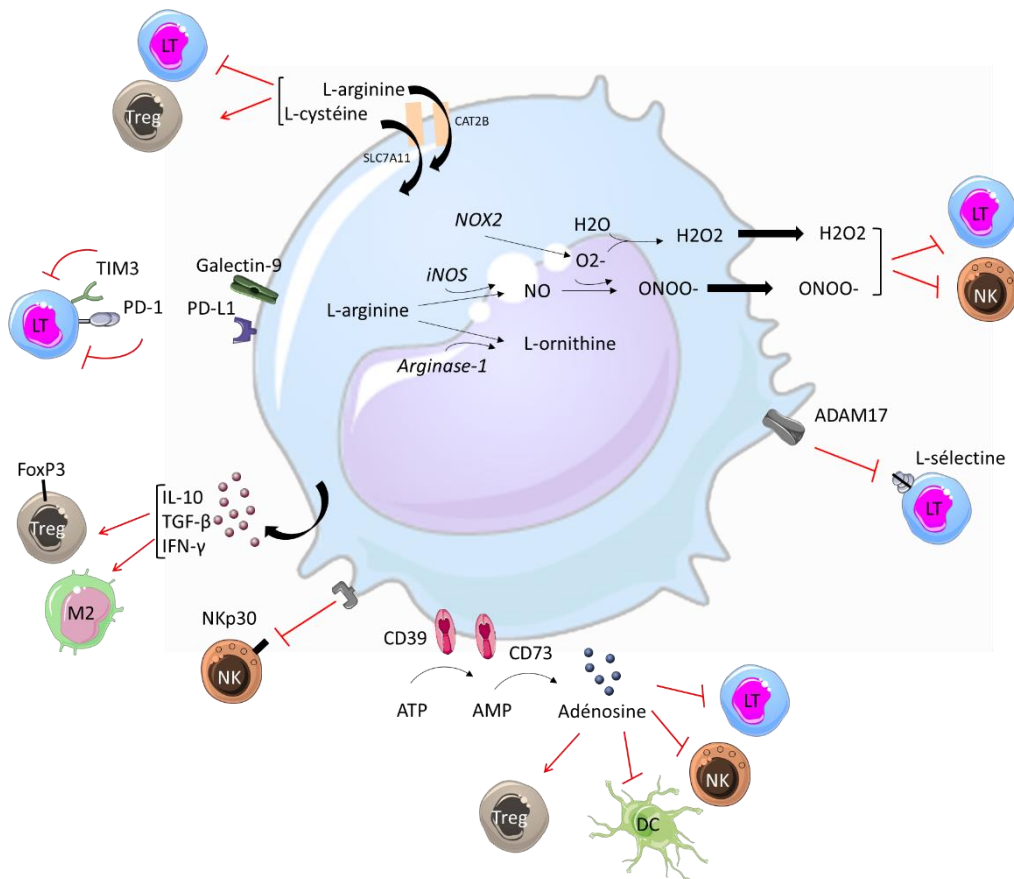


Figure 6 : Les principaux mécanismes d'immunosuppression des MDSC

Dépletion des acides aminés (L-arginine, L-cystéine) ; Génération d'espèces réactives de l'oxygène (H₂O₂) ou de l'azote (ONOO⁻) ; Libération d'adénosine ; sécrétion de cytokines (IL-10, TGF-β, IFN-γ) ; Engagement des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T (galectin-9, PD-L1, ADAM17).

DC = cellules dendritiques ; Treg = lymphocyte T régulateur ; NK = natural killer ; LT = lymphocyte T ; M2 = macrophage de type 2

4/ Intérêts thérapeutiques

La population de MDSC augmente dans un contexte pathologique, en particulier chez les patients atteints de cancer. Dans une étude ayant analysé 106 prélèvements sanguins de patients nouvellement diagnostiqués pour différents cancers, les MDSC circulantes étaient deux fois plus élevées chez les malades par rapport aux volontaires sains (65). De plus, une corrélation positive existait entre la quantité de MDSC circulantes et le stade clinique du patient. Les tumeurs détournent et amplifient l'activité suppressive des MDSC pour échapper à l'élimination par le système immunitaire. Les MDSC sont donc directement impliquées dans la persistance et la progression tumorale, freinant ainsi l'efficacité des traitements anti-cancéreux.

La capacité suppressive des MDSC, qui est délétère en cancérologie, en font à l'inverse un sujet d'intérêt majeur pour le développement de nouvelles thérapies cellulaires dans le domaine de la transplantation et des maladies inflammatoires et auto-immunes. En effet, les MDSC ont été décrites dans des pathologies plus diverses, en particulier en contexte d'inflammation chronique.

Des études ont montré le rôle des MDSC dans la polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type 1 (DT1), la sclérose en plaques, le lupus systémique ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Dans un article paru en 2019, les auteurs ont montré que le niveau de M-MDSC circulantes était augmenté chez des patients atteints de lupus systémique actif en comparaison à des témoins sains (66). De plus, le nombre de M-MDSC était positivement corrélé à la gravité de la maladie suggérant leur rôle dans la physiopathologie de cette maladie auto-immune. De même, chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, les proportions de MDSC circulantes et d'ARG-1 étaient augmentées de manière significative par rapport aux témoins sains (67). Le nombre de lymphocytes Th17 diminuait avec l'augmentation des MDSC. Cependant, une autre étude a montré que les MDSC pourraient favoriser l'apparition d'arthrite chez la souris en soutenant la différenciation Th17 (68), suggérant ainsi un rôle pro-inflammatoire de ces cellules. A notre connaissance, aucun essai clinique n'a, à ce jour, utilisé les MDSC pour le traitement de maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires.

Par ailleurs, des études se sont intéressées au rôle des MDSC dans le domaine de la transplantation (69). Ces cellules représentent une approche thérapeutique intéressante pour maintenir la tolérance immunitaire et diminuer le risque de rejet. Une équipe a mis en évidence l'émergence de MDSC chez les patients après une transplantation rénale (70). Ces cellules étaient fonctionnelles car elles inhibaient la prolifération des LT *in vitro*. De plus, l'étude a montré que ces MDSC favorisaient l'expansion de Treg.

Enfin, les MDSC sont impliquées dans des processus biologiques naturels où la tolérance immunitaire joue un rôle primordial. Par exemple, l'accumulation de MDSC pendant la grossesse a été décrite chez

la souris (71). Les MDSC joueraient un rôle dans la tolérance materno-fœtale en supprimant la réponse des LT *via* la régulation à la baisse de la L-sélectine. A l'inverse, l'équipe de Zhang *et al.* a montré qu'un taux élevé de PMN-MDSC était observé chez les patientes atteintes d'endométriose et qu'une réduction de ces cellules chez la souris améliorait le score clinique en réduisant les lésions de l'endomètre (72).

Les MDSC ouvrent donc la voie à de nouvelles investigations pour une meilleure compréhension des mécanismes physio(patho)logiques. Cependant, il reste difficile d'attribuer avec certitude un rôle pro ou anti-inflammatoire à ces cellules dont l'activité semble surtout être influencé par le milieu dans lequel elles se trouvent.

5/ Génération *ex vivo* et limites

Il existe aujourd'hui de nombreux protocoles de génération des MDSC. La plupart des études utilisent les cellules souches de la moelle osseuse comme précurseurs. Des niveaux élevés de GM-CSF sont nécessaires dans les cultures de cellules de la moelle osseuse pour leur différenciation en MDSC (73). La combinaison du GM-CSF et de l'IL-6 a également induit des MDSC avec une forte expression d'iNOS (74).

Apodaca *et al.* ont rapporté qu'une diversité de facteurs pouvaient influencer la quantification/qualification des MDSC. Parmi eux, la nature du prélèvement utilisé pour l'isolement des différentes populations de MDSC et le temps écoulé jusqu'au traitement de l'échantillon (75). L'une des principales difficultés réside dans l'absence d'un consensus permettant de définir les MDSC selon l'espèce et les conditions pathologiques. Pour répondre à ce besoin, un réseau européen de Chercheurs (Mye-EUNITER) a été créé en 2014. Par ailleurs, l'arrivée de nouvelles technologies comme le séquençage génomique de nouvelle génération pourrait également aider à identifier les profils transcriptomiques des différents sous-ensembles de MDSC.

6/ MDSC et vésicules extracellulaires

L'étude des vésicules extracellulaires (VE) s'est considérablement développée ces dix dernières années. Initialement décrites comme des déchets cellulaires, on leur reconnaît aujourd'hui un rôle majeur dans la communication intercellulaire et une implication dans de nombreux processus biologiques, tels que l'inflammation, la prolifération cellulaire, la réponse immunitaire, la fonction neuronale et l'angiogenèse (76). Plus récemment, leur rôle dans le développement et la progression de maladies, comme les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, auto-immunes ou les

cancers, a été mis en évidence. A ce titre, les VE sont de plus en plus envisagées comme biomarqueurs pour le diagnostic clinique (77).

La société internationale des vésicules extra-cellulaires (ISEV) est un regroupement de chercheurs dont les recommandations, mises à jour en 2018, tendent à homogénéiser la nomenclature et à mieux caractériser les populations de VE. La communauté scientifique s'accorde à distinguer trois types de VE en fonction de leur taille (78) : les exosomes dont la taille est comprise entre 30 et 150 nm de diamètre, les microvésicules de 100 à 1 000 nm et les corps apoptotiques dont le diamètre est supérieur à 1000 nm. Outre leur taille l'identification des VE est basée sur la densité des particules, la composition biochimique des membranes et leur biogenèse. En effet, l'origine de ces vésicules diffère (79) (figure 7) :

- Les exosomes sont synthétisés à l'intérieur des cellules. Ils proviennent de la voie endosomale dans laquelle les vésicules intraluminales (ILV) s'accumulent progressivement dans les endosomes multivésiculaires (MVE). Leur libération dans l'espace extracellulaire se fait par exocytose.
- Les microvésicules sont formées par bourgeonnement de la membrane cellulaire
- Les corps apoptotiques sont générés lorsque les cellules entrent en apoptose

En raison de la complexité et du manque de marqueur spécifique pour identifier ces différents sous-types, il est plus prudent d'employer le terme générique de VE.

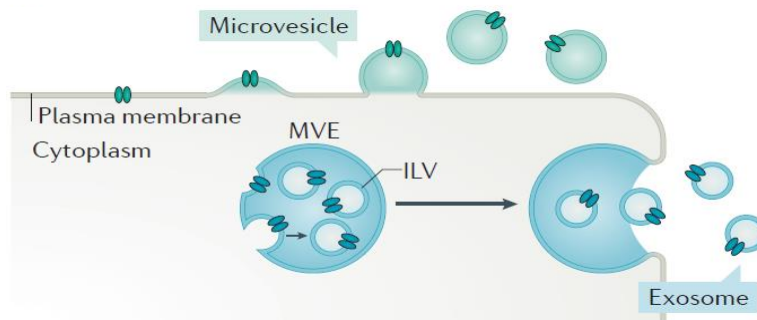


Figure 7 : Biogenèse des vésicules extracellulaires, d'après Van Niel *et al.* 2018

Les vésicules extracellulaires sont formées soit par bourgeonnement de la membrane plasmique, on parle alors de microvésicules, soit dans des vésicules intraluminales (ILV) s'accumulant dans les endosomes multivésiculaires (MVE), on parle alors d'exosomes.

Les VE sont présentes dans tous les fluides biologiques des organismes pluricellulaires. Une étude a estimé que le sang humain contenait environ 2×10^{21} « exosomes » (80). Les VE sont caractérisées par une bicouche lipidique et la présence de protéines transmembranaires (tétraspanines, molécules de CMH) à leur surface et de lipides (céramides, cholestérol) notamment. Elles transportent de

nombreuses molécules telles que des acides nucléiques (ADN, ARNm, microARN ou miR), mais aussi des protéines et lipoprotéines (protéines du cytosquelette, facteurs de croissance) et même des mitochondries (81) (figure 8). La composition de la membrane des VE ainsi que leur contenu dépendent de l'origine cellulaire de celles-ci et du contexte physiologique ou pathologique.

Les VE ont à la fois un effet autocrine/paracrine et également un effet endocrine (79). Elles interagissent avec leurs cibles par deux voies principales. De par la présence de molécules d'adhésion à leur surface, les VE ont la capacité de se lier à des récepteurs membranaires, comme les intégrines par exemple, entraînant alors l'activation de voies de signalisation. Par ailleurs, les VE peuvent être internalisées selon différents modes, comme la fusion des membranes ou la phagocytose. Les VE relarguent ainsi leur contenu directement à l'intérieur de la cellule cible.

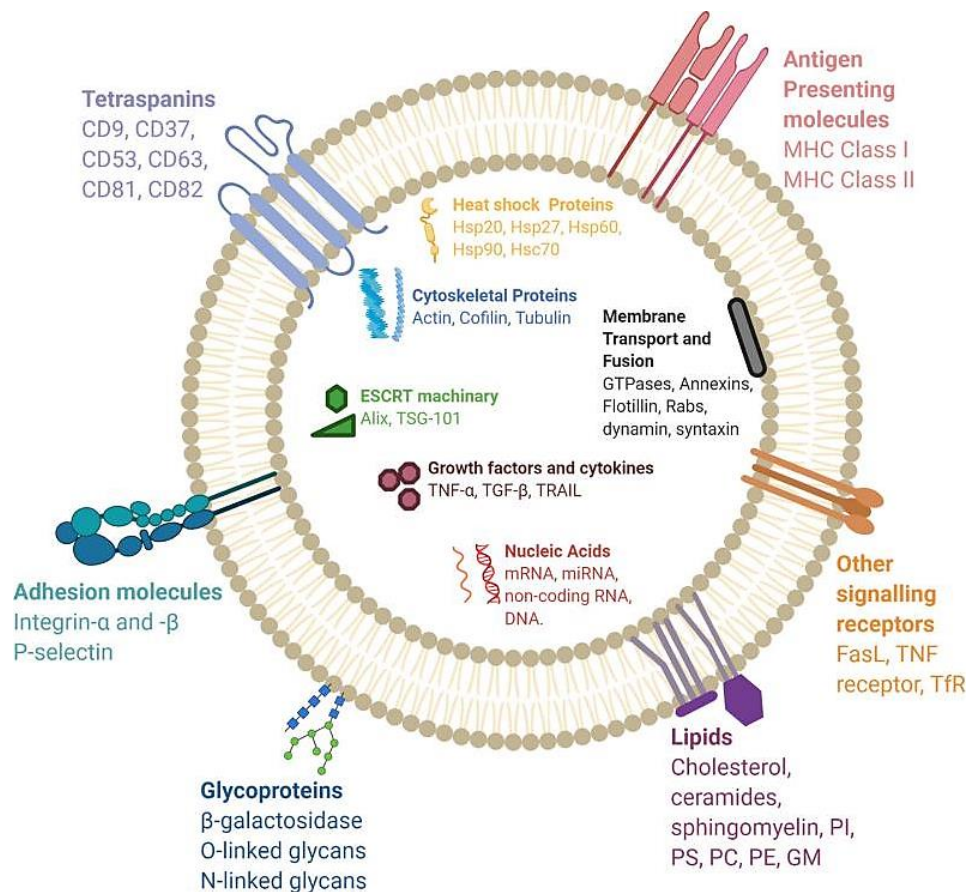


Figure 8 : Structure d'une vésicule extracellulaire, d'après Gurung *et al.* 2021

L'enveloppe des vésicules extracellulaires est composée de différentes protéines transmembranaires, de glycoprotéines, de lipides et de molécules d'adhésion. Elles transportent une grande variété de facteurs.

PI = phosphatidylinositol ; PS = phosphatidylsérine ; PC = phosphatidylcholine ; PE = phosphatidyléthanolamine ; GM = gangliosides ; ESCRT = *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* ; miRNA = micro ARN ; RNA = acide ribonucléique ; DNA = acide désoxyribonucléique ; Hsp = protéines de choc thermique ; TSG = *tumor susceptibility gene* ; TNF = facteur de nécrose tumorale ; TGF = facteur de croissance transformant ; TRAIL = *TNF-related apoptosis-inducing ligand* ; FasL = Fas ligand ; Tfr = récepteur transferrine

Les MDSC sécrètent des VE présentant une forte activité immunosuppressive. Dans l'étude de Geis-Asteggianti *et al.* les auteurs se sont intéressés aux VE produites par les MDSC dans un contexte tumoral chez la souris (82). Ils ont identifié plusieurs miR et ARNm transportés par ces vésicules et connus pour leur rôle immunosuppresseur. Cet exemple met en évidence les capacités d'immunomodulation des VE et leur intérêt dans l'étude d'autres populations cellulaires d'origine myéloïde présentant, comme les MDSC, des propriétés suppressives.

Outre leur intérêt dans le contrôle de la réponse immunitaire, le rôle des VE a été exploré dans d'autres phénomènes pathologiques comme la fibrose. Une étude a montré que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) dérivées du tissu adipeux et leurs VE présentaient *in vitro* la capacité d'inhiber la fibrose induite par le TGF- β 1 sur des fibroblastes sains (83). De plus, la pré-activation de ces VE avec de l'IFN- γ avait permis d'améliorer leurs effets anti-inflammatoires et anti-fibrosants, dans un modèle de souris traitées par acide hypochloreux (HOCl) (84). Cette dernière étude met en avant la possibilité de moduler l'activité des VE et ainsi de renforcer leur efficacité thérapeutique.

Partie III : Les cellules dendritiques tolérogènes

1/ Généralités et diversité

Les DC sont une population hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique CD34⁺. Elles ont été décrites pour la première fois en 1973 (85). Les DC ont deux origines, myéloïde et lymphoïde. Cependant la voie ontogénique complète des DC n'est pas encore claire et les données de différenciation des DC chez l'homme sont principalement obtenues par analogie et transposition de ce qui est démontré chez la souris (figure 9).

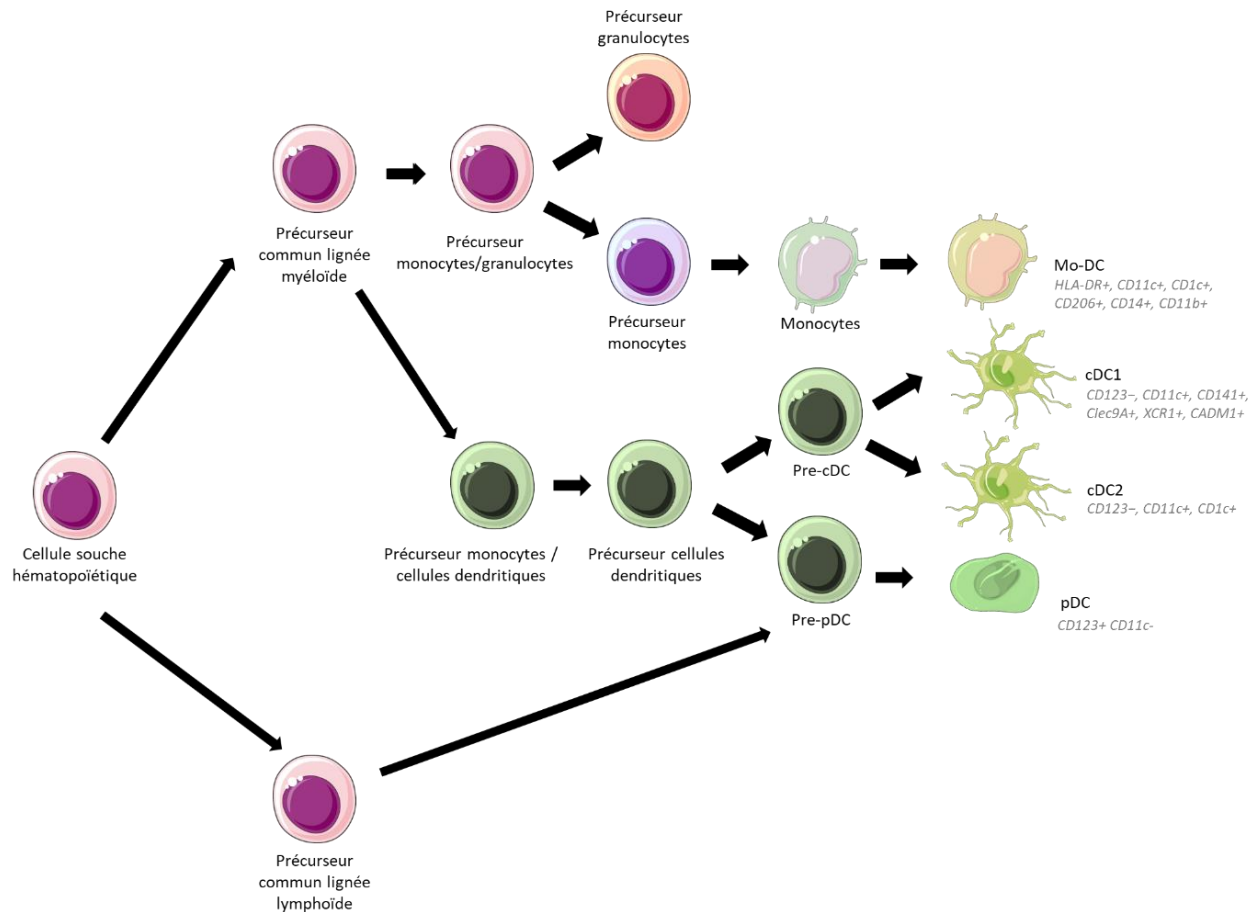


Figure 9 : Schéma de la génération des DC, inspiré d'Anderson *et al.* 2021

La lignée de DC dérive d'un précurseur commun avec les monocytes. Les précurseurs des DC se différencient en pré-pDC ou pré-cDC, donnant des pDC et des cDC respectivement. Les cDC sont séparées en deux sous-populations : les cDC1 et les cDC2. Les pDC se développent également à partir de la lignée lymphoïde. Les Mo-DC proviennent quant à eux des monocytes issus de la différenciation du précurseur des monocytes/granulocytes.

pDC = DC plasmacytoïdes ; cDC = DC conventionnelles ; Mo-DC = DC dérivées de monocytes

Une diversité de DC est décrite dans les différents tissus lymphoïdes ou non lymphoïdes. Dans le sang, les DC peuvent être divisées en deux sous-populations : les DC plasmacytoïdes (pDC, CD123⁺CD11c⁻) et les DC myéloïdes ou conventionnelles (cDC, CD123⁻CD11c⁺) (86). Plus récemment, de nouveaux antigènes ont été identifiés, permettant une meilleure discrimination entre ces populations cellulaires. Ainsi, les cDC ont été séparées en deux sous-populations : les cDC1 (BDCA-3 (CD141)⁺, Clec9A⁺, XCR1⁺, et CADM1⁺) et les cDC2 exprimant CD1c (86,87). BDCA-2 (CD303) et BDCA-4 (CD304) sont exprimés par les pDC. L'analyse par *single cell RNA sequencing* (scRNAseq) est une avancée considérable dans la compréhension des sous types de DC humaines. Une quatrième population de DC (AXL⁺ SIGLEC6⁺) a ainsi été identifiée, mais leur fonction reste encore mal connue (88).

Les cDC1 et les cDC2 sont également présentes dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. La sous-population cDC1 semble spécialement efficace pour effectuer des présentations croisées d'antigène (*cross presentation*) (89). Les cDC2 induisent des réponses Th1, Th2 et Th17 et favorisent l'expansion des Treg. Les cDC2 sont les DC myéloïdes les plus représentées dans le sang et présentent une hétérogénéité très importante en termes de marqueurs de surface, ce qui permet de différencier deux sous-ensembles de cDC2 : les DC2 et les DC3, qui diffèrent par l'expression de CD32B et CD163/CD36 (86,87).

Les pDC sont spécialisées dans la sécrétion d'IFN de type 1 (IFN- α et β) et participent à l'activation des lymphocytes. Elles jouent donc un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire antivirale (90).

Un autre groupe important de DC a été décrit. Il s'agit des DC dérivées de monocytes (Mo-DC). Ces cellules expriment à la fois les marqueurs classiques des DC comme HLA-DR, CD11c, CD1c, ainsi que des molécules exprimées par les monocytes/macrophages dont CD206, CD14 et CD11b (91). Décrites initialement chez la souris, de plus en plus de données montrent leur existence chez l'homme également. Un contexte inflammatoire favoriserait l'apparition de ces cellules, c'est pour cette raison qu'elles sont souvent appelées « DC inflammatoires ». Dès 1996, les DC inflammatoires ont été décrites dans la peau des patients atteints de dermatite atopique (92). Elles ont également été retrouvées dans la peau des patients atteints de psoriasis (93).

Si les auteurs s'accordent sur la présence de ces DC dans diverses maladies, il existe néanmoins une discordance quant à leur origine. L'équipe de Segura *et al.* a étudié ces DC dans des fluides inflammatoires humains (94). Ils ont montré leur présence dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et dans l'ascite inflammatoire de patients cancéreux non traités. Les DC inflammatoires produisaient essentiellement de l'IL-6, du TNF- α et de l'IL-1 β . Leurs travaux ont également montré que ces cellules présentaient un phénotype distinct des macrophages et des autres DC, mais partageaient en revanche des signatures géniques communes avec les DC dérivées de monocytes *in vitro*. Ces résultats appuient l'idée que les monocytes recrutés sur les sites inflammatoires pourraient se différencier en Mo-DC.

A l'inverse, d'autres études suggèrent que les DC inflammatoires proviendraient d'une différenciation ou d'une maturation des DC conventionnelles plutôt que des monocytes. Dans une étude parue en 2019, les auteurs ont décrit une expansion de DC3 pro-inflammatoires qui était corrélée à la progression de la maladie chez des patients atteints de lupus systémique (95).

2/ Rôle des DC dans l'activation immunitaire adaptative et le maintien de la tolérance immunitaire périphérique

Les DC sont les sentinelles de la réponse immunitaire. Elles jouent un rôle clé dans le maintien de l'intégrité de l'organisme et dans la conservation de l'homéostasie, en régulant les réponses immunitaires adaptatives et innées. Les DC sont les cellules présentatrices d'antigène (CPA) les plus efficaces de l'organisme. Elles présentent deux états fonctionnels différents : l'état dit « immature » et l'état dit « mature » (figure 10). Dans un contexte physiologique, les DC ne reconnaissent pas de signal danger et sont donc dans un état immature ($CCR6^+$, FcR^+). En présentant des auto-antigènes, elles vont alors favoriser un environnement pro-toléro-gène (ToIDC), qui est un des mécanismes de la tolérance périphérique. A l'inverse, dans un contexte pathologique, les DC immatures reconnaissent un signal danger *via* leurs récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PPR), comme les TLR. Ces signaux dangers sont codés par des modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) et des motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP). Lorsque qu'elles reconnaissent ces signaux, les DC subissent alors un processus de maturation se traduisant par une forte expression des CMH de classe I et II, des molécules de co-stimulation CD80/83/86, de CD40 et de CCR7. De plus, les DC matures expriment des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires. Enfin, elles acquièrent la capacité d'activer les LT naïfs (87,96).

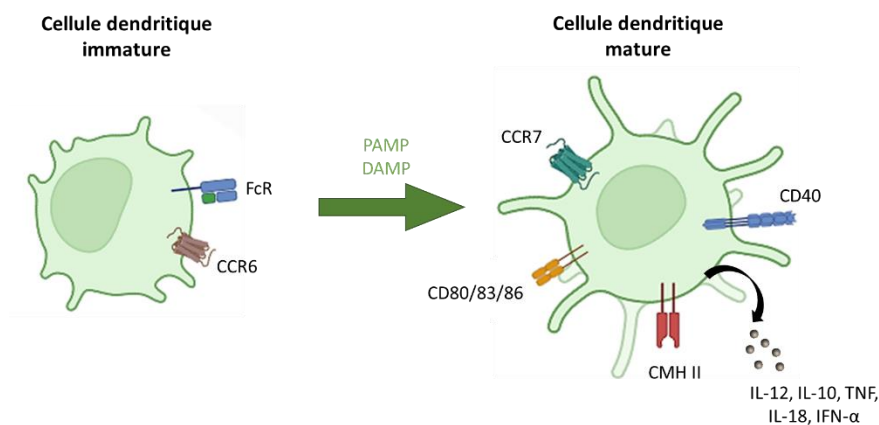


Figure 10 : Caractérisation et activation des DC, inspiré de Patente *et al.* 2019

Les DC immatures ont une surface ronde et lisse. Elles sont caractérisées par un phénotype $CCR6^+$, FcR^+ , $CCR7^-$, $CD80/83/86^-$, $CMHII^-$, $CD40^-$. La maturation des DC est déclenchée par la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou de motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP). Les DC matures ont une surface rugueuse avec plusieurs pseudopodes. Elles sont caractérisées par un phénotype $CCR6^-$, FcR^- , $CCR7^+$, $CD80/83/86^+$, $CMHII^+$, $CD40^+$, et produisent des cytokines pro-inflammatoires comme des interleukines (IL), du facteur de nécrose tumoral (TNF) et de l'interféron alpha (IFN- α).

En présentant l'antigène, les DC activent les LT naïfs dans les organes lymphoïdes primaires (thymus) et secondaires (rate, ganglions lymphatiques) et induisent la réponse immunitaire adaptative (figure 11). Plus précisément, les DC présentent les antigènes, exogènes ou endogènes, sous forme de peptides après les avoir apprêtés dans le CMH de surface. En dehors de la *cross presentation*, le CMH de classe I présente des peptides issus d'antigènes endogènes aux LT CD8⁺ et le CMH de classe II des peptides issus d'antigènes exogènes à des LT CD4⁺. Le complexe CMH/peptide interagit avec le TCR. Cette interaction constitue le premier signal du LT. Un second et un troisième signal sont indispensables à l'activation des LT. Le second signal dépend de l'interaction entre des molécules co-stimulatrices (CD80/83/86) sur la DC et CD28 sur les LT. Suite à ces deux signaux, des voies de signalisation s'activent au sein du LT, conduisant en particulier à la translocation de NFAT dans le noyau, ce qui aboutit à la production d'IL-2, qui a une activité autocrine sur le LT lui-même. Exposé à l'IL-2 qu'il produit lui-même, le LT, qui est devenu très sensible à cette cytokine grâce à l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) suite aux deux premiers signaux d'activation, va entrer en cycle *via* l'activation du complexe *mammalian target of rapamycin* (mTOR) et proliférer de façon clonale. Ensuite, les cytokines présentes dans l'environnement vont contribuer à la polarisation des LT vers les principales sous-populations de LT CD4 dit LT *helper* : Th1 (en présence d'IL-12 et IFN- γ), Th2 (en présence d'IL-2 et IL-4), Th17 (en présence d'IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-21 et/ou IL-23) et Treg (en présence d'IL-2 et TGF- β) (97).

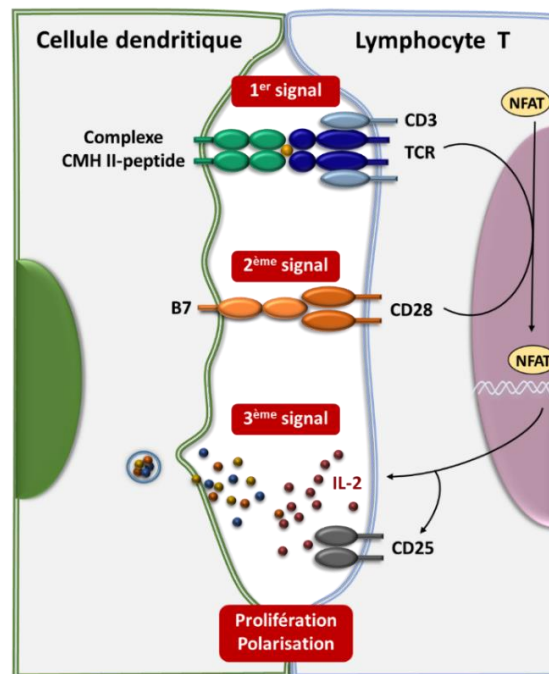


Figure 11 : Activation des lymphocytes T par les DC matures, inspiré de Patent *et al.* 2019

Signal 1 : le TCR se lie au complexe CMH-peptide de manière spécifique. Signal 2 : engagement des molécules de costimulation CD28 - CD80/CD86 (B7). Signal 3 : Translocation nucléaire de NFAT conduisant à la production d'IL-2 et à la maturation de son récepteur (CD25), responsable de la prolifération des LT. La libération de cytokines dans le microenvironnement entraîne la polarisation des lymphocytes.

TCR = *T Cell Receptor* ; CMH = Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Le rôle de la DC dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative est donc bien connu, mais ces cellules jouent également un rôle clé dans le maintien de la tolérance immunitaire périphérique. Certaines études ont suggéré l'existence d'un sous-type de DC qui seraient impliquées spécifiquement dans la tolérance immunitaire, alors que d'autres études indiquent que l'ensemble des DC pourrait favoriser la tolérance et que cela est plutôt dépendant de leur état de maturation. Quoi qu'il en soit, les TolDC vont présenter des auto-antigènes aux LT afin de maintenir un état de tolérance immunitaire vis à vis de ces antigènes. L'objectif est d'empêcher la formation de LT auto-réactifs et, à plus long terme, d'éviter la mise en place d'une réponse humorale et plus globalement d'une mémoire immunitaire. Les TolDC sont caractérisées par une faible expression des molécules de co-stimulation mais une forte expression des récepteurs inhibiteurs à leur surface. Elles correspondent donc à des DC immatures ($CCR6^+CMH-II^{low}$) avant qu'elles n'aient reconnu un signal danger. L'interaction avec les LT se fait aussi entre le TCR et le complexe CMH-peptide, mais sans liaison des molécules de co-stimulation, ce qui entraîne une faible production d'IL-2 qui est insuffisante pour induire l'activation des LT. Les LT vont donc rester anergiques, c'est-à-dire que la cellule est incapable de répondre à l'antigène, voire entrer en apoptose ou se différencier en Treg (98).

3/ Mécanismes immunosuppresseurs

Il existe de nombreux mécanismes pour expliquer l'activité tolérogène des TolDC, comprenant des mécanismes dépendants d'un contact cellulaire et d'autres indépendants de ce contact (figure 12).

Les LT peuvent interagir avec la DC *via* des récepteurs inhibiteurs comme *programmed cell death protein 1* (PD-1) - PD-L1 ou CD80/86 - CTLA-4, ce qui conduit à une inhibition fonctionnelle du LT. Dans un modèle *in vivo*, le blocage de PD-L1 avait accéléré le rejet d'une greffe de peau, de la même manière que le blocage de CTLA-4 (99). De plus, l'inhibition de PD-L1 avait entraîné une augmentation de la prolifération des LT, favorisé leur différenciation en lymphocytes Th1 alloréactifs et avait réduit l'apoptose des LT. Dans une autre étude, les auteurs ont montré chez des rats ayant reçu une transplantation rénale, que la transfection du gène *PDL1* aux DC réduisait leur capacité à activer, faire proliférer et induire la production de cytokines à des LT CD8 (100).

D'autres acteurs sont impliqués dans le maintien de la tolérance par les DC comme *Inducible Co-Stimulator ligand* (ICOS-L). Ce ligand est exprimé par les DC, il appartient à la famille des molécules de co-stimulation B7 et se lie à son récepteur ICOS à la surface des LT. Une étude a montré que l'inactivation d'ICOS dans des LT n'induisait pas d'anergie de ces cellules (101). De plus, l'interaction ICOS/ICOS-L stabilisait l'expression de l'IL-10R à la surface des LT, les rendant ainsi plus sensibles aux effets de l'IL-10 produite par les DC.

Les TolDC expriment également des transcrits de type immunoglobuline (ILT). Une étude chez des patients transplantés a montré que des cellules Treg (CD8⁺CD28⁻) induisaient une régulation à la hausse de l'ILT3 et de l'ILT4 à la surface des DC et des monocytes rendant ces CPA capables d'induire une perte de la capacité de prolifération des LT CD4⁺ (102). ILT3 et ILT4 appartiennent à la classe des récepteurs inhibiteurs et contribuent aux propriétés inhibitrices des TolDC *via* l'inhibition de l'activation du facteur NF-κB.

Le ligand Fas (FasL) des DC est également impliqué dans la fonction tolérogène de ces cellules. Il se lie au récepteur Fas à la surface des LT. Dans une étude *in vitro*, il a été montré que la transfection de *FasL* dans des DC augmentait significativement leur capacité à induire l'apoptose des lymphocytes (103). Par ailleurs, chez la souris, la transfusion de ces cellules avait significativement prolongé la survie des greffes cardiaques (103).

Outre l'implication de ces nombreux récepteurs nécessitant un contact étroit des DC avec leurs cellules cibles, les TolDC possèdent un sécrétome riche. Elles sécrètent peu de cytokines pro-inflammatoires mais de grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF-β, ou des molécules immunomodulatrices comme l'hème-oxygénase-1 (HO-1), IDO, iNOS et l'ARG-1.

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire impliquée dans la différenciation de plusieurs populations cellulaires, et en particulier dans l'induction de Treg (104). Lorsque FasL et l'IL-10 sont surexprimés par les DC, la capacité d'inhibition des LT est renforcée et la survie des allogreffes est améliorée, en comparaison avec FasL seul (105). L'IL-10 active le récepteur tyrosine kinase IL-10R conduisant à une activation de la voie de signalisation STAT3 qui aboutit à l'inhibition de NF-κB (104).

Le TGF-β est une cytokine avec un effet pléiotrope. Elle participe au maintien des fonctions des TolDC. Elle altère d'une part l'activité des LT CD4⁺ et CD8⁺, et d'autre part, elle favorise l'expansion des Treg. Dans une étude portant sur des souris KO pour le récepteur TβRII à la surface des DC, les animaux mouraient avant l'âge de quinze semaines et présentaient une inflammation systémique, un développement de maladies auto-immunes et une activation spontanée des LT et LB (106). De manière intéressante, les souris montraient une expression atténuée de Foxp3 sur les Treg. Par ailleurs, le TGF-β participerait à la régulation d'autres facteurs impliqués dans le maintien de la tolérance immunitaire. Dans une autre étude, le traitement des pDC de souris avec du TGF-β entraînait une augmentation de l'expression de IDO et modulait l'activité immunosuppressive de ce facteur (107).

Les TolDC seraient également capables de produire une grande quantité de lactate et retarderaient ainsi *in vivo* la GVH en réduisant la capacité de prolifération des LT (108). De même, les résultats d'une étude ont indiqué que les TolDC produisaient de l'IL-35, qui serait directement liée au potentiel tolérogène de ces cellules (109).

HO-1 est une enzyme qui catalyse la conversion de l'hème en biliverdine, ion ferreux et monoxyde de carbone. Ce dernier altère la prolifération des lymphocytes en agissant *via* la voie des caspases (110). HO-1 agit contre le stress oxydatif et l'inflammation. Dans une étude, les DC générées ont été traitées avec du chlorure de cobalt permettant ainsi d'induire la production d'HO-1. Les auteurs ont ensuite montré que HO-1 entraînait une augmentation du niveau d'IL-10 par les DC et permettait à ces cellules de conserver un phénotype anti-inflammatoire malgré leur culture en présence de LPS (111). De plus, *in vitro* et *in vivo*, les auteurs ont mis en avant une différenciation des LT en Treg exprimant Foxp3. Enfin, ils ont montré que les DC surexprimant HO-1 modulaient la sévérité de la réponse inflammatoire dans deux modèles murins d'inflammation des voies respiratoires (111).

L'expression d'IDO dans les DC participe à la modulation de la réponse immunitaire. Cette enzyme régule le métabolisme du tryptophane par la voie de la kynurénine. Dans une étude, les DC transfectées avec le gène de l'IDO supprimaient la prolifération des LT et induisaient leur apoptose *in vitro* (112). *In vivo*, ces cellules modifiées induisaient encore l'apoptose des LT et favorisaient également une réponse Th2. La surexpression d'IDO chez les DC atténuait globalement le rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez la souris (112).

Comme cité précédemment, iNOS et ARG-1 sont des acteurs récurrents dans la modulation de l'immunité. L'utilisation d'un inhibiteur d'iNOS permet de rétablir la prolifération des LT chez des souris. De plus, l'expression d'iNOS entre en jeu dans la prolongation de la survie des greffes cardiaques (113). De même, une autre étude a montré l'importance du métabolisme de la L-arginine *via* iNOS et ARG-1 dans les TolDC. En effet, dans ce travail, les auteurs ont montré que l'acide rétinoïque améliorait à la fois l'expression d'ARG-1 et d'iNOS dans les DC, ce qui entraînait un phénotype tolérogène (114).

Par privation en L-Arginine et en L-Tryptophane dans l'environnement, les TolDC peuvent agir indirectement sur le métabolisme des lymphocytes et préserver un état tolérogène.

Enfin d'autres molécules, telles que la thrombospondine-1 (TSP-1), la PGE2 et l'adénosine pourraient également jouer un rôle dans l'effet tolérogène des TolDC (115).

Un défaut de ces mécanismes peut conduire au développement d'une maladie auto-immune, c'est-à-dire à une rupture de la tolérance immunitaire.

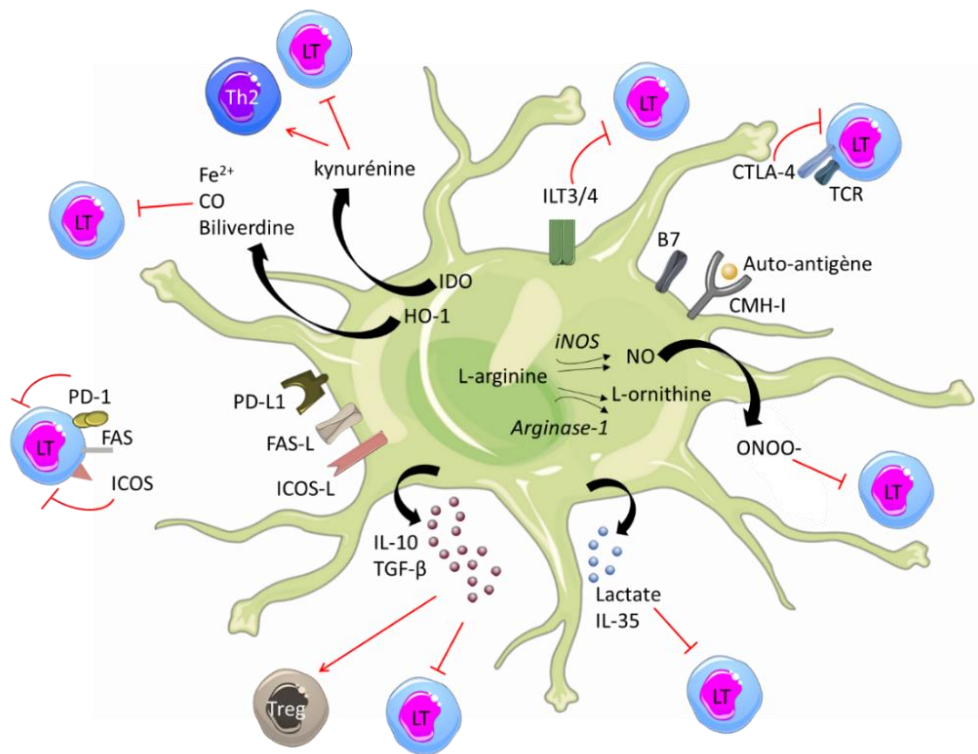


Figure 12 : Les principaux mécanismes d'immunosuppression des TolDC

Privation en L-Arginine et en L-Tryptophane dans l'environnement ; Expression d'iNOS et arginase-1, et génération d'espèces réactives de l'azote (ONOO⁻) ; Sécrétome riche avec des cytokines (IL-10, TGF-β, IL-35) et des molécules immunomodulatrices (HO-1, IDO, lactate) ; Engagement des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T grâce à PD-L1, FAS-L, ICOS-L, CD80/CD86 et ILT3/4.

ILT = transcrits de type immunoglobuline ; PD = *Programmed cell death* ; ICOS = co-stimulateur inductibles ; FAS = *TNF Receptor Superfamily, Member 6* ; IDO = indoleamine 2,3-dioxygénase ; HO-1 = hème-oxygénase-1

4/ Intérêts thérapeutiques

L'injection de DC a été testée dans plusieurs maladies pour lesquelles un désordre immunologique était en cause. Les premières études se sont intéressées au DT1. Dans un essai clinique de phase I, des DC dérivés de monocytes autologues ont été injectées chez des patients atteints de DT1 (116). La sécurité et la tolérance des injections intradermiques ont été démontrées. De plus, les DC ont régulé à la hausse la fréquence d'une population de lymphocytes B (LB) (B220⁺ CD11c⁻) dans le sang des patients, suggérant un effet bénéfique de cette thérapie.

Une étude de phase I a montré l'innocuité et la tolérance de l'administration de TolDC autologues chez des patients atteints de la maladie de Crohn (117). Les injections ont été réalisées par voie intrapéritonéale, en dose unique ou toutes les deux semaines pendant douze semaines. Les neuf patients inclus ont ensuite été suivis pendant un an. Les auteurs ont conclu que les DC injectées ne représentaient pas de danger pour les patients.

Une autre étude de phase I visant à évaluer l'innocuité et la faisabilité d'un traitement par TolDC chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde active a été menée (118). Des TolDC autologues ont été injectées par voie intra articulaire à différentes concentrations. Au quatorzième jour après l'injection, une synovite était présente chez tous les participants à l'exception de deux patients qui avaient reçu la dose maximale de DC (10×10^6) et dont le score clinique avait diminué. Les patients sont restés sous observation jusqu'au quatre-vingt-onzième jour. En comparant les dix patients traités avec les TolDC et les trois patients ayant reçu du sérum physiologique, les auteurs ont confirmé que cette thérapie était sûre et faisable. De plus, les symptômes au niveau du genou se sont stabilisés chez deux patients, laissant envisager un effet bénéfique de ce traitement. Ces résultats nécessitent bien sûr d'être confirmés dans une plus grande cohorte.

Pour aller plus loin, une équipe s'est intéressée à la rééducation du système immunitaire pour stopper les mécanismes auto-immuns. Un essai clinique de phase I a été mené chez huit patients atteints de sclérose en plaques et quatre patients atteints de troubles du spectre de la neuromyéélite optique (119). L'objectif était d'injecter en intraveineux des TolDC chargées de peptides pour induire une réponse immunitaire tolérogène chez ces patients. Les injections ont eu lieu en trois fois, séparées par deux semaines. Les peptides chargés étaient divers antigènes de la myéline ainsi que des peptides dérivés de l'aquaporine-4 (AQP4), des antigènes pris pour cible par la réponse humorale et cytotoxique de ces patients. L'administration de cette thérapie s'est révélée sûre et faisable. De plus, cette étude a mis en avant une induction de Treg sécrétant de l'IL-10 chez les patients traités. Ce résultat encourageant suggère que les TolDC ont engendré une tolérance spécifique aux antigènes injectés avec les DC.

De par leurs propriétés tolérogènes, les DC se sont imposées comme un outil de choix dans la prévention du rejet de greffe. La faisabilité, l'innocuité, le devenir et l'efficacité de ces cellules chez l'Homme sont autant de questions qui se posent aujourd'hui. Cependant, il n'existe pas d'étude à notre connaissance rapportant l'efficacité de TolDC en transplantation humaine. Des études présentent néanmoins des résultats encourageants sur des modèles de primates. Une équipe a généré des DC *ex vivo* à partir de monocytes, avant de les injecter par voie intraveineuse à des macaques, sept jours avant leur transplantation rénale. Les auteurs ont rapporté une amélioration significative de la survie de l'allogreffe rénale. En effet, la durée médiane de survie du greffon était de 39,5 jours chez les singes témoins et de 113,5 jours chez les singes traités avec les DC (120).

5/ Génération *ex vivo*

Chez les rongeurs, les DC sont principalement issues des cellules de la moelle osseuse. Chez l'homme, les DC sont habituellement générées *ex vivo* à partir de monocytes sanguins. Il s'agit en effet de la source la plus abondante et la plus accessible. La différenciation s'effectue en présence de GM-CSF ou de GM-CSF et d'IL-4 (121). Pour induire des TolDC, cette différenciation peut être renforcée par une supplémentation du milieu de culture avec des agents pharmacologiques et biologiques. Les agents les plus utilisés comprennent des vitamines (A, D3) et des immunosuppresseurs comme la rapamycine (inhibiteur de mTOR) ou la dexaméthasone (corticoïde) (122,123). L'IL-10 et le TGF- β sont les deux cytokines les plus utilisées pour induire des TolDC *ex vivo*.

D'autres agents permettant une différenciation des monocytes en TolDC ont également été cités dans la littérature. C'est le cas notamment des corticoïdes, divers immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus, acide mycophénolique), de l'aspirine, de l'atorvastatine et de la minocycline (123). Enfin, d'autres cytokines sont connues pour induire la différenciation des monocytes en TolDC telles que le TNF- α , l'IFN- γ , le facteur de croissance des hépatocytes ou l'IL-21 (123).

Partie IV : Les macrophages régulateurs

1/ Généralités

C'est dans les années 1980 qu'a été pour la première fois rapporté que l'IFN- γ produit par les Th1 pouvait activer les macrophages (124). Au début des années 1990, de nouvelles études ont montré que l'IL-4 et l'IL-13 produites par les lymphocytes Th2 jouaient également un rôle dans l'activation des macrophages et que ces derniers étaient phénotypiquement différents des premiers macrophages décrits (125). Ainsi, les macrophages activés « classiquement » par l'IFN- γ ont été opposés aux macrophages activés de « manière alternative » par l'IL-4/IL-13.

En 2000, l'équipe de Mills *et al.* observe un métabolisme différent de l'arginine entre les macrophages de deux souches de souris, les C57BL/6 et les BALB/c (126). Sur la base de ces études, l'équipe propose alors de préciser la classification des macrophages et propose pour la première fois les termes de macrophage M1 et M2 (126,127) (figure 13). Dans ce nouveau système, les macrophages M1 représentaient les macrophages « classiquement activés » avec des propriétés pro-inflammatoires tandis que les macrophages M2 étaient désignés comme les macrophages « activés de manière alternative », impliqués dans la réparation et le remodelage des tissus. Les macrophages M2 étaient divisés en quatre sous-ensembles, en fonction des *stimuli* reçus. L'IL-4 et l'IL-13 induisent une différenciation en macrophages de type M2a, dont la fonction est d'éliminer les débris lors de la

réparation tissulaire et de favoriser une réponse Th2. Les complexes immuns, le LPS et l'IL-1 β favorisent la différenciation en macrophages de type M2b, jouant un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire. Les macrophages M2c sont induits par la présence d'IL-10 ou de TGF- β et sont impliqués dans l'inhibition de la réponse immunitaire et induisent la réparation et le remodelage des tissus. Enfin, l'IL-6 permet une différenciation en macrophages de type M2d. Ces derniers ont une activité pro-angiogénique et sont associés à une progression tumorale (127).

Cependant, cette classification est aujourd'hui remise en cause. En effet, il est apparu que de nombreux autres médiateurs de l'activation des macrophages existaient et engendraient une diversité de phénotypes, suggérant ainsi que le modèle proposé par Mills est trop restrictif et qu'il existe plutôt un *continuum* d'états dépendant du microenvironnement.

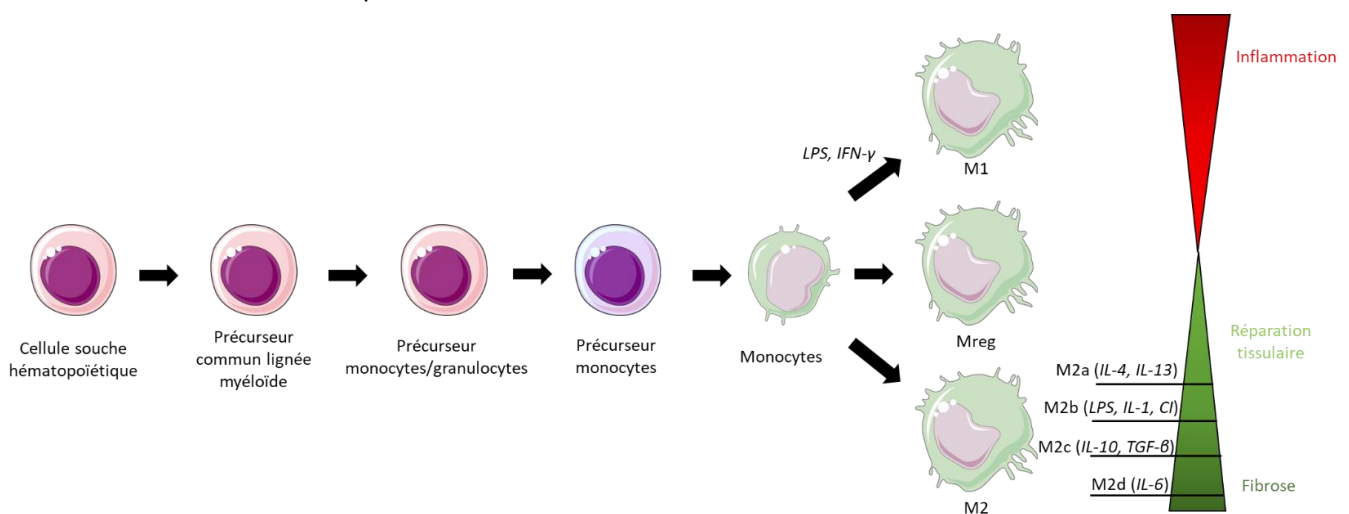


Figure 13 : Classification et polarisation des macrophages, inspiré de Benedetto *et al.* 2019

Les monocytes se différencient en macrophages sous l'effet de différents *stimuli*. La polarisation en macrophages pro-inflammatoires M1 est induite par l'IFN- γ ou le LPS par exemple. Les macrophages anti-inflammatoires M2 sont classés en M2a (induit par l'IL-4 et l'IL-13), M2b (induit par le LPS, l'IL-1 et les complexes immuns), M2c (induit par l'IL-10 et le TGF- β) et M2d (induit par l'IL-6 et l'adénosine A2a). Les Mreg représentent un groupe distinct de macrophages par rapport aux macrophages M1 et M2 classiquement décrits.

Les Mreg possèdent un phénotype et un profil d'expression génique distinct des macrophages dits M1 ou M2, bien qu'il puisse être parfois difficile de faire la distinction entre les macrophages M2 et les Mreg. Il n'existe aucun consensus autour du phénotype des Mreg. Il semblerait qu'un panel de marqueurs de surface puisse être identifié en fonction des conditions. Chez la souris, une étude *ex vivo* a défini les Mreg par un phénotype CD11b⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ MHCII⁺ CD169⁺ Dectin-1⁺ (128). Une autre étude a défini les Mreg par un phénotype CD11b⁺ CSF1R⁺ Ly6C^{low} Ly6G⁻ CD169⁺ dans un contexte de transplantation cardiaque (129). Chez l'homme, les Mreg ont un phénotype CD14^{-/low} CD16^{-/low} TLR2⁻ CD163^{-/low} (130). En revanche, ils expriment les marqueurs CD80 et CD86 (130,131). L'expression de la déshydrogénase réductase 9 (DHRS9) est également notable, d'autant plus que ce marqueur semble

être relativement spécifique et stable chez les Mreg humains générés *in vitro* (132). La capacité à induire une réponse spécifique à l'antigène est limitée chez les M2 en raison du faible niveau d'expression des molécules HLA. A l'inverse, les Mreg présentent un niveau d'expression élevé du système HLA de classe II (133). De plus, les Mreg n'expriment pas FIZZ1 (resistin-like molecule- α ou ReLM α) et YM1, deux marqueurs retrouvés dans les macrophages M2 (134). Enfin, les Mreg ne contribuent pas à la production de la matrice extracellulaire (ECM), contrairement aux M2 (131).

2/ Induction des Mreg *in vivo*

Les infections sont impliquées dans l'induction des Mreg. Une étude de 2014 a rapporté qu'une infection par *Helicobacter pylori* favorisait la polarisation des macrophages vers un phénotype régulateur (135) (figure 14). D'autres études ont montré que les infections parasitaires pouvaient également induire une reprogrammation des macrophages vers un phénotype Mreg. C'est notamment le cas dans la leishmaniose cutanée diffuse, une pathologie due au parasite *L. amazonensis* (136). Les auteurs soulignent que cette repolarisation aiderait le parasite à échapper au contrôle du système immunitaire, conduisant à une infection chronique de l'hôte. L'infection de souris par des larves de *Brugia malayi* favoriserait également la polarisation des macrophages M2 en Mreg capables de sécréter d'importantes quantités d'IL-10 et de PGE2 (137). De plus, cette étude a montré que l'expression des sous-unités NF- κ B-p65 et NF- κ Bp50/105 était altérée dans ces Mreg. Par ailleurs, une étude sur une infection au trématode *Fasciola hepatica* a mis en évidence l'implication de la voie des Smads dans les modifications phénotypiques des Mreg (138). En effet, FhTLM, une molécule sécrétée par le parasite et proche du TGF- β , se lie avec une grande affinité au T β RII. Cette liaison entraîne l'activation de la voie Smad 2/3 entraînant les changements phénotypiques des macrophages. Les Mreg générés exprimaient à leur surface CD206 et PD-L1 et sécrétaient des niveaux élevés d'IL-10 et d'ARG-1. En revanche, ces cellules étaient définies par une faible expression d'IL-12 et de NO (138).

Par ailleurs, il a été démontré qu'une expansion des Mreg était observée chez des patients sous traitement. L'infliximab, un anticorps monoclonal dirigé contre le TNF- α , induit par exemple la production de Mreg chez des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (139). *In vitro*, ces cellules permettaient d'induire la cicatrisation des muqueuses. De plus, l'infliximab associé à l'azathioprine, un des immunosuppresseurs utilisés dans le traitement des MICI, augmentait le nombre de Mreg et leurs capacités fonctionnelles par rapport aux macrophages induits par l'infliximab en monothérapie. Récemment, il a été confirmé *in vitro* que les anticorps monoclonaux anti-TNF- α induisaient la production d'IL-10 par les Mreg de manière dépendante du récepteur fragment cristallisable (Fc) γ (140). De plus, la même équipe a montré *in vivo* que l'efficacité des anti-TNF- α et la polarisation des macrophages seraient dépendantes de la voie de l'IL-10 et en particulier de STAT3.

De manière intéressante, une équipe a mis en évidence chez la souris une différenciation de DC en Mreg, dans un contexte tumoral (141). Cette étude montre une certaine plasticité des cellules myéloïdes dont l'orientation est influencée par leur microenvironnement. Les Mreg générés jouaient un rôle immunosuppresseur principalement *via* la production d'IL-10, ARG-1 et iNOS.

La clairance des cellules apoptotiques par les macrophages, l'exposition chronique au froid, la mise en contact avec des cellules souches stromales mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux et la phosphorylation de CRTC3 par une kinase sont autant d'évènements pouvant conduire à une polarisation en Mreg (130). Enfin, certains facteurs ont été précisément identifiés dans l'acquisition du phénotype Mreg. Le GM-CSF est un acteur clé dans le contrôle de la prolifération/migration et la survie des cellules d'origine myéloïde. La stimulation de monocytes murins ou humains avec du GM-CSF induisait l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR, entraînant des modifications structurales de la voie de signalisation IFN- γ R. Une seconde stimulation de ces monocytes avec de l'IFN- γ a conduit à la polarisation de ces cellules en Mreg présentant des fonctions suppressives avec une expression d'iNOS chez la souris et d'IDO chez l'Homme (142).

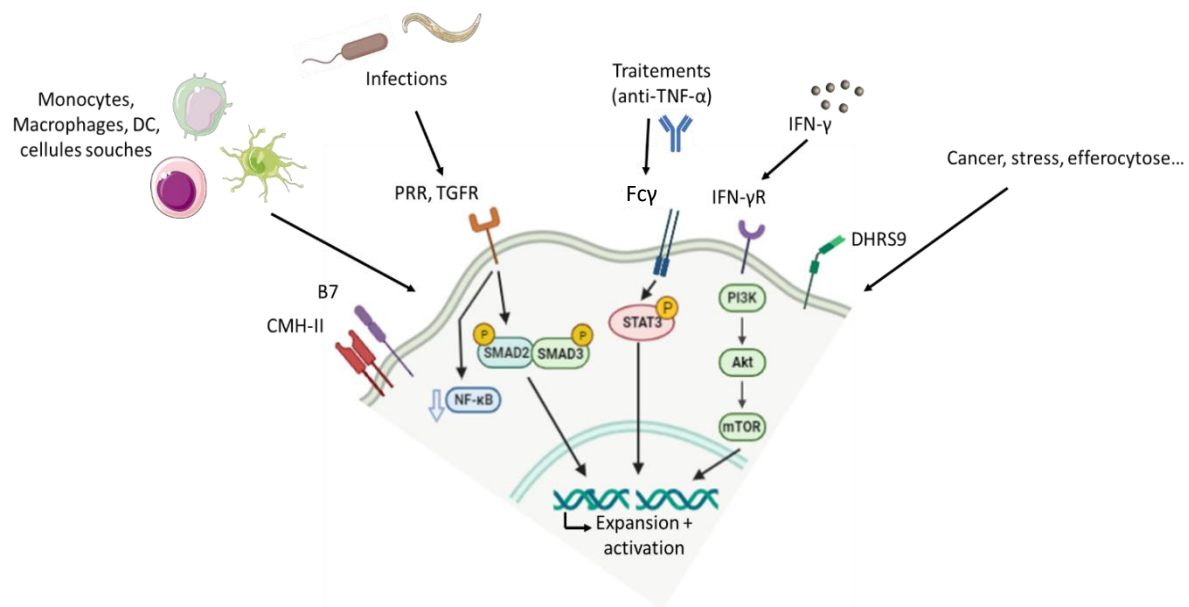


Figure 14 : Facteurs et voies impliqués dans l'expansion et l'activation des Mreg, inspiré de Zhang *et al.* 2021

Les Mreg sont induits dans de nombreux contextes comprenant des infections, des maladies (cancer) ou encore l'utilisation de traitements anti-TNF. Certaines cytokines ont été spécifiquement identifiées dans la polarisation et l'activation des Mreg comme l'IFN- γ . Ces cellules peuvent dériver de différents types cellulaires comme les monocytes, les macrophages et les DC. L'engagement des voies Smad 2/3 et PI3K/AKT/mTOR, ainsi que du facteur de transcription STAT3 ont été décrits dans la polarisation et l'activation des Mreg. L'expression des sous-unités NF- κ B-p65 et NF- κ Bp50/105 est en revanche altérée dans ces cellules.

DHRS9 = déshydrogénase réductase 9

3/ Mécanismes d'action

Les Mreg ont des propriétés immunosuppressives à la fois au niveau de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (figure 15). En particulier, ces cellules inhibent *in vitro* la prolifération des LT allogéniques activés. Une étude chez la souris a montré que cette inhibition était médiée par l'expression d'iNOS (128). Les Mreg sécrètent une grande variété de molécules incluant l'IL-10, le TGF- β , iNOS et IDO mais de très petites quantités d'IL-12 contrairement aux M1 (131).

Après une co-culture de LT de souris BALB/c avec des Mreg provenant de souris C3H, la production d'IL-2 par les LT en réponse à une stimulation CD3/CD28 était altérée (128). De même, malgré une stimulation avec des DC matures, les LT co-cultivés avec des Mreg allogéniques, ne produisaient plus d'IFN- γ (128).

Les Mreg ont également des propriétés anti-inflammatoires en induisant des Treg. Dans une publication parue en 2018, les auteurs ont montré *in vitro* une différenciation de LT CD4⁺ naïfs humains en Treg exprimant FoxP3⁺ et capables de produire de l'IL-10 (143).

CCL1 est produit spécifiquement par les Mreg lorsque le récepteur Fc γ R est engagé et qui ont été exposés à l'IL-1 β ou au LPS. La liaison CCL1 à son récepteur CCR8 est impliquée dans le recrutement des Th2/Tc2. Ainsi, les Mreg pourraient faire pencher la balance en faveur d'une réponse Th2/Tc2 (144).

Par ailleurs, grâce à l'expression de HLA et CD80/86, les Mreg sont également des CPA efficaces. Tout comme les macrophages en général, les Mreg sont aussi capables de phagocytose. Des LT marqués ont notamment été identifiés à l'intérieur de Mreg (128). Sous certains *stimuli*, les Mreg produisent du NO. Des auteurs ont avancé que le NO entrerait en jeu en limitant les infections bactériennes (145), suggérant un rôle des Mreg dans la résistance aux infections.

Enfin, les Mreg présentent des effets anti-fibrosants. Une équipe a utilisé un modèle d'inflammation pulmonaire et de fibrose induite par la bléomycine chez une souris déficiente en protéine amyloïde P sérique (SAP) (146). La SAP favoriserait la formation de Mreg. L'étude a montré qu'une réponse inflammatoire persistante et une fibrose accrue se mettaient en place chez les souris déficientes, contrairement aux contrôles. Les Mreg ont également un potentiel pro-angiogénique. Une étude *in vitro* a confirmé que les Mreg sécrétaient des protéines pro-angiogéniques telles que le GM-CSF ou la pentraxine-3 (PTX3) dans des conditions d'ischémie/reperfusion (3h d'hypoxie et 24h de réoxygénation) (147).

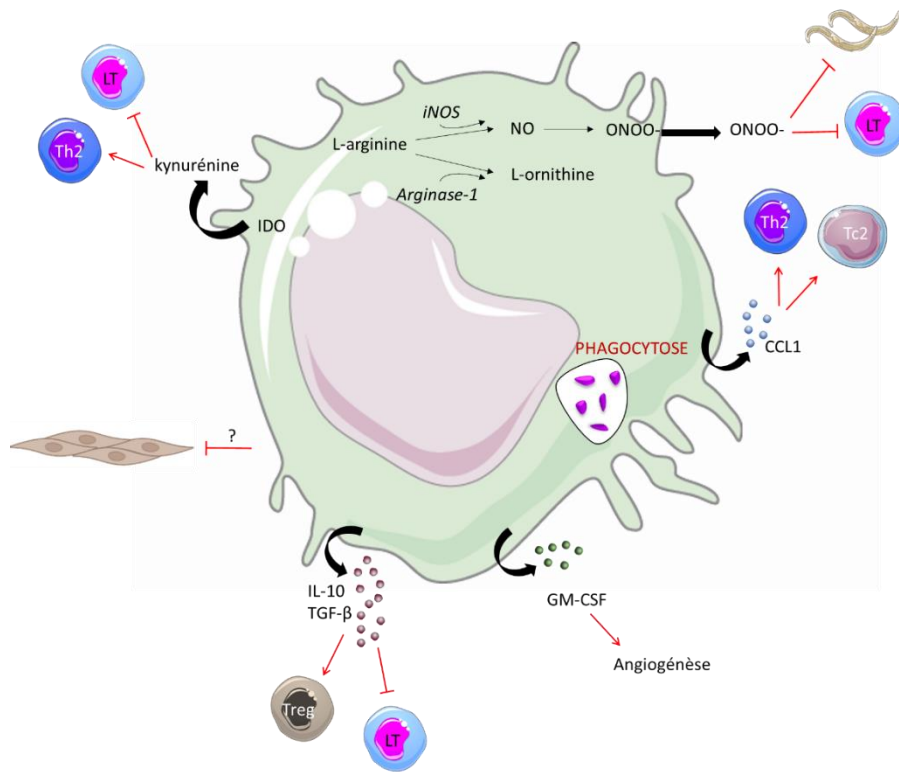


Figure 15 : Les principaux mécanismes d'immunosuppression des Mreg

Sécrétion de nombreux médiateurs comme l'IL-10, le TGF- β , iNOS, IDO et CCL1 ; Activité de phagocytose ; Rôle pro-angiogénique par la libération de GM-CSF ; effet anti-fibrosant possible.

4/ Intérêts thérapeutiques

Bien qu'aucune publication à notre connaissance ne le montre directement, l'éventualité d'un rôle bénéfique des Mreg dans des pathologies auto-immunes n'est pas à négliger.

Dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde chez le rat, une équipe a encapsulé de l'IL-10 dans des nanoparticules utilisées pour cibler les macrophages, permettant ainsi une reprogrammation des macrophages de type M1 en M2 (148). Une augmentation de la population de M2 par l'IL-10 a permis de réduire de manière significative l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les tissus et a empêché la progression de l'inflammation et des lésions articulaires. Les Mreg étant d'importants producteurs d'IL-10 et présentant des propriétés immunomodulatrices, cette étude suggère qu'une stimulation de cette population pourrait ralentir la progression de la polyarthrite rhumatoïde.

L'intérêt des Mreg a été étudié dans des modèles inflammatoires. Dans un modèle de colite chronique chez la souris, l'injection de Mreg différenciés à partir de cellules souches stromales mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux, a diminué la progression et évité la récurrence de la maladie (149). De plus, ces Mreg réduisaient l'infiltration de cellules inflammatoires dans divers

organes et diminuaient la production de plusieurs médiateurs inflammatoires, permettant de protéger les souris d'une septicémie sévère.

Les Mreg présentent un grand intérêt thérapeutique par leur capacité à favoriser la tolérance immunitaire, un atout important dans le domaine de la transplantation. C'est dans ce contexte que les Mreg ont été le plus étudiés.

Dans un modèle de transplantation cardiaque murine, des Mreg du donneur ont été administrés en intraveineux au receveur, huit à trente-cinq jours avant la transplantation, ce qui a prolongé la survie de l'allogreffe par rapport aux témoins (128). Les cellules ont pu être monitorées dans le sang, la rate, le foie et les poumons des receveurs jusqu'à deux semaines après l'injection. Dans le cas d'une transplantation rénale, l'administration préopératoire de Mreg du donneur au receveur entraînait une forte augmentation des Treg circulants (143). Les Mreg permettraient donc la mise en place d'un environnement pro-toléro-gène par l'induction de Treg, ce qui faciliterait la prise de greffe.

Dans une autre étude parue dans *The Lancet* en 2020, un groupe de patients transplantés rénaux témoins a été comparé à plusieurs groupes de transplantés rénaux traités avec une thérapie cellulaire dont un groupe traité avec des Mreg et un autre avec des ToIDC (150). Cet essai multicentrique de phase I/II a été mené afin de déterminer l'innocuité, la faisabilité et l'efficacité des thérapies cellulaires régulatrices. Le groupe témoin a reçu un traitement standard (basiliximab, mycophénolate mofétil (MMF), et tacrolimus) avec une corticothérapie à doses dégressives. Les groupes traités avec une thérapie cellulaire ont été uniquement traités par MMF, tacrolimus et corticoïdes. Le suivi a duré soixante semaines et le critère d'évaluation principal était le rejet aigu. Le taux et le moment du rejet aigu étaient similaires entre les deux groupes. A la fin de l'étude, 40% des patients traités par thérapie cellulaire étaient sous tacrolimus en monothérapie alors que 98% des patients du groupe témoin sont restées avec un traitement associant au moins deux immunosuppresseurs. De plus, l'incidence des infections dans le groupe témoin était près de six fois plus élevée que dans les groupes traités par thérapie cellulaire. Dans l'ensemble, cette étude a permis de démontrer l'innocuité des thérapies cellulaires, dont les Mreg et les ToIDC et la possibilité, grâce à ces cellules, de réduire l'utilisation d'immunosuppresseurs conventionnels pour prévenir le rejet de greffe.

5/ Génération *ex vivo* et limites

En 1998, une équipe a rapporté pour la première fois que des macrophages possédant des propriétés anti-inflammatoires pouvaient être obtenus *in vitro* à partir de macrophages dérivés de la moelle osseuse, stimulés par des complexes immuns IgG et du LPS (151). Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle majeur du récepteur au fragment Fc à la surface des macrophages dans l'induction des Mreg. Les Mreg sont aujourd'hui dérivés de cellules précurseurs de la moelle osseuse ou de monocytes du sang périphérique (130). Deux types de signaux semblent nécessaires pour induire la génération de Mreg : le premier permet une différenciation des cellules en macrophages et le second régule à la hausse les gènes impliqués dans la fonction suppressive des Mreg au détriment des gènes pro-inflammatoires.

De nombreux facteurs ont été impliqués dans la différenciation macrophagique comprenant des facteurs de croissance comme le M-CSF et le GM-CSF, les complexes immuns, la PGE2, l'adénosine, les corticoïdes et les cellules apoptotiques (130). Bien qu'une stimulation par des cytokines telles que l'IL-10 ou le TGF- β soit primordiale pour l'acquisition des fonctions suppressives des Mreg, ces cytokines partagent la caractéristique d'être relativement inefficaces pour induire à elles seules les propriétés des Mreg. L'association de ces cytokines à un stimulus inflammatoire, comme un agoniste des TLR, est indispensable (134). Dans la littérature, les Mreg sont souvent générés en sept jours à partir de monocytes isolés du sang périphérique et stimulés *ex vivo* avec du M-CSF, du sérum humain et de l'IFN- γ (152). Cependant les caractéristiques du donneur semblent influencer l'efficacité des Mreg. Une étude de 2019 révèle que des variables telles que le sexe, l'âge et l'état inflammatoire réel du donneur pourraient influencer les propriétés des Mreg générés (147).

Partie V : Les HuMoSC

1/ Généralités

Les HuMoSC, pour *Human Monocyte-derived Suppressor Cells*, sont une sous-population de cellules suppressives humaines d'origine monocyttaire. Ces cellules sont brevetées (FR1452286, WO2015140077-A1) et générées par notre équipe. Elles représentent une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement des pathologies inflammatoires et des désordres immunitaires. Ces cellules sont caractérisées par une expression de marqueurs myéloïdes CD33⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ CD14⁺ CD163⁺ CD206⁺ (153). HLA-DR est également fortement exprimé à la surface des HuMoSC en opposition à ce qui est observé chez les MDSC. Enfin, les HuMoSC expriment fortement les molécules d'adhésion CD44, CD31 et CD105 ainsi que le récepteur CCR5, suggérant que ces cellules peuvent être

recrutées sur le site de l'inflammation. Aucune expression des molécules de co-stimulation B7 n'a été relevée. Par ailleurs les HuMoSC produisent du CCL2, de l'IL-6 et de l'IL-10 (figure 16), mais pas ou très peu de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL12p70, CCL20, granzyme B ou FasL soluble (153). Contrairement aux MDSC, les HuMoSC ne produisent pas, ou très peu, de TGF- β .

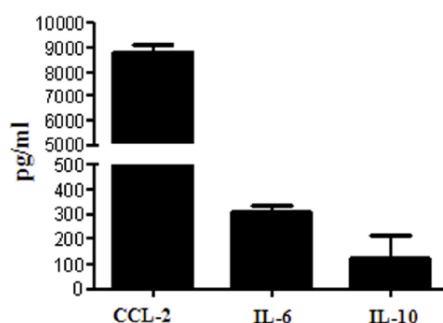


Figure 16 : Evaluation des capacités sécrétoires des HuMoSC

Surnageant de culture des HuMoSC après 48h dans du RPMI complet. Dosage en luminex. Résultats tirés de la publication de Janikashvili *et al*, 2015.

Selon la définition donnée par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM), les HuMoSC rentreraient juridiquement dans la catégorie des médicaments dits de « thérapie cellulaire somatique », appartenant au groupe des thérapies innovantes. Le surnageant de HuMoSC quant à lui, appartiendrait à la classe des médicaments biologiques complexes.

2/ Génération *ex vivo*

Nous travaillons à partir de concentrés leuco-plaquettaire de donneurs sains, fournis par l'Etablissement Français du Sang (EFS). Dans un premier temps, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont isolées par un gradient de Ficoll, puis les monocytes sont isolés par un gradient de Percoll (figure 17). Les monocytes sont cultivés dans du X-vivo (Lonza) supplémenté avec 10 ng/mL de GM-CSF (Fisher) et 10 ng/mL d'IL-6 (Miltenyi). Les cellules sont implantées dans une flasque T75, à raison de 2 millions de cellules/mL et incubées à 37°C, 5% de CO₂. Un changement de milieu est réalisé à cinq jours. Au bout de sept jours de culture, les HuMoSC sont isolés par tri cellulaire magnétique avec des billes CD33⁺ (Miltenyi). Elles sont alors cultivées pendant 24h dans du sérum physiologique pour finalement récolter le surnageant.

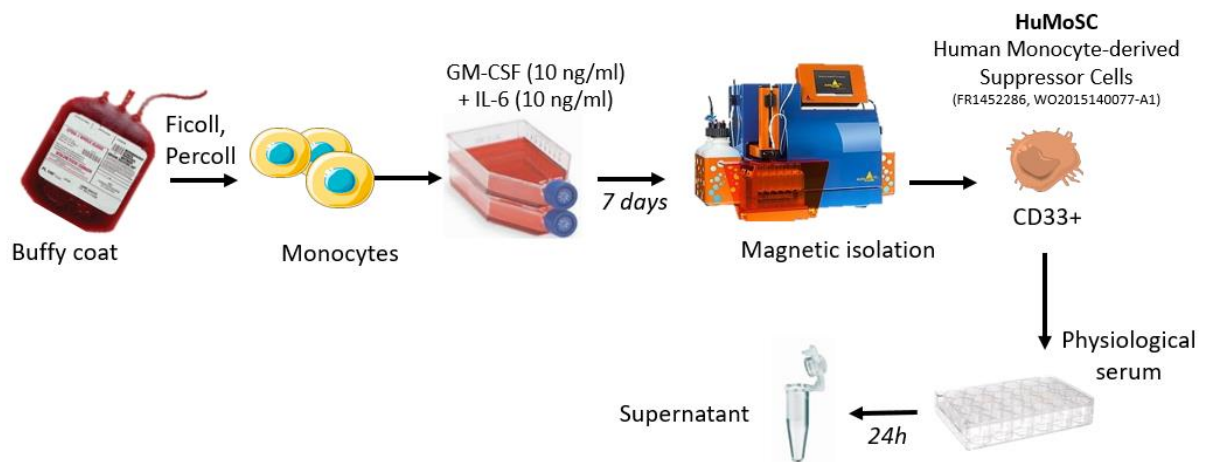


Figure 17 : Schéma de génération des HuMoSC et de leur surnageant *ex vivo*

Le potentiel immunosuppresseur du surnageant de HuMoSC est systématiquement vérifié. Le test fonctionnel repose sur l'évaluation de la prolifération de LT allogéniques. Des PBMC et le surnageant de HuMoSC sont co-cultivés pendant cinq jours en présence de billes CD3 /CD28 (Invitrogen) pour stimuler la prolifération des LT. Les PBMC sont marqués avec du CellTrace Violet (Fisher). La prolifération des LT est analysée par cytométrie en flux (Attune NxT) et les données sont interprétées avec le logiciel ModFit. Le surnageant de HuMoSC est considéré comme fonctionnel s'il induit une inhibition de la prolifération des LT $\geq 70\%$.

3/ Propriétés immunosuppressives

Lors de précédentes recherches nous avons montré que les HuMoSC inhibaient la prolifération des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ autologues et allogéniques *in vitro* (153). Elles réduisaient également l'activation des LT effecteurs, caractérisée par une diminution de l'expression de CD25 et une diminution de la production d'IFN- γ et de TNF- α (figure 18).

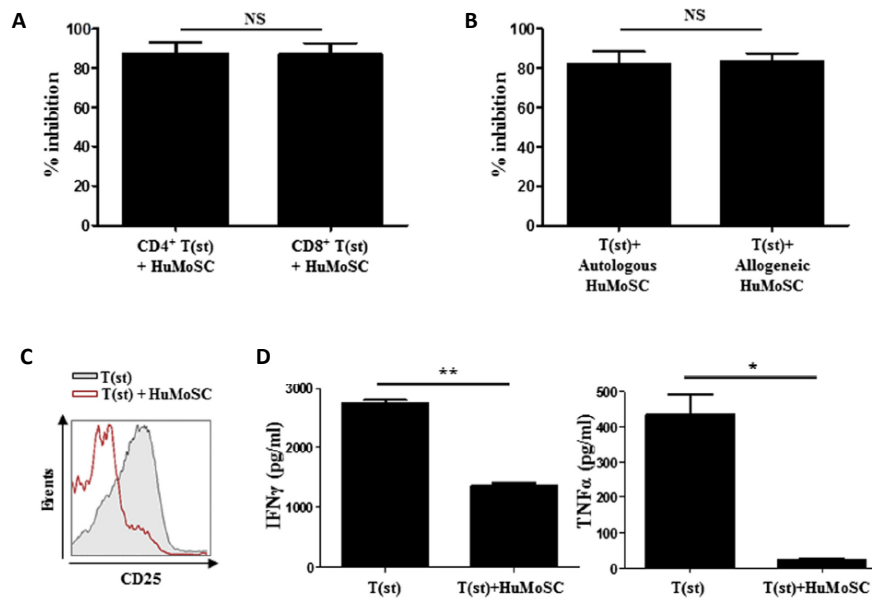


Figure 18 : Les HuMoSC inhibent l'activation et la prolifération des LT *in vitro*

Les HuMoSC inhibent sans distinction la prolifération des LT CD4 et CD8 (A) d'origine autologues ou allogéniques (B), lors du test fonctionnel. De plus, l'activité des LT effecteurs est réduite, se traduisant par une diminution du marqueur CD25 en cytométrie (C) et une diminution de la production d'IFN- γ et TNF- α (D). Résultats tirés de la publication de Janikashvili *et al*, 2015.

Les HuMoSC favorisaient l'expansion des Treg, et en particulier des CD8⁺ Treg (153). En effet, *in vivo* les proportions de cellules CD8⁺ FoxP3⁺ et CD4⁺ FoxP3⁺ dans la circulation sanguine des souris étaient augmentées pour les groupes traités avec des HuMoSC (figure 19). *In vitro* la présence de cellules CD8⁺, CD25⁺, FoxP3⁺, CD103⁺, CD62⁺, CCR7⁺ était observable dans des cultures de PBMC en présence de HuMoSC (figure 19). De plus, ces LT présentaient une diminution de l'expression d'IFN- γ , de granzyme B et de perforine, suggérant qu'il s'agissait effectivement de Treg. De plus, ces cellules induites par les HuMoSC (CD8⁺, CD103⁺) ont été capables de diminuer la prolifération des LT effecteurs *in vitro*. Par conséquent, *via* l'induction de Treg, les HuMoSC sont capables de favoriser un état de tolérance immunitaire.

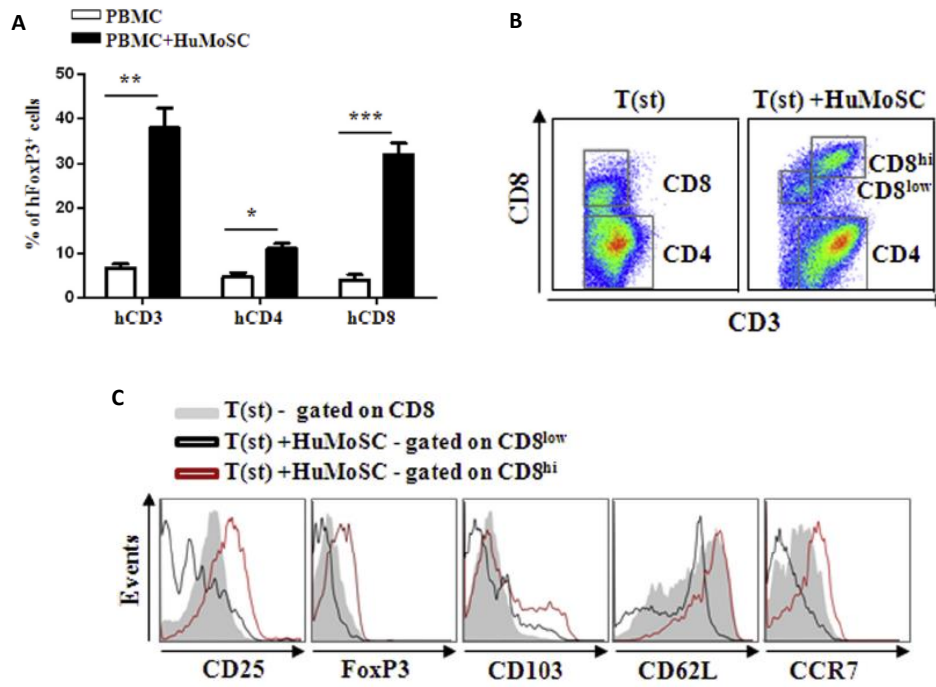


Figure 19 : Les HuMoSC favorisent l'expansion des Treg *in vitro* et *in vivo*

Pourcentage de LT exprimant FoxP3 *in vivo*, avec ou sans traitement HuMoSC des souris (A). Analyse en cytométrie montrant une augmentation de l'expression de CD8 parmi la population de LT générale, en présence d'HuMoSC dans la culture cellulaire (B). L'expression de CD25, FoxP3, CD103, CD62 ligand et CCR7 est augmentée dans la population CD8^{hi} traitée avec HuMoSC (C). Résultats tirés de la publication de Janikashvili *et al*, 2015.

Enfin, dans un modèle de réaction aiguë du greffon contre l'hôte (GVHD) induite par l'injection de PBMC humaines à des souris immunodéficientes (NSG), une unique injection de HuMoSC permettait d'améliorer significativement la survie et entraînait une diminution significative du score clinique de GVHD (153) (figure 20).

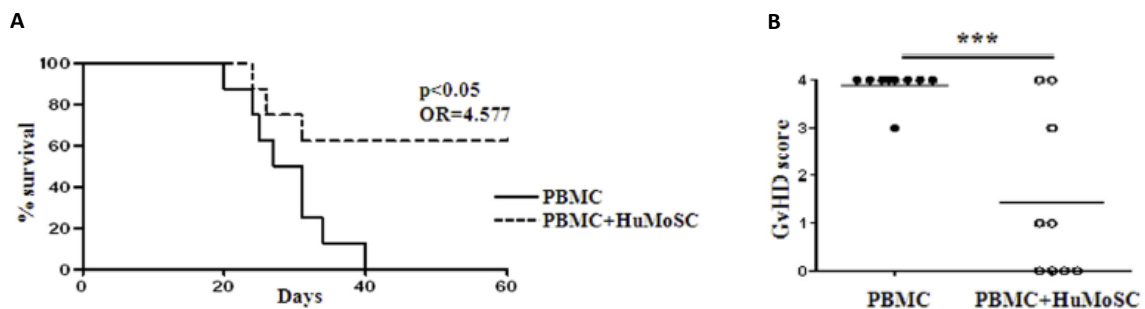


Figure 20 : Les HuMoSC protègent de la GVHD *in vivo*

Amélioration de la survie (A) et du score de la GVHD (B) chez les souris traitées par injection d'HuMoSC. Résultats tirés de la publication de Janikashvili *et al*, 2015.

L'activité suppressive des HuMoSC ne dépend pas d'un contact cellulaire car ces propriétés sont également observées avec leur surnageant. En effet, le surnageant inhibe, de manière tout aussi efficace que les cellules, la prolifération des LT *in vitro* (figure 21).

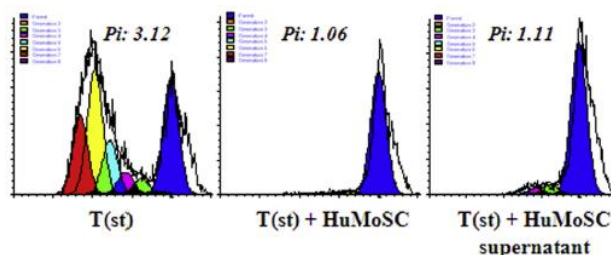


Figure 21 : Le surnageant des HuMoSC inhibe la prolifération des LT *in vitro*

Le CellTrace n'est pas transmis dans les générations suivantes de cellules filles car la prolifération des LT est inhibée par les HuMoSC ou leur surnageant. Résultats du test fonctionnel tirés de la publication de Janikashvili *et al*, 2015. PI = index de prolifération.

Les propriétés immunosuppressives des HuMoSC, à savoir l'inhibition de la prolifération des LT et l'induction de Treg, sont maintenues dans un contexte inflammatoire (154). *In vitro*, ces cellules ont été co-cultivées avec des PMBC stimulées et exposées à plusieurs cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-2, l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-1 β ou à des ligands de TLR, comme le LPS, le Pam3Cys-SK4, la Poly I : C et la flagelline (figure 22). Ces facteurs ont été utilisés à des doses élevées, seuls ou en association, sans que cela n'ait altéré les capacités suppressives des HuMoSC. De même, *in vitro* les fonctions des HuMoSC n'ont pas été affectées par la présence d'agents anti-inflammatoires et immunosuppresseurs utilisés dans un contexte de maladies inflammatoires et auto-immunes, tels que la méthylprednisolone, le méthotrexate (MTX) et la ciclosporine (154).

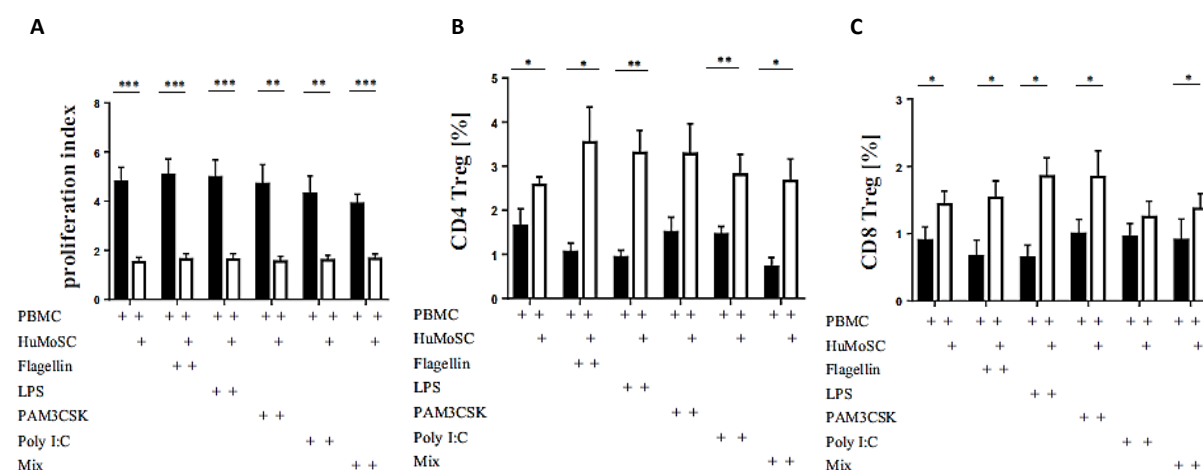


Figure 22 : Les propriétés des HuMoSC sont maintenues dans un contexte inflammatoire *in vitro*

La présence de différents ligands TLR dans l'environnement ne perturbe pas l'activité des HuMoSC, qui inhibent la prolifération des LT (A) et induisent l'expansion des Treg CD4 (B) et CD8 (C). Résultats tirés de la publication de Gérard *et al*, 2021.

In vivo, dans un modèle de xéno-GVHD, le cyclophosphamide (CYC) utilisé pour la prévention de la GVHD n'a pas altéré les propriétés suppressives des HuMoSC. Le groupe de souris traité par CYC, présentait un taux de survie de 80% à J60, alors que l'ensemble des souris du groupe témoin avait succombé à la maladie. L'association des HuMoSC et du CYC avait montré un effet synergique avec un meilleur contrôle de la GVHD (154) (figure 23).

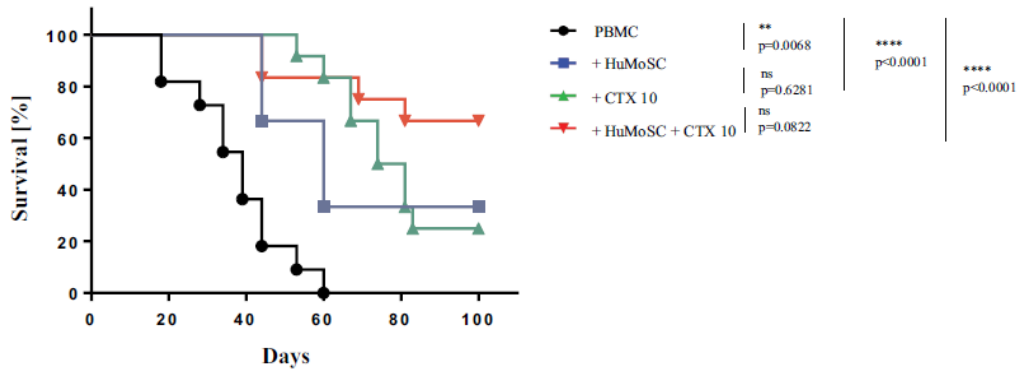


Figure 23 : L'effet de la cyclophosphamide est renforcé par les HuMoSC, permettant de mieux contrôler la GVHD *in vivo*

Résultats tirés de la publication de Gérard *et al*, 2021. CTX = cyclophosphamide.

Dans un modèle de GVHD chez la souris, l'administration de MDSC du donneur chez le receveur, améliorerait la survie seulement de manière partielle et transitoire en raison de l'activation précoce de l'inflammasome chez les MDSC, entraînant ainsi une perte de leurs fonctions suppressives. Une étude parue en 2019 mettait en avant la nécessité de prévenir l'activation de l'inflammasome chez les MDSC et la conservation de la sécrétion d'IL-1 β pour améliorer leur efficacité (155). Contrairement aux MDSC, les études menées au laboratoire ont montré que les HuMoSC conservaient leurs propriétés *in vitro* et *in vivo* même dans un environnement inflammatoire.

4/ Perspectives cliniques et limites

Ces résultats montrent que les HuMoSC pourraient être utilisées pour le traitement de maladies inflammatoires et auto-immunes. De plus, la stabilité des HuMoSC en présence de corticoïdes ou d'immunosuppresseurs, voir leur effet synergique avec le CYC, suggère que ces cellules pourraient permettre de réduire les doses de médicaments immunosuppresseurs administrées aux patients et donc de réduire leurs effets indésirables. L'inhibition des LT à la fois autologues et allogéniques laisse aussi présager d'un fort intérêt des HuMoSC en transplantation.

Dans l'optique d'utiliser les HuMoSC en clinique, une étude portant sur leur conservation a été conduite. Les cellules toléraient la cryoconservation à -80°C, pendant au moins cent jours (154). En

effet, la viabilité, le phénotype et les propriétés des HuMoSC étaient inchangés. De plus, les cellules restaient stables à température ambiante et à 4°C pendant au moins 6h.

Dans le modèle de GVHD chez la souris NSG, les HuMoSC n'étaient plus détectables dans la circulation 30 jours après leur injection, ce qui limite le risque tumorigène (153).

La principale limite rencontrée avec les HuMoSC repose sur leur faible rendement. En effet, à partir de PBMC, nous obtenons environ 5% de HuMoSC. Pour pallier cela, une nouvelle voie avait été explorée. Elle reposait sur le changement du tri magnétique réalisé à J7, en procédant à un isolement des cellules CD14+ au lieu de CD33+. Le rendement était multiplié par cinq et le surnageant de CD14-HuMoSC présentait des propriétés similaires au surnageant CD33 en termes d'inhibition de la prolifération des LT CD4+ et CD8+ *in vitro* (156). De même, le surnageant de CD14-HuMoSC diminuait la cytotoxicité des LT CD8. *In vivo*, l'injection de ce surnageant a réduit la xéno-GVHD chez les souris NSG. Enfin, les propriétés immunorégulatrices étaient conservées dans un environnement inflammatoire. Cependant, ces résultats se sont montrés trop inconstants. C'est pourquoi le tri CD14 a été abandonné dans la suite des expérimentations pour revenir à un tri CD33.

5/ Mécanismes d'action

Les HuMoSC présentent des propriétés suppressives certaines. Cependant leurs mécanismes d'action ne sont pas clairement élucidés.

Les principales voies impliquées dans les mécanismes d'immunosuppression comme l'ARG-1, iNOS, COX2, HO-1, IDO, l'adénosine et l'IL-10 ont été inhibées une par une mais sans altérer les propriétés immunosuppressives des HuMoSC. Le facteur de transcription STAT3 semble par contre primordial pour assurer la fonction suppressive des HuMoSC (153) (figure 24).

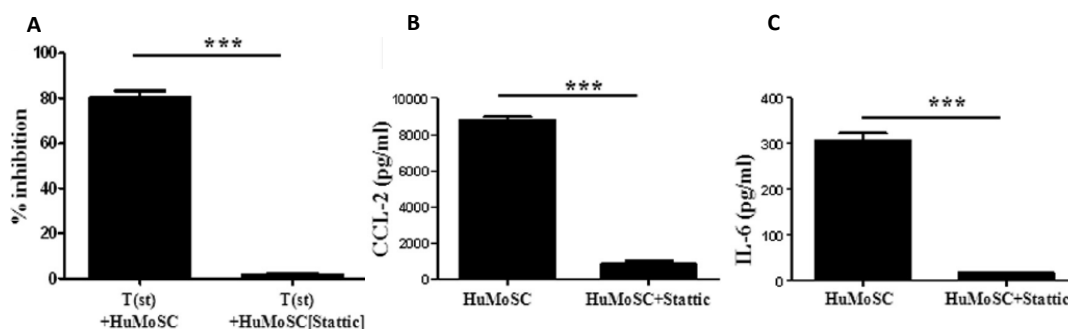


Figure 24 : L'activité suppressive des HuMoSC est dépendante du facteur de transcription STAT3

L'inhibition de STAT3 par Stattic empêche les HuMoSC de contrôler la prolifération des LT et de produire du CCL2 et de l'IL-6. Résultats tirés de la publication de Janikashvili *et al*, 2015.

De plus, les HuMoSC pourraient agir en privant le milieu d'acides aminés essentiels. En effet, la présence de HuMoSC dans les cultures de PBMC entraînait une diminution des concentrations en tryptophane et en cystéine (figure 25). De manière intéressante, cet effet n'était pas observé lors de l'inhibition de l'activité des HuMoSC par un inhibiteur de STAT3 (Stattic). Ces résultats suggèrent que l'activité suppressive des HuMoSC dépend de STAT3 et est associée à la privation de tryptophane et de cystéine. La séquestration des acides aminés essentiels, et en particulier de la cystéine, est un mécanisme immunosuppresseur connu dans les cellules suppressives d'origine myéloïde comme les MDSC. La privation de cystéine dans l'environnement immédiat des cellules participe à l'inhibition des LT et favorise la différenciation en Treg (57).

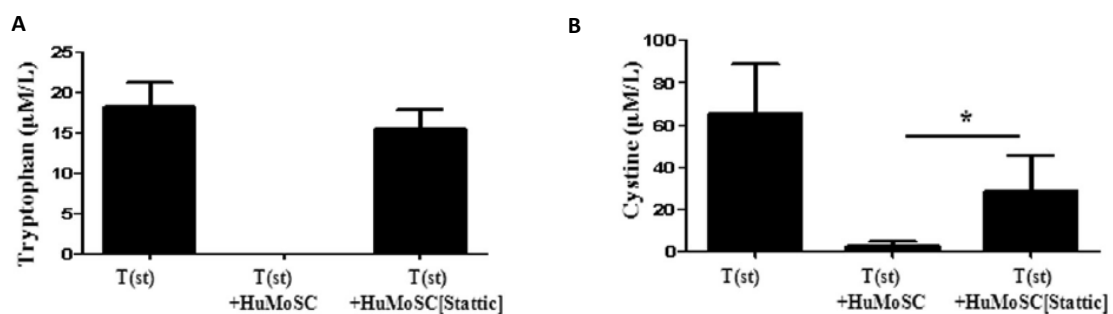


Figure 25 : Les HuMoSC séquestrent des acides aminés essentiels *via* l'engagement de STAT3

Les concentrations de tryptophane et de cystéine dans les surnageants de culture sont diminuées en présence de HuMoSC. L'inhibition de STAT3 par Stattic empêche les HuMoSC de séquestrer ces acides aminés essentiels. Résultats du test fonctionnel tirés de la publication de Janikashvili *et al*, 2015.

Il a été montré que les MDSC isolées de tumeurs exprimaient de grandes quantités de ligands de CCR5, induisant ainsi le recrutement des Treg qui expriment ce récepteur à leur surface (157). Les HuMoSC expriment également le récepteur CCR5 (153).

Dans la culture de PBMC, la présence de ciclosporine ne bloque pas l'induction des Treg induite par les HuMoSC (154). Or, la ciclosporine empêche la production d'IL-2, inhibant ainsi la différenciation Treg *in vivo* (158). Le maintien des Treg malgré la ciclosporine suggère que l'induction de Treg par les HuMoSC ne serait pas dépendante de la voie de l'IL-2.

De manière similaire aux MDSC, aux TolDC et aux Mreg, les HuMoSC produisent de l'IL-10, dont le rôle dans la différenciation des Treg est clairement établi (104).

Chapitre II - Maladies auto-inflammatoires et systémiques

Les thérapies cellulaires d'origine myéloïde, et en particulier les HuMoSC, pourraient représenter une alternative thérapeutique utile pour la prise en charge de pathologies dysimmunitaires dans lesquelles il existe un processus de remodelage. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à deux maladies auto-immunes : l'Artérite à Cellules Géantes (ACG) et la Sclérodémie Systémique (SSc).

Partie I : L'Artérite à Cellules Géantes

1/ Introduction et épidémiologie

L'ACG, également appelée maladie de Horton, est une vascularite granulomateuse affectant les vaisseaux de gros calibres, en particulier l'aorte et le système carotidien externe. Il s'agit de la vascularite la plus fréquente chez l'adulte de plus de 50 ans, avec un pic d'incidence se situant entre 70 et 80 ans. Les femmes sont deux à trois fois plus touchées que les hommes (159,160).

A) Le rôle de la génétique

Selon les populations, la prévalence de l'ACG varie. La prévalence la plus élevée est observée dans les populations d'origine scandinave comme dans le comté d'Olmsted dans le Minnesota, où une étude de 2004 estimait le nombre de cas annuels à 18,8 pour 100 000 habitants de plus de 50 ans (161). En revanche, les populations africaines, arabes, hispaniques et asiatiques semblent relativement épargnées par la maladie (162,163). En France, une étude menée en Loire Atlantique révélait que la prévalence de l'ACG était de 9,4 cas pour 100 000 habitants de plus de 55 ans (164). Une autre étude réalisée à Dijon a montré un taux d'incidence par an de 13,4 pour 100 000 habitants âgés de plus de 55 ans (165).

La pathogénèse de la maladie reste encore inconnue, néanmoins les nombreuses publications suggèrent qu'un facteur unique ne peut pas expliquer à lui seul le déclenchement de cette maladie.

Les études précédentes montrent une hétérogénéité du taux d'incidence en fonction de l'origine ethnique des patients, suggérant l'implication de facteurs génétiques dans le développement de l'ACG. Dans de nombreux travaux, l'augmentation du risque de développer une ACG a été associée à la présence de certains allèles du système HLA. En effet, 60% des patients atteints d'ACG exprime un allèle *HLA-DRB1*04* (*HLADRB1*0401*, *DRB1*0404* ou *DRB1*0408*) (166–168). Une étude a récemment mis en évidence une augmentation du risque de développer la maladie si les allèles *HLA-B*15:01* et

*HLA-DRB1*04:01* étaient coexprimés (169). Enfin, une étude d'association pangénomique (GWAS) a comparé 2134 patients atteints d'ACG et d'origine européenne avec 9125 témoins sains et a ainsi confirmé que la survenue de l'ACG était fortement liée au CMH de classe II (170).

Dans l'étude GWAS mentionnée ci-dessus, les auteurs ont également identifié deux gènes potentiellement impliqués dans la pathogénèse de l'ACG : *PLG* (gène du plasminogène) et *P4HA2* (code une isoforme de la sous-unité alpha du collagène).

D'autres polymorphismes de gènes ont été étudiés pour clarifier leurs rôles dans la survenue de l'ACG. C'est le cas notamment du *VEGF*, de la famille des *NLR*, du *TNF- α* , de l'*IL-6*, de l'*IL-33* de la *Corticotropin Releasing Hormone* (CRH), de la *molécule d'adhésion cellulaire* (ICAM-1), du promoteur du gène de *CCL5*, du récepteur *CCR5*, du gène de l'*antagoniste du récepteur à l'IL-1* (IL-1RA), de *CCL2*, de *CD24* et *NOS2* (171–179). Malgré des discordances entre les études, certains auteurs ont montré que ces facteurs étaient liés à un risque accru de développer une ACG.

B) L'influence de l'épigénétique

L'épigénétique, qui correspond à l'étude des changements dans l'expression des gènes sous l'influence de facteurs environnementaux, a également été étudiée au cours de l'ACG. Ces changements n'impliquent pas de modification de la séquence d'ADN en elle-même mais font intervenir divers mécanismes qui agissent sur la structure de l'ADN. Pour plusieurs gènes, des différences de niveau de méthylation de l'ADN ont été rapportées entre les artères temporales de patients ACG et des patients sains. Une hypométhylation de plusieurs gènes pro-inflammatoires, dont *IFN- γ* , *IL-21*, *IL-23R*, *IL-17RA*, *TNF*, *IL-6* et *IL-1 β* , conduisant à une augmentation de leurs expressions a été identifiée (180). De même, des gènes codant pour des composants du TCR, des molécules co-stimulatrices et des protéines impliquées dans les voies d'activation des LT étaient également hypométhylées chez les patients ACG (181).

Enfin, l'ACG apparaît chez des personnes de plus de 50 ans suggérant un effet de l'âge dans l'apparition de la maladie. Le vieillissement est responsable de profondes modifications dans le fonctionnement du système immunitaire. Il a notamment été rapporté que le niveau de l'enzyme impliquée dans le maintien de la méthylation de l'ADN (ADN méthyltransférase 1 ou DNMT1) diminuait avec l'âge dans les LT, entraînant des profils de méthylation aberrants à l'origine de l'apparition de différents syndromes (182). Le vieillissement entraîne aussi une diminution du nombre de LT naïfs et une augmentation des LT mémoires, effecteurs et sénescents (183). De plus, des études ont montré une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires avec le vieillissement (184). Ensemble, ces modifications contribuent à la mise en place d'un état inflammatoire permanent chez la personne âgée qui pourrait déclencher une immunisation contre les auto-antigènes artériels et expliquer le déclenchement de l'ACG.

C) Les facteurs environnementaux

Il existe une variation cyclique et saisonnière de l'incidence de l'ACG, mettant en cause l'implication de facteurs environnementaux dans la survenue de la maladie. Ainsi, de nombreuses équipes se sont attelées à la recherche d'un pathogène infectieux. Les résultats de ces études sont souvent contradictoires ou non confirmés sur de plus grandes séries de patients.

Des études ont trouvé une corrélation entre l'ACG et le Cytomégalovirus (CMV), le Parvovirus B19, le virus de l'herpès simplex, le parainfluenza humain 1 et le *Chlamydia pneumoniae* (185). Plus récemment, des auteurs ont mis en évidence un possible rôle d'un autre virus de la famille des herpès virus : le virus varicelle-zona (VZV), comme facteur déclenchant l'ACG. En plus d'être responsable de la varicelle et du zona, ce virus humain est également capable d'engendrer une vascularite et des symptômes proches de ceux décrits dans l'ACG (186). La présence de VZV a été détectée dans 73% des biopsies d'artère temporale (BAT) positives et 64% des BAT négatives chez les patients atteints d'ACG, alors que le virus était détectable dans seulement 22% des BAT négatives issues de témoins sains (187). La détection du VZV dans les BAT de patients ACG pourrait être liée au vieillissement immunitaire qui diminue le contrôle de la réplication de ce virus, sans que celui-ci ne joue vraiment un rôle dans la génèse de la maladie.

Dans le modèle de physiopathologie qui est avancé aujourd'hui, l'initiation de l'ACG repose sur une rupture de la tolérance immunitaire due à une activation des DC résidentes de l'adventice. Il est supposé qu'un agent infectieux soit l'élément déclencheur de l'activation et de la maturation des DC. Cependant, cette hypothèse n'a jamais pu être vérifiée, principalement parce qu'aucun agent pathogène responsable de la pathogénèse de l'ACG n'a été identifié. Aucun consensus n'existe donc aujourd'hui pour expliquer l'origine de la maladie. Néanmoins, l'activation des DC se produit chez des individus prédisposés génétiquement et la survenue de la vascularite ainsi que les mécanismes qui participent à l'entretien et à la persistance de l'inflammation vasculaire ainsi qu'au remodelage de la paroi vasculaire sont bien mieux connus.

2/ Physiopathologie

Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ACG sont de mieux en mieux connus. Deux processus majeurs sont impliqués : d'une part l'inflammation vasculaire et d'autre part le remodelage vasculaire (188). Le modèle physiopathologique peut se dessiner en quatre phases résumées ci-après et développées davantage dans la revue présentée dans la suite de ce manuscrit (**article 1 : New Insights into the Pathogenesis of Giant Cell Arteritis : Mechanisms Involved in Maintaining Vascular Inflammation, Journal of Clinical Medicine, 2022**).

A) Rupture de la tolérance immunitaire

Dans un contexte physiologique, les DC, localisées dans l'adventice des artères, sont immatures ($S100^+$ $CD11c^+$ $CCR6^+$ $CD83^-$ $CCR7^-$ $CMH-II^{low}$) et contribuent à maintenir un environnement tolérogène. Sous l'effet de stimuli indéfinis, les DC s'activent et acquièrent un phénotype de cellules matures ($S100^+$ $CD11c^+$ $CCR6^-$ $CD83^+$ $CD80/86^+$ $CCR7^+$ $CMH-II^{high}$) conduisant à une rupture de la tolérance immunitaire (189). Les DC perçoivent les signaux de « danger » par le biais des TLR. Dans un modèle où des souris immunodéficientes ont été greffées avec des artères temporales humaines, une stimulation du TLR4 par du LPS avait permis d'obtenir la plus forte activation des DC, suggérant le rôle d'un agent infectieux dans l'initiation de la maladie (190).

B) Recrutement, activation et polarisation des LT CD4

Les DC produisent des chimiokines (CCL18, CCL19, CCL20 et CCL21) conduisant au recrutement des LT $CD4^+$ dans la paroi artérielle (190). Par la suite, les LT $CD4$ sont activées par les DC matures, dont l'expression du CMH-II et des molécules de co-stimulation est augmentée. Les LT $CD4$ prolifèrent puis sont polarisés en cellules Th1 et Th17 (191,192). Les lymphocytes Th1 et Th17 produisent respectivement de l'IFN- γ et de l'IL-17. De manière intéressante, les Treg sont quantitativement diminués dans le sang des patients atteints d'ACG (193).

C) Recrutement des LT CD8 et des monocytes

L'IFN- γ induit l'activation des cellules musculaires lisses (CML) vasculaires dans la media, qui vont à leur tour produire des chimiokines (CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11) à l'origine du recrutement des monocytes et des LT $CD8^+$ (194,195). A leur arrivée dans le tissu artériel, les monocytes se différencient en macrophages qui fusionnent entre eux pour former des cellules géantes multi-nucléées, caractéristiques de l'ACG. Les macrophages produisent de l'IL-6, de l'IL-1 β et du TNF- α , qui amplifient la réponse inflammatoire locale mais participent également à l'inflammation systémique (185,194).

D) Remodelage vasculaire

Via la production de différents médiateurs, les macrophages et les CML initient le remodelage vasculaire. Ce processus est caractérisé par la destruction de la limitante élastique interne et la prolifération et migration des CML depuis la media vers l'intima (196). Les macrophages et les CML libèrent des facteurs de croissance dont le VEGF, un facteur néoangiogénique, et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), impliqué dans la prolifération/migration des CML (197). De plus, les macrophages produisent des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs cytotoxiques (ROS, métalloprotéinases matricielles (MMP)) qui contribuent également aux lésions tissulaires et à une hyperplasie néo-intimale (198). L'endothéline-1 (ET-1), principalement produite par les CML, participe également activement à leur migration (199,200). Après la migration des CML, celles-ci connaissent

une transition cellulaire vers un phénotype de myofibroblastes, des cellules dont l'activité sécrétoire est intense avec notamment une synthèse excessive de protéines matricielles. Le remodelage vasculaire conduit à une sténose, voire une occlusion des vaisseaux, et est ainsi responsable des complications ischémiques de l'ACG (160).

Review

New Insights into the Pathogenesis of Giant Cell Arteritis: Mechanisms Involved in Maintaining Vascular Inflammation

Hélène Greigert ^{1,2,3,†}, Coraline Genet ^{3,†}, André Ramon ^{3,4}, Bernard Bonnotte ^{1,3,‡} and Maxime Samson ^{1,3,*,‡}

- ¹ Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Dijon University Hospital, 14 Bd. Gaffarel, 21000 Dijon, France; helene.greigert@chu-dijon.fr (H.G.); bernard.bonnotte@chu-dijon.fr (B.B.)
- ² Department of Vascular Medicine, Dijon University Hospital, 14 Bd. Gaffarel, 21000 Dijon, France
- ³ INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France; coraline.genet@u-bourgogne.fr (C.G.); andre.ramon@chu-dijon.fr (A.R.)
- ⁴ Department of Rheumatology, Dijon University Hospital, 14 Bd. Gaffarel, 21000 Dijon, France
- * Correspondence: maxime.samson@u-bourgogne.fr; Tel.: +33-3-8029-3432; Fax: +33-3-8029-3846
- † These authors contributed equally to this work.
- ‡ These authors contributed equally to this work.



Citation: Greigert, H.; Genet, C.; Ramon, A.; Bonnotte, B.; Samson, M. New Insights into the Pathogenesis of Giant Cell Arteritis: Mechanisms Involved in Maintaining Vascular Inflammation. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 2905. <https://doi.org/10.3390/jcm11102905>

Academic Editor: Santos Castañeda

Received: 2 April 2022

Accepted: 19 May 2022

Published: 20 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The giant cell arteritis (GCA) pathophysiology is complex and multifactorial, involving a predisposing genetic background, the role of immune aging and the activation of vascular dendritic cells by an unknown trigger. Once activated, dendritic cells recruit CD4 T cells and induce their activation, proliferation and polarization into Th1 and Th17, which produce interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin-17 (IL-17), respectively. IFN- γ triggers the production of chemokines by vascular smooth muscle cells, which leads to the recruitment of additional CD4 and CD8 T cells and also monocytes that differentiate into macrophages. Recent data have shown that IL-17, IFN- γ and GM-CSF induce the differentiation of macrophage subpopulations, which play a role in the destruction of the arterial wall, in neoangiogenesis or intimal hyperplasia. Under the influence of different mediators, mainly endothelin-1 and PDGF, vascular smooth muscle cells migrate to the intima, proliferate and change their phenotype to become myofibroblasts that further proliferate and produce extracellular matrix proteins, increasing the vascular stenosis. In addition, several defects in the immune regulatory mechanisms probably contribute to chronic vascular inflammation in GCA: a defect in the PD-1/PD-L1 pathway, a quantitative and qualitative Treg deficiency, the implication of resident cells, the role of GM-CSF and IL-6, the implication of the NOTCH pathway and the role of mucosal-associated invariant T cells and tissue-resident memory T cells.

Keywords: giant cell arteritis; pathogenesis; IL-6; T cells; GM-CSF; vascular smooth muscle cells

1. Introduction

Giant cell arteritis (GCA) is a granulomatous vasculitis affecting large vessels, especially the aorta and its major branches, mainly subclavian arteries and cranial arteries of the external carotid system. This vasculitis affects adults after 50 years (peak incidence between 70 and 80 years) and women are affected two to three times more frequently than men [1–5]. Systemic signs, i.e., fever, asthenia, anorexia and weight loss, are frequent, unspecific and related to systemic inflammation that is largely correlated with serum interleukin-6 (IL-6) elevation [6,7]. Patients also present ischemic signs, which are responsible for the most serious features of this vasculitis and the clinical manifestations of which directly depend on the topography of the arterial involvement. Ischemic signs are a consequence of the remodeling process affecting the arterial wall, which leads to its thickening, and finally, to vascular stenosis or occlusion [8]. The diagnosis of GCA is usually confirmed by a temporal artery biopsy (TAB) revealing non-necrotizing granulomatous panarteritis and showing these two pathological processes: 1—vascular inflammation related to a transmural cellular

infiltrate composed of mononuclear cells (T cells and macrophages) and sometimes giant cells, 2—vascular remodeling with typical fragmentation of the internal elastic lamina, destruction of the media and proliferation of myofibroblasts, leading to a hyperplastic neointima and resulting in the stenosis of the vascular lumen [9,10] (Figure 1).

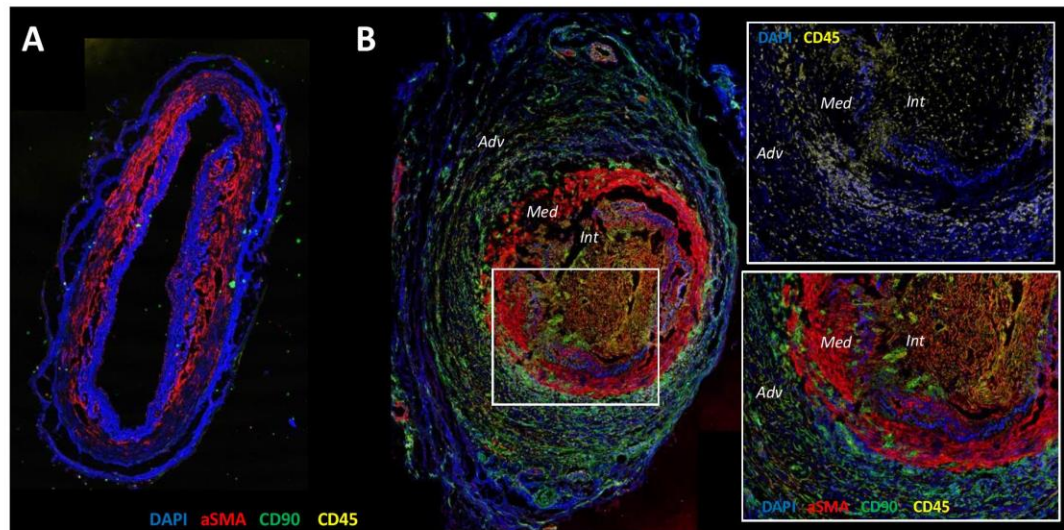


Figure 1. Confocal microscopy analysis of healthy temporal artery (A) and GCA temporal artery (B) with staining of α -SMA (red), CD90 (green), CD45 (yellow) and nuclei (DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride), blue). (A): The arterial wall of the healthy artery is well preserved. DAPI underlines collagenic structures such as internal and external elastic lamina. Vascular smooth muscle cells (α -SMA⁺) are restricted in the media and the intima is very thin. (B): The Giant Cell Arteritis (GCA) artery is characterized by inflammation and severe vascular remodeling. The zoomed-in square region shows CD45 staining of an infiltration of the arterial wall by mononuclear cells. The adventitia is rich in CD90⁺ cells that are fibroblasts, the internal elastic lamina and media are digested and there α -SMA⁺CD90⁺ cells in the intima, which fits with myofibroblasts that have migrated and proliferated from the media to the intima, resulting in severe intimal hyperplasia and leading to the stenosis of the vascular lumen.

2. Implications of Genetic Background, Epigenetics and Aging

The incidence of GCA follows a north to south gradient. The highest prevalence is observed in Scandinavian countries and in Olmsted County, Minnesota (overall annual incidence reaches 18.8 per 100,000 persons aged 50 years or older), where the population has a similar ethnicity, suggesting that the occurrence of GCA is favored by one genetic background [11–14].

In the last 20 years, several studies have reported genetic polymorphisms affecting genes involved in the immune response and inflammation that are associated with an increased risk of having GCA [15]. The most relevant association is with the major histocompatibility complex (MHC) class-II genes. There is a strong association between GCA and the human leukocyte antigen (HLA) region, which highlights the essential role of adaptive immunity in the pathogenesis of this vasculitis. Alleles of *HLA-DRB1*04*, particularly the *HLA-DRB1*0401*, *DRB1*0404* or *DRB1*0408* haplotypes, have been shown to be associated with the occurrence of GCA in independent cohorts [16–27] and are expressed by 60% of patients affected by polymyalgia rheumatica (PMR) or GCA [18,24,28]. These haplotypes are thought to be responsible for the selection of peptides involved in the GCA pathogenesis that are then presented to CD4⁺ T cells. Importantly, a genome-wide association study (GWAS) assessing 2134 GCA patients from 10 independent populations of European ancestry and 9125 controls confirmed that class-II MHC is the genomic region

with the strongest association with GCA [29]. More recently, a study including 184 patients with cranial GCA, 105 patients with large-vessel GCA and 486 healthy controls showed an association between the *HLA-B*15:01* allele and GCA, regardless of the clinical phenotype of the disease, and that there was an increased risk of developing GCA, whatever its phenotype, if *HLA-B*15:01* and *HLA-DRB1*04:01* were expressed together [30]. This latest study reinforces the concept that susceptibility to GCA is strongly related to the HLA region. Furthermore, this GWAS study also identified two genes outside the HLA region associated with GCA susceptibility: *PLG* (gene of plasminogen) and *P4HA2* (encodes an isoform of the alpha subunit of the collagen prolyl 4-hydroxylase, which is essential for collagen biosynthesis). Interestingly, these genes are involved in a wide spectrum of physiological processes, some of which are relevant to the GCA pathogenesis, such as wound healing, angiogenesis, lymphocyte recruitment and inflammation for *PLG* and vascular remodeling for *P4HA2* [29,31].

In addition to genetic factors, research has shown that a dynamic relationship exists between genetic predispositions and environmental factors via epigenetics, which is defined as the changes in gene expression that occur without altering the underlying DNA sequence but through DNA methylation, histone modifications and microRNAs [32]. Differences in the DNA methylation level have been reported in temporal arteries of GCA patients when compared to non-GCA patients for several genes. Indeed hypomethylation, leading to an increase in the expression of genes, was identified in several pro-inflammatory genes (*IFNG*, *IL21*, *IL23R*, *IL17RA*, *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *IL2*, *IL18*, *LTA*, *LTB*, *CCR7*, *CD6*, *NLRP1*), as well as *RUNX3*, which is involved in the production of IFN- γ and *CD40LG*, which encodes for CD40L, a protein involved in the cross-talk between T and B cells [33,34]. The hypomethylation of these genes correlated with the activation of T lymphocytes and their polarization into Th1 and Th17 cells, as previously described in GCA [35–37]. Along this line, it was demonstrated in the same study [34] that genes encoding for components of the TCR, for co-stimulatory molecules (*CD28*) and proteins implicated in T-cell activation pathways (*NFATC1*, *NFATC2*, *PPP3CC*), were also hypomethylated in GCA arteries when compared to non-GCA arteries [34].

Age is an essential factor in the onset of GCA, which occurs after 50 years with an increasing incidence. This could, therefore, naturally be a major etiological factor in the GCA pathogenesis [38]. The aging process is intimately related to epigenetics. The level of DNA methyltransferase 1 (DNMT1), which is the enzyme implicated in the maintenance of DNA methylation at each cell division, declines with age in T cells, causing aberrant methylation profiles that can lead to malignant transformation or autoimmunity, such as with myelodysplastic syndromes or VEXAS, which is now the archetype of the acquired auto-inflammatory disease occurring in elderly men [32,39–41].

Furthermore, the aging process has been associated with modifications to multiple cells implicated in the immune response and vascular remodeling, such as dendritic cells (DC), T cells, endothelial cells and vascular smooth muscle cells (VSMC) [38]. In particular, aging triggers a decrease in the number of naive T cells, increase in memory and effector T cells, decrease in the diversity of the T-cell repertoire and enrichment in CD4⁺CD28[−] and CD8⁺CD28[−] senescent T cells [42–45]. Immune aging also alters the regulation of immune cells, for instance, by impacting CD8⁺ Treg [46], thus leading to the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) by senescent DCs, macrophages, endothelial cells and fibroblasts [38,47]. During aging, DCs still express toll-like receptor (TLR), but their activation and migration abilities are impaired [48,49]. This aging process might generate chronic inflammation, leading to the occurrence of atherosclerosis and also autoimmune diseases such as GCA. The aging process also modifies arterial tissue, the target of GCA, by medial degeneration, calcium deposition, increased stiffness, wall thickening, elastic fiber fractures and biochemical modifications of matrix proteins [50–53]. Combined with this proinflammatory state, these modifications could trigger immunization against arterial auto-antigens and lead to the occurrence of vasculitis [38]. Similarly, a recent study showed that aging and long-term alterations to the immune system are associated

with susceptibility to developing GCA, which is also suggested by the association between a history of infections and an increased incidence of GCA [54]. Thus, aging of the immune system could explain, among other things, the association between GCA and varicella-zoster virus (VZV) infections without this virus playing a real causal role.

3. Potential Role of Infections in the Initiation of GCA

Several studies have investigated the potential roles of a large number of viruses and/or bacteria in the pathogenesis of GCA. The condition appears to have a seasonal variation, suggesting the involvement of an infectious trigger in the induction of this vasculitis [4,55]. Many case-controlled studies have compared the level of viral or bacterial DNA in TAB (PCR, immunohistochemistry or in situ hybridization) between patients with biopsy-proven GCA and controls. These studies found an association between GCA and the presence of cytomegalovirus, parvovirus B19, herpes simplex virus, human parainfluenza 1 and *Chlamydia pneumonia*, but neither Epstein-Barr virus nor human herpesvirus 6 [56]. However, the results of these studies often contradicted others and they have never been confirmed in large cohorts [56]. Recently, VZV has been suggested as a triggering factor for GCA [57]. VZV is an exclusively human neurotropic virus, which causes chickenpox and zoster and is also able to replicate in arteries, especially cerebral arteries, thus being able to induce vasculitis [58]. This vasculitis, the histological appearance of which is very similar to GCA, affects large and medium arteries and can lead to stenosis, occlusion, thrombosis or dissection [58,59]. VZV vasculitis can also affect the temporal arteries and cause GCA-like symptoms [60]. In contrast to earlier research [56,61–66], a recent study suggested that VZV may be the triggering agent of GCA because the presence of VZV was detected in 73% of positive and 64% of negative TAB from patients with GCA, compared to only 22% of negative TAB from controls [67]. Nevertheless, the implication of VZV in the pathogenesis of GCA remains unclear since these data were not confirmed in a more recent study [68]. Thus, the occurrence of zoster is infrequent in GCA [69], even when immunosuppressive therapy is used [70–79]. Plus, the antibody that was used for VZV staining for immunohistochemistry seemed to lack specificity because it cross-reacted with antigens expressed by VSMC [80]. Rather than a cause of GCA, the detection of VZV in TAB from GCA patients could just be related to immune aging that decreases the control of the replication of this virus.

The role of DC in the pathogenesis of GCA suggests a relationship between a potential infection and the initiation of GCA. It is generally assumed that an infectious agent can activate adventitial DC and trigger immunologic processes leading to the development of vasculitis. However, this hypothesis has never been fully resolved, mainly because no specific pathogen triggering GCA has been identified. Indeed, very recent work analyzing the microbiome of temporal arteries or thoracic aortic aneurysms due to GCA provided contradictory and inconclusive results [81,82]. It is quite possible that the precise nature of this potential infectious agent, providing a danger signal for DC, does not matter but that, instead, the essential point is that this activation occurs in a predisposed genetic background favoring the implementation of mechanisms leading to the occurrence of vasculitis and its persistence due to defects in the regulation of the immune system. This is a notion to which we will return in this review.

4. Immunopathological Model of GCA

The immunopathological model of GCA can be divided into four main phases (Figure 2).

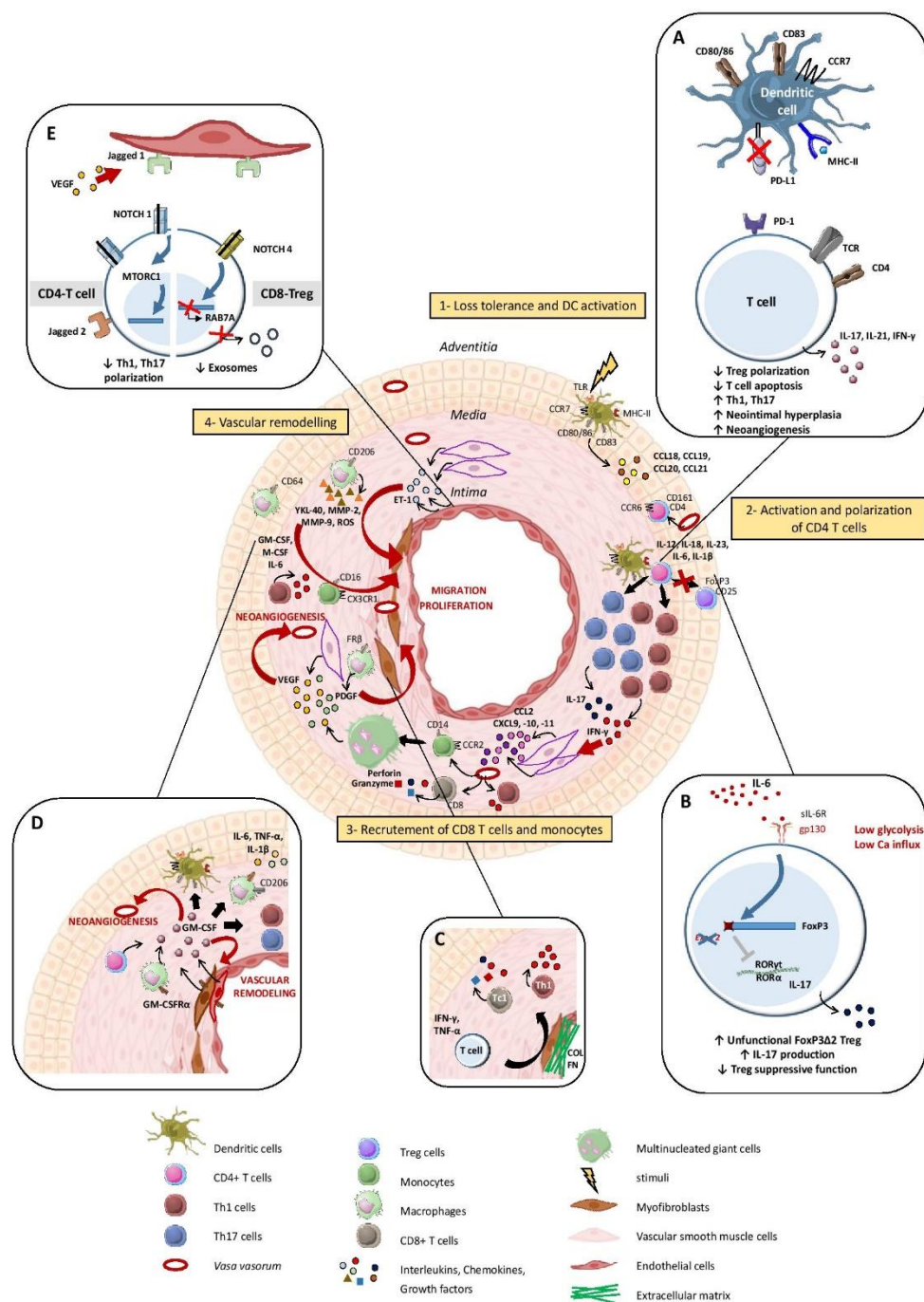


Figure 2. Summarized pathogenesis of Giant Cell Arteritis (GCA). Step 1: an undefined danger signal activates vascular dendritic cells (DC) that then acquire a mature phenotype ($CD83^+CD80/86^+CCR7^+MHC-II^{high}$) and produce chemokines (CCL18, CCL19, CCL20 and CCL21), leading to the recruitment of $CCR6^+CD161^+CD4^+$ T cells. Step 2: $CD4^+$ T cells are activated by DCs and polarize into Th1 and Th17 cells through the effect of IL-12, IL-23, IL-6 and IL-1 β , which are produced by activated DC. Th1 and Th17 lymphocytes release IFN- γ and IL-17, respectively. Step 3: IFN- γ induces the activation of vascular smooth muscle cells (VSMC) in the media and enables them to produce chemokines (CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11), which trigger the recruitment of

additional T cells (CD4⁺ and CD8⁺) and monocytes. Monocytes differentiate into macrophages and merge into multinucleated giant cells, the hallmark of GCA. **Step 4:** vascular remodeling is characterized by the destruction of the internal elastic lamina and the proliferation and migration of VSMC into the intima. Macrophages play a key role in this process through the release of several factors such as Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), reactive oxygen species (ROS), Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), IL-6, IL-1 β , Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) and TNF- α , which contribute to tissue damage and intimal hyperplasia. Likewise, VSMCs and endothelial cells release ET-1, which stimulates VSMC migration and proliferation and thus induces intimal hyperplasia. Moreover, macrophages and VSMCs also produce vascular endothelial growth factor (VEGF), which is responsible for neoangiogenesis and promotes a local inflammatory response. A cellular transition from VSMC to a myofibroblast phenotype is observed, and the accumulation of these cells in the neo-intima leads to vascular occlusion, which is responsible for ischemic complications of GCA. **(A–E)** Mechanisms involved in the maintenance of vascular inflammation. **(A):** Programmed death-ligand 1 (PDL-1) defect on antigen-presenting cell surface leads to the persistent activity of T cells and contributes to hyperplasia and neoangiogenesis. **(B):** IL-6, which is a pro-inflammatory cytokine implicated in the GCA pathogenesis, impairs Tregs' function, decreases their frequency and promotes the shift to a Treg deficiency in exon 2 of FoxP3 that is prone to producing IL-17. **(C):** In addition to their role in the recruitment of monocytes and vascular remodeling, VSMC differentiate into myofibroblasts, which also participate in the maintenance of Th1 and Tc1 polarizations. Moreover, myofibroblasts have an important capacity to produce extracellular matrix proteins (COL: collagen, FN: fibronectin) that contribute to the rigidification of the vascular wall. **(D):** GM-CSF is produced by CD4 T cells, macrophages, VSMC and endothelial cells. GM-CSF-Receptor- α is highly expressed in GCA lesions, and an autocrine amplification loop takes place. GM-CSF is involved in cell differentiation, vascular inflammation and vascular remodeling. **(E):** T cells and resident cells of the arterial wall, like endothelial cells, communicate via the NOTCH pathway. The ligation of Notch 1 to Jagged 1 decreases the polarization Th1/Th17. Otherwise, in CD8⁺Treg cells, aberrant Notch 4 signaling drives the suppression of RAB7A involved in the exosomal release of NOX2.

4.1. Phase 1: Loss of Tolerance and Activation of Resident Dendritic Cells of the Adventitia

Immature myeloid DCs (S100⁺CD11c⁺CCR6⁺CD83[−]MHC-II^{low}) are physiologically localized in the adventitia where they are involved in immune surveillance [8,83,84]. These cells can trigger adaptive immunity after detecting danger signals through pattern recognition receptors (PPRs) such as TLR. By contrast, they induce tolerance in the absence of a danger signal [85]. The detection of a danger signal via TLR of adventitial DCs induces their activation, followed by phenotypic modifications (S100⁺CD11c⁺CCR7⁺CD83⁺CD80/86⁺MHC-II^{high}) and the production of cytokines and chemokines responsible for the recruitment of CD4⁺ T cells in the arterial wall. Once they are activated, DCs express high levels of class-II major histocompatibility complex (MHC-II) and co-stimulatory molecules (CD80 and CD86), making them capable of activating CD4⁺ T cells. In GCA, DCs produce CCL19 and CCL21 chemokines and express their receptor (CCR7) so that they are trapped in the arterial wall instead of migrating into satellite lymph nodes, as is the case in classical immune responses [83].

Adventitial DCs play an essential role in initiating the GCA pathogenesis. It has been demonstrated in a model of immunocompromised mice engrafted with temporal arteries that DC activation, mainly by TLR4 ligands, is needed to trigger the recruitment of T cells in the arterial wall. A major role of DCs in the GCA pathogenesis was also shown by how the depletion of CD83 cells (i.e., activated DCs and macrophages) in this model resulted in a significant decrease in lesions of vasculitis and IFN- γ mRNA expression [84]. The tropism of GCA for cranial arteries could also be related to characteristics of arterial DCs as it was demonstrated that TLR expression varied across arterial territories and that the TLR expression profiles of arteries typically affected by GCA were very similar [86].

4.2. Phase 2: Recruitment, Activation and Polarization of CD4⁺ T Cells

CD4⁺ T cells, which are physiologically absent from the walls of healthy arteries, play a major role in the pathogenesis of GCA, as highlighted by the fact that their depletion in immunocompromised mice engrafted with GCA arteries strongly decreases vasculitis lesions [87]. Studies have also shown a restricted oligoclonal repertoire of T-cell receptors (TCRs) in the arterial wall, thus indicating an antigen-mediated proliferation of CD4⁺ T cells [88–90]. The activation of T cells in GCA is also highlighted by NFAT expression and its localization to the nuclei of cells in GCA lesions [34]. In GCA, CD4⁺ T cells are recruited through the chemokines (CCL18, CCL19, CCL20 and CCL21) produced by activated DCs [8,56]. Among these chemokines, CCL20 plays a major role as it triggers the recruitment of CD4⁺ T cells expressing CCR6, the ligand of CCL20. Interestingly, the nature of the initial danger signal determines the architecture of the vasculitis. TLR4 ligands trigger the recruitment of CD4⁺CCR6⁺ T lymphocytes, a phenotype matching Th17 cells [36,91–93], and then infiltrate all the layers of the artery, leading to panarteritis, which is characteristic of GCA. By contrast, TLR5 ligands only trigger adventitial vasculitis close to *Vasa vasorum* [94].

T cells are thought to be recruited via *Vasa vasorum* of the adventitia, in which endothelial cells express adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) [8,56]. Endothelial cells are a natural barrier between blood and tissues and are involved in the regulation of vasomotion, hemostasis, angiogenesis and inflammation. In GCA, endothelial cells are activated by the cytokines produced by mononuclear cells and thus express high levels of adhesion molecules such as ICAM-1, ICAM-2, P-selectin, E-selectin and VCAM-1, which participate in the recruitment of additional immune cells [95]. Along this line, the concentration of soluble ICAM-1 in GCA patients correlates with disease activity [96].

Once recruited in the arterial wall, CD4⁺ T cells are activated by DCs that present still unidentified antigen(s). The presence of proinflammatory cytokines (IL-12, IL-18, IL-23, IL-6 and IL-1 β) in the microenvironment polarizes CD4⁺ T lymphocytes toward Th1 and Th17 cells [36,37,97]. Th1 cells are generated in the presence of IL-12 and IL-18 and produce IFN- γ , whereas Th17 cells are generated in the presence of IL-6, IL-1 β and IL-23 and produce IL-17 [93]. This polarization toward Th1 and Th17 rather than Th2 or Treg cells is favored by preferential recruitment of CD4⁺CD161⁺ T cells, which express CCR6 and are prone to polarize into Th17 and Th1 cells, with a high level of plasticity between these two subsets that is highlighted by the presence of a high number of double-positive cells (IFN- γ ⁺IL-17⁺) [36].

IL-17 production by Th17 is rapidly decreased by corticosteroid treatment [35–37,98], whereas IFN- γ production by Th1 cells tends to persist, especially at lower corticosteroid doses [35], which may contribute to the persistence of smoldering vascular inflammation, explaining the occurrence of relapse in about one in two patients when corticosteroids are tapered [99].

Therefore, therapeutic strategies targeting Th1 cells more specifically seem to be required to improve the treatment of GCA. This could be achieved by therapeutic strategies inhibiting intracellular cytokine signaling such as Janus kinase (JAK) inhibitors. Environment-cell communications rely on cytokine signals that trigger the JAK and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway. Th1 lineage commitment is strictly linked to STAT1- and STAT4-mediated gene induction, and STAT3 is considered the master regulator for Th17 cell differentiation. The effect of tofacitinib, a JAK3 and JAK1 inhibitor, has been studied in immunocompromised mice engrafted with temporal arteries and reconstituted with T cells and monocytes from GCA patients. The authors showed that, compared to healthy arteries, GCA arteries were characterized by an increased expression of STAT1- and STAT2-targeted genes, thus highlighting the activation of the IFN- γ pathway. Furthermore, pharmacologic inhibition of JAK3 and JAK1, the latter being involved in the IFN- γ pathway, effectively decreased vascular inflammation, the Th1 immune response, neoangiogenesis and intimal hyperplasia [100].

The implication of Th17 cells, the proportion of which is increased in the blood of GCA patients and that infiltrate GCA arteries [35–37], contrasts with a quantitative defect of circulating Treg ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$) and the low expression of FoxP3 in the arteries of GCA patients [36,101]. These data support the concept of a Th17/Treg imbalance in GCA [92] and are consistent with the implication of IL-6 in the pathogenesis of this vasculitis. IL-6, which is produced in GCA lesions [98] and the concentration of which in the serum correlates with disease activity [7,36], physiologically controls the Th17/Treg balance since IL-6 and transforming growth factor-beta ($TGF-\beta$) trigger Th17 polarization, whereas $TGF-\beta$ alone leads to the generation of Treg [102].

In addition to IL-6, IL-21, a pro-inflammatory cytokine mainly produced by follicular helper T cells (TFH) [103], is also produced in GCA lesions. The proportion of $CD4^+IL-21^+$ T cells is increased in the blood of GCA patients and correlates with the levels of Th1 and Th17 cells. Moreover, IL-21 increases Th1 and Th17 polarization, whereas it decreases Treg differentiation in vitro [37].

Interestingly, the predominant cytokine profile could play a role in the emergence of the various histological patterns of GCA [104,105]. It was reported that IL-17 overexpression was observed mainly in arteries with transmural inflammation and vasa vasorum vasculitis, whereas IL-9 and Th9 polarization was predominant in cases of transmural inflammation and small-vessel vasculitis [106].

4.3. Phase 3: Recruitment of $CD8^+$ T Cells and Monocytes

The strong infiltration of Th1 and Th17 cells into the arterial wall is responsible for the production of large amounts of IFN- γ and IL-17, respectively. IFN- γ induces the production of several chemokines (CCL2, CXCL9, CXCL10 and CXCL11) by VSMCs [107]. CXCL9, CXCL10 and CXCL11 trigger the recruitment of additional Th1 and also $CD8^+$ T cells expressing CXCR3 [108]. As was demonstrated for $CD4^+$ T cells, we showed that the repertoire of circulating $CD8^+$ T cells is also oligoclonal, thus supporting their antigen-driven activation. Furthermore, $CD8^+$ T cells infiltrate the arterial wall and produce cytokines (IL-17 and IFN- γ) and cytotoxic molecules (granzymes and perforin) [108]. Through the production of cytotoxic molecules and IFN- γ , $CD8^+$ T cells could be of particular importance for initiating vascular remodeling pathways, as supported by the fact that strong $CD8^+$ T cell infiltration into temporal arteries is associated with more severe disease [108].

Monocytes are precursors of tissue macrophages. There are different subsets of monocytes, which differ in their phenotype, function and chemotaxis pathway. Recruitment of classical monocytes ($CD14^{bright}CD16^{neg}$) mainly depends on the CCR2-CCL2 axis, while that of non-classical monocytes ($CD14^{dim}CD16^+$) depends on the CX3CR1-CX3CL1 axis [109]. In the blood of GCA patients, the dynamics and distribution of monocyte subsets are altered [110,111]. In GCA lesions, IFN- γ induces the production of CCL2 by VSMC, which leads to the recruitment of monocytes that express its receptor (CCR2) and then merge to form multinucleated giant cells, the hallmark of GCA [107]. Along this line, macrophages with a phenotype resembling the classical monocyte subset and expressing CCR2 were detected in the vessel wall of GCA patients [109,111]. However, other studies have qualified this hypothesis by showing that the majority of macrophages infiltrating temporal arteries of GCA patients resemble non-classical monocytes with CD16 and CX3CR1 expression, but often lack CCR2 expression [111,112], suggesting that both classical and non-classical monocytes are involved in GCA and that further studies focusing on monocytes and macrophages are needed.

4.4. Phase 4: Vascular Remodeling

Ischemic signs of GCA are related to the progressive narrowing of vascular lumen in affected arteries, which is the consequence of the remodeling process involving the arterial wall. This process is characterized by the destruction of the media and the emergence of a neo-intima made of myofibroblasts and extracellular matrix proteins, resulting in intimal hyperplasia and vessel occlusion (Figure 1) [4].

Macrophages play a major role in vascular remodeling through their ability to produce enzymes, growth factors and other mediators. Two types of macrophages are usually distinguished. M1 macrophages, which express CD64, are induced by IFN- γ and exert pro-inflammatory functions thanks to the production of proinflammatory cytokines, growth factors, matrix metalloproteinases (MMP) and reactive oxygen species (ROS). In contrast, M2 macrophages, which express CD206 and FR β , have anti-inflammatory and tissue-repairing functions. Like T cells, macrophages are highly plastic, and their heterogeneous phenotype has been reported in GCA [112,113]. It is important to note that the distinction between M1 and M2 macrophages is based on *in vitro* data and that under pathological conditions, this distinction is not as clear-cut. In addition, cytokines produced by T cells, such as IFN- γ , IL-17 or GM-CSF, can affect the phenotypes of macrophages, with more complex phenotypes appearing than just M1 and M2 [112]. IFN- γ primes pro-inflammatory macrophages that produce IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 and PDGF. IL-17 induces CD163 expression, which is indicative of M2-type polarization. GM-CSF can skew macrophages toward CD206⁺ ones that produce YKL-40, MMP-9 and M-CSF [112].

Macrophages play a critical role in vascular remodeling by promoting angiogenesis, intimal hyperplasia and tissue destruction. A recent study investigated the special distribution of different macrophage phenotypes in GCA arteries and showed that CD206⁺MMP-9⁺ macrophages are located at the site of tissue destruction, whereas FR β ⁺ macrophages are located in the inner intima of arteries with degrees of intimal hyperplasia, and that this pattern was specific to GCA lesions and not seen in atherosclerotic lesions. Further experiments showed that GM-CSF upregulated CD206 expression, whereas FR β was increased in M-CSF-skewed macrophages [114]. This led the authors to hypothesize that, once recruited in the arterial wall, monocytes are exposed to GM-CSF produced by T and B lymphocytes and endothelial cells, and thus differentiate into CD206⁺ macrophages that produce MMP9 involved in the destruction of the arterial wall. These CD206⁺ macrophages can also produce M-CSF, which induces the expression of FR β that produce mediators, mainly PDGF-AA, promoting myofibroblast migration and proliferation and thus intimal hyperplasia, leading to ischemic signs of GCA [114].

In addition, the same group demonstrated an increase in YKL-40 produced by the CD206⁺MMP9⁺ macrophage subset in GCA inflamed temporal arteries [115]. Consistent with their previous results, they showed *in vitro* that GM-CSF increased the production of YKL-40 more than M-CSF in macrophages from GCA patients, but not from healthy controls. Functional experiments showed that knockdown of YKL-40 with siRNA led to a significant reduction in MMP-9 production by macrophages. In contrast, YKL-40 increased neoangiogenesis as assessed by tube formation by HUVECs. Taken together, these results suggest that targeting GM-CSF, YKL-40 or its receptor (IL-13R α 2) is promising to control vascular remodeling in GCA [115].

MMPs are also key players in vascular remodeling. MMP-2 and MMP-9 produced by VSMCs and macrophages degrade elastin and destroy cellular matrix proteins, causing the destruction of the media and digestion of the internal elastic lamina [56,116]. MMP-2 and MMP-9 are the main MMP detected in GCA lesions, essentially in macrophages and giant cells adjacent to the internal elastic lamina [113,117,118]. As mentioned before, recent studies indicate that MMP-9 is mainly produced by CD206⁺YKL-40⁺MMP-9⁺ macrophages localized in the media and media borders where elastic lamina degradation takes place, and that these cells support tissue destruction and neoangiogenesis [112,115]. MMP-9 also plays a major role in large-vessel vasculitis by controlling the access of monocytes and T cells to the vascular wall since T cells depend on MMP-9 producing monocytes to pass through collagen IV membranes. This major role of MMP-9 in GCA was confirmed using a human artery-SCID-mouse model in which wall inflammation was induced in human vessels engrafted to immunodeficient mice that were immunoreconstituted with PBMC from patients with GCA. In this model, mice receiving anti-MMP-9 treatment for two weeks had a dramatic decrease in all vasculitis processes (T-cell and monocyte infiltration, neoangiogenesis, neointimal growth) [119].

Current knowledge also suggests that IFN- γ , which is produced by Th1 cells, is the main lymphocytic cytokine inducing vascular remodeling. IFN- γ -activated macrophages, giant cells or injured VSMCs produce growth factors, essentially platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) [120]. PDGF is implicated in the activation and proliferation of VSMCs and their migration toward the intima, thus resulting in intimal hyperplasia. In GCA, VSMCs are injured by mediators released by mononuclear cells, which have accumulated in the media, and acquire pro-inflammatory properties [121]. Activated macrophages and VSMCs themselves produce several growth factors (PDGF, TGF- β , endothelin-1 [ET-1], NGF and BDNF neutrophins [98,121–123]), thus inducing the migration of VSMCs into the intima and their differentiation into myofibroblasts, which synthesize matrix proteins. This process finally leads to intimal hyperplasia and vascular occlusion. VSMCs also produce MMP-9 and especially MMP-2, which allow them to destroy the media and the internal elastic lamina [94,124], thus facilitating their migration into tissues. Furthermore, the blockade of the PDGF receptor with imatinib results in a significant decrease in the proliferation of VSMCs from ex vivo cultured temporal arteries [121]. ET-1 has also been shown to be implicated in vascular remodeling during GCA. In normal conditions, ET-1 is produced by endothelial cells and VSMCs. In GCA, the ET-1 pathway is upregulated since ET-1 is expressed by leukocytes and VSMCs and as there is upregulation of the expression of receptors A and B of ET-1 by VSMCs [125,126]. The blockade of ET-1 receptors (A and/or B) decreases the migration [126] and proliferation [125] of VSMCs, thus demonstrating that the ET-1 pathway is also implicated in remodeling processes leading to vascular occlusion.

VEGF is responsible for neoangiogenesis, which increases the recruitment of other immune cells in the arterial wall [127]. Illustrating this neoangiogenesis process, *vasa vasorum*, which are physiologically restricted to the adventitia, are observed in the media and intima of arteries affected by GCA and correlate with internal elastic lamina digestion and infiltration by giant cells. IL-33, which is an alarmin belonging to the IL-1 family, is overexpressed in GCA arteries and also involved in angiogenesis [128].

5. Role of B Cells

In GCA, B cells are much rarer than T cells in the arterial wall. They are localized in the adventitia and the media next to CD3⁺ cells in structures defined as artery tertiary lymphoid organs (ATLOs) [129]. Studies showed an association with ectopic expression of CXCL13 and B-cell activation factor (BAFF), which increases after in vitro stimulation of temporal arteries with IL-6 [130]. Furthermore, a recent study showed that chemokines CXCL9 and CXCL13 are increased in the circulation of untreated GCA and PMR patients and that peripheral CXCR3⁺ and CXCR5⁺ switched memory B cells are significantly reduced in GCA and PMR compared to healthy controls and inversely correlate with the serum levels of their complementary chemokines CXCL9 and CXCL13. Suggesting the implication of these chemokines in the recruitment of B cells in the arterial wall, CXCR3⁺ and CXCR5⁺ B cells were observed in areas with high expression levels of CXCL9 and CXCL13 [131].

Nevertheless, the humoral immune response does not appear to play as important a role in GCA as in Takayasu arteritis, which is the other primary large-vessel vasculitis. Indeed, a recent study found an increased TFH signature in both circulating and aortic CD4 T cells in Takayasu arteritis but not in healthy controls or GCA patients. This highlights that the cooperation between T and B cells is probably more critical in Takayasu arteritis than in GCA [132]. Another study that analyzed the involvement of mammalian target of rapamycin (mTOR) in large-vessel vasculitis suggested that humoral immunity plays an important role in Takayasu arteritis but not GCA [133]. Indeed, this study demonstrated that mTOR complexes were activated in endothelial cells from Takayasu patients but not GCA patients, and that there were higher levels of antibodies binding to endothelial cells in Takayasu patients compared to GCA. Purified antibodies from Takayasu patients caused mTOR activation and significant endothelial cell proliferation, which was not the case with antibodies from GCA patients [133].

6. Mechanisms Involved in Maintaining Inflammation

As discussed above, the mechanisms involved in inflammation and vascular remodeling are becoming better understood and are promising therapeutic targets. In addition, some mechanisms allow inflammation to become chronic, which could also represent interesting therapeutic targets to replace glucocorticoids.

6.1. Defect in Immune Checkpoints Inhibitors

Programmed death-1 (PD-1) is a surface protein expressed by activated T cells, and its ligation to PD-L1 or PD-L2, which are expressed by antigen-presenting cells, induces T-cell apoptosis, T-cell anergy and the production of IL-10 by T cells or their polarization into Treg. By contrast, PD-1^{-/-} mice, in which the PD-1/PD-L1 pathway was lacking, displayed elevated Th1 and Th17 levels [134]. In GCA, a defect in the immunoprotective PD-1/PD-L1 immune checkpoint has recently been reported. This deficit relates to the lower expression of PD-L1 by vascular DCs, which sustain IL-17-, IL-21- and IFN- γ -producing PD-1⁺ T cells and the emergence of typical lesions of GCA, such as intimal hyperplasia and neoangiogenesis [135]. Along this line, it was shown that the proportions of PD-1⁺ and VISTA⁺ (a negative immune checkpoint V-domain immunoglobulin-containing suppressor of T cell activation) T cells were decreased in the blood of GCA patients because they were recruited in GCA lesions. However, contrasting with PD-1/PD-L1, VISTA-Ig engagement failed to suppress Th1, Th17 and TFH lineage development in GCA [136].

The implication of immune checkpoints in the GCA pathogenesis was also highlighted by the recently demonstrated efficacy of abatacept for the treatment of GCA [137]. Abatacept is a fusion protein composed of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) and the fragment crystallizable region of a human IgG₁. Due to the competitive binding of CTLA4 to CD80/CD86, abatacept dampens T-cell activation by impeding the interaction between CD28 and CD80/86. In contrast, the occurrence of PMR/GCA has recently been reported in patients treated with antagonists of CTLA-4 or PD-1 used in metastatic melanoma, ipilimumab and nivolumab [138,139].

6.2. Defect in Regulating T Cells (Tregs)

Tregs are major actors in immune tolerance and protect patients from inflammation and autoimmunity [140]. Our team reported a quantitative defect in circulating Tregs (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) together with their absence from arterial lesions of GCA [36]. The Treg population is heterogeneous and they are best defined by their functional activity [141]. Confirming the role of a defective T regulatory response in GCA, two studies recently demonstrated that GCA patients had a Treg compartment enriched in IL-17 secreting a Treg (Th17-like Treg) with an impaired suppressive capacity, which was mainly related to the expression of a hypofunctional isoform of FoxP3 lacking exon 2 (FoxP3 Δ 2), which is required for the antagonization of ROR γ t and ROR α , the main transcriptional factors controlling the production of IL-17 [101,142]. The blockade of the IL-6 pathway with tocilizumab normalized the population of FoxP3 Δ 2 Treg, thus suggesting that IL-6 is involved in this defect [101]. In addition, we demonstrated that, unlike healthy controls, Tregs from GCA patients increased the polarization of T cells toward Th17 cells, which was corrected after in vitro treatment with tocilizumab [101]. Another study compared the transcriptomic signatures of Tregs from healthy controls and GCA patients in the active phase or in remission. The results, which were confirmed by functional experiments, showed that the calcium influx and glycolysis were severely impaired in Tregs from GCA patients, that these abnormalities correlated with Treg dysfunction in GCA and that tocilizumab could not correct this defect in the calcium influx [143].

As for CD4⁺ T cells, a defect in CD8⁺ regulatory T cells was also reported in GCA [46]. CD8 Tregs, which are defined by a CD8⁺CCR7⁺FoxP3⁺ phenotype, control the proliferation and activation of CD4⁺ T cells through the production of exosomes containing NADPH oxidase 2 (NOX2). These exosomes are captured by neighboring CD4⁺ T cells, in which NOX2 disrupts activation, survival and proliferation pathways [46]. Interestingly, aging is

associated with a progressive loss of the expression of NOX2 by CD8 Treg; this decrease is even more important in GCA and not corrected by glucocorticoids [46].

6.3. Implication of Other Subsets of T Cells

Our team recently investigated the implication of mucosal-associated invariant T cells (MAIT) in GCA. MAIT cells are innate-like lymphocytes characterized by the expression of a semi-invariant T-cell receptor (TCR) composed of a constant α chain (TCRV α 7.2-J α 33) and a β chain (among a limited number of variants, often V β 2 and V β 13). Interaction between the two is restricted to major histocompatibility complex (MHC)-related protein 1 (MR1). MAITs display an immediate effector function on stimulation, and they have a high clonal volume [144]. It has also been established that MAIT cells are activated during viral infections by a TCR-independent pathway [145–147]. This particular means of activating MAIT cells involves IL-12 and IL-18 [148], two cytokines that are highly expressed in GCA lesions [84,148], which led us to hypothesize that MAIT cells could be involved in the GCA pathogenesis, as is the case in ANCA-associated vasculitis [149]. MAIT cells were found in the arterial wall of GCA temporal arteries but were absent from healthy arteries. The MAIT frequency was similar in the blood of patients and controls, but the level of expression of IFN- γ was increased in MAIT cells from GCA patients, and when they were stimulated with IL-12 and IL-18, MAIT from GCA patients produced very high levels of IFN- γ and displayed stronger proliferation compared to MAIT from controls. Thus, MAIT could be involved in the maintenance of the inflammatory response during GCA through its ability to be activated by IL-12 and IL-18 without TCR signaling, especially since these two cytokines are present in GCA lesions [84,150].

Another study also suggested a role of tissue-resident memory T cells (TRMs) in chronic inflammation. Specialized to remain resident in the tissue microenvironment, TRMs are thought to provide rapid and effective immune responses when they re-encounter antigens, and they are considered pathogenic in chronic inflammatory diseases. They have a pro-inflammatory effector function and secrete pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-17, IL-9 and TNF- α . In GCA arteries, there is a population of CD4⁺CD103⁺ memory T cells that are barely detectable in the peripheral blood. This TRM population is sustained by IL-7, IL-9 and IL-15, which are present in the tissue microenvironment of GCA lesions. TRMs require JAK3/1-dependent signaling through γ c chain-containing cytokine receptors to survive. Along this line, researchers demonstrated that the inhibition of JAK1/3 activity with tofacitinib minimized the *in situ* proliferation of CD4⁺CD103⁺ TRM. The persistence of vascular wall inflammation in GCA arteries may, therefore, also depend on a small, highly specialized population of CD4⁺CD103⁺ TRMs characterized by their ability to survive in the tissue microenvironment [100].

6.4. Role of VSMCs

VSMCs are major components of the vessel wall. They are characterized by contractile functions, a synthetic function that produces components of the extracellular matrix and they are also involved in tissue repair through their ability to migrate and proliferate [94]. In GCA, VSMCs are not only targets but also actors in the inflammatory response. In addition to their ability to migrate and proliferate, which are fundamental to vascular remodeling, when exposed to IFN- γ , these cells produce chemokines that enhance the recruitment of new T cells and monocytes [107]. This sets up an amplification loop that will contribute to the development of vascular inflammation. In addition to this function, we have data in the process of publication showing that myofibroblasts can interact with T cells and maintain their Th1 polarization.

6.5. Implication of the NOTCH Pathway

The interplay between T cells and resident cells of the arterial wall also involves the NOTCH pathway, a highly conserved cell-signaling system that is important for cell-cell communication, gene regulation mechanisms controlling cell differentiation processes

during embryonic and adult life, and the development of blood vessels. NOTCH receptors and their ligands (Jagged and Delta) are transmembranous proteins. The ligation of NOTCH to Jagged or Delta ligands triggers proteolytic events leading to the translocation of the intracellular domain of NOTCH into the nucleus, where it interacts with transcription factors regulating the destiny of cells [151,152]. Several NOTCH receptors and their ligands are expressed in healthy arteries where they regulate differentiation, along with plasticity of the VSMC phenotype, and facilitate the cross-talk between VSMCs and endothelial cells [153]. VSMCs and endothelial cells express NOTCH receptors and their ligands, as well as CD4⁺ T cells that express Notch 1 and Jagged 2 [154]. In GCA, abundant VEGF in the blood upregulates the expression of Jagged 1 by adventitial microvascular endothelial cells, allowing effector T-cell induction via the Notch-mTORC1 pathway. CD4 T cells in GCA patients differentiate into Th1 and Th17 effector cells through the NOTCH pathway, and in an in vivo model of large-vessel vasculitis, exogenous VEGF functioned as an effective amplifier to recruit and activate vasculitogenic T cells [155]. Furthermore, Notch 1 was 20 times higher in T cells from GCA patients than those from healthy controls, which allowed them to interact with DCs, macrophages, VSMCs and endothelial cells expressing Notch 1 ligands [156]. The blockade of the NOTCH pathway with γ -secretase treatment in a mouse model of GCA strongly depleted Th1 and Th17 cells from the vascular infiltrates, thus showing the implication of this pathway in the GCA pathogenesis [156]. Furthermore, a recent paper showed that in GCA, the molecular defect of malfunctioning CD8⁺Treg cells lies in aberrant Notch 4 signaling that deviates endosomal trafficking and minimizes exosome production. By transcriptionally controlling the profile of RAB GTPases, Notch 4 signaling restricts the vesicular secretion of the enzyme NADPH oxidase 2 (NOX2) [157].

6.6. Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)

Emerging as a key cytokine in inflammation, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) may play a role in promoting inflammation in GCA. GM-CSF contributes to the pathophysiology of GCA by regulating inflammatory macrophages, DCs and Th1 and Th17 cells and is involved in angiogenesis and vascular remodeling [112,158–161]. A recent study demonstrated that GM-CSF and GM-CSF receptor α (GM-CSFR α) transcripts and proteins were highly expressed in GCA vascular lesions and that macrophages and pericytes were the main sources of GM-CSF in GCA lesions [160]. Moreover, signaling pathways activated by GM-CSF (JAK2, STAT5A) were shown to be activated in GCA lesions [160]. Using a model of an ex vivo culture of temporal arteries treated with GM-CSF or anti-GM-CSF (mavrilimumab), researchers showed that GM-CSF increased the activation of macrophages (expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , CD83 and HLA-DR), Th1 cell polarization, angiogenesis and tissue injury (MMP9/TIMP1 ratio) [160]. These results led a phase-2, randomized, placebo-controlled therapeutic trial to be conducted, the results of which strongly suggest the efficacy of mavrilimumab, a fully human IgG4 monoclonal antibody targeting GM-CSF, in the treatment of GCA [162].

6.7. Role of Interleukine-6 (IL-6)

IL-6 is produced by many cells, especially monocytes and macrophages, and has pleiotropic effects. IL-6 signaling depends on gp130, a transmembranous glycoprotein that triggers the phosphorylation of STAT3. Gp130 is activated through its ligation to a complex composed of IL-6 and its receptor, either membranous (mIL-6R) or soluble (sIL-6R). While the expression of gp130 is ubiquitous, the expression of mIL-6R is restricted to hepatocytes, monocytes, macrophages, a few B and T cells, megakaryocytes and endothelial cells [163]. Classical signaling of IL-6 involves mIL-6R, whereas trans-signaling involves sIL-6R, the latter being of particular importance among the pro-inflammatory functions of IL-6 [163].

In GCA, the concentration of serum IL-6 is very high and correlates positively with disease activity [7,36]. The major role of IL-6 in the GCA pathogenesis is demonstrated by the dramatic efficacy of tocilizumab for the treatment of GCA [78,164]. Furthermore, the Th17/Treg imbalance observed in GCA [36] is controlled by IL-6, which increases Th17 polarization and decreases Treg differentiation [102]. IL-6 is also involved in the recruitment

of leukocytes in the arterial wall. When they are exposed to IL-6, endothelial cells that express mIL-6R and gp130 express adhesion molecules such as VCAM-1 and ICAM-1, thus leading to the recruitment of leukocytes expressing VLA-4 and LFA-1 by increasing their attachment and transendothelial migration [165]. Furthermore, the intercellular IL-23p19 peptide, produced in endothelial cells in GCA and promoted by pro-inflammatory factors (LPS, TNF- α and IFN- γ), stimulates the gp130-dependent activation of STAT3 by its association with the cytokine receptor subunit gp130, thus leading to an increase in intercellular adhesion molecules at the cell surface. Therefore, IL-6 triggers the amplification of the inflammatory processes involved in the GCA pathogenesis [165]. In contrast, IL-6 does not appear to be involved in vascular remodeling. A recent study demonstrated that despite an increase in VEGF after IL-6 treatment of temporal artery explants from GCA patients, there was no increase in myofibroblast proliferation or migration after IL-6 treatment [166].

7. Conclusions

Knowledge of the mechanisms involved in the pathogenesis of GCA has improved considerably in recent years, leading to the identification of new therapeutic targets to improve patient treatment and reduce the use of glucocorticoids. The most recent work also showed the involvement of processes leading to the amplification and/or maintenance of inflammation and vascular remodeling, such as regulatory T response defects (regulated by IL-6), GM-CSF and the roles of macrophages and NOTCH, along with probably a major role of arterial wall resident cells. These mechanisms identify targets for the development of new therapeutics such as tocilizumab [77], and more recently, mavrimumab [162], secukinumab [167], JAK inhibitors [168], abatacept [137] and ustekinumab [169–171] (Figure 3) [172].

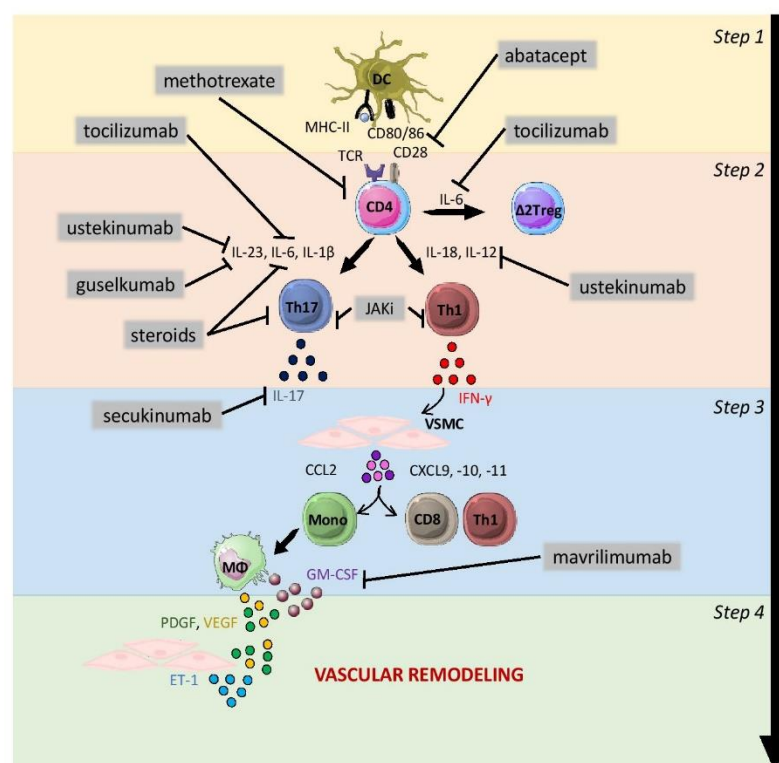


Figure 3. Therapeutic strategies in GCA. Steps 1–4 show the pathogenesis of the GCA physiopathology: 1—activation of dendritic cells; 2—activation, proliferation and polarization of T cells toward Th1 and

Th17 cells; 3—effect of interferon-gamma (IFN- γ) on vascular smooth muscle cells (VSMCs) leading to the recruitment of additional CD4 T cells together with CD8 T cells and monocytes; 4—production of mediators implicated in vascular remodeling: neoangiogenesis (VEGF), migration, proliferation and differentiation of VSMCs into myofibroblasts, leading to hyperplastic neointima. The main drugs approved or under evaluation for the treatment of GCA are shown in the figure with their main therapeutic targets. Steroids inhibit T-cell activation, proliferation and polarization into Th17 cells. In addition, they trigger a decrease in the level of serum IL-6. Abatacept blocks T-cell activation through its ability to prevent interaction between CD28 and CD80/86. Methotrexate inhibits the proliferation of T cells and their ability to produce cytokines. Ustekinumab targets the p40 subunit, which is shared by IL-12 and IL-23. Guselkumab targets the p19 subunit of IL-23. Tocilizumab targets the receptors of IL-6. Mavrilimumab targets GM-CSF and should, therefore, impact vascular remodeling. Janus kinase inhibitors (JAKi) block the signaling pathways of several cytokines such as IL-6, IL-12 and IFN- γ and can thus theoretically inhibit the Th1 and Th17 pathways, to inhibit vascular inflammation and remodeling. DC: dendritic cells; VSMC: vascular smooth muscle cells; Mono: monocytes; M Φ : macrophages; PDGF: platelet-derived growth factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; ET-1: endothelin-1; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Author Contributions: Conceptualization, H.G., C.G., A.R., B.B. and M.S.; writing—original draft preparation, H.G. and C.G.; writing—review and editing, M.S.; supervision, B.B. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: Maxime Samson: Abbvie (consultant), Boehringer Ingelheim (consultant), Vifor Pharma (consultant and invitation to congresses), Roche Chugai (consultant and invitation to congresses), Novartis (consultant and research grant); Bernard Bonnotte: Roche-Chugai (consultant and remuneration for symposiums), Boehringer Ingelheim (consultant).

References

- Jennette, J.C.; Falk, R.J.; Bacon, P.A.; Basu, N.; Cid, M.C.; Ferrario, F.; Flores-Suarez, L.F.; Gross, W.L.; Guillevin, L.; Hagen, E.C.; et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* **2013**, *65*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Espitia, O.; Samson, M.; Le Gallou, T.; Connault, J.; Landron, C.; Lavigne, C.; Belizna, C.; Magnant, J.; de Moreuil, C.; Roblot, P.; et al. Comparison of idiopathic (isolated) aortitis and giant cell arteritis-related aortitis. A French retrospective multicenter study of 117 patients. *Autoimmun. Rev.* **2016**, *15*, 571–576. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Berti, A.; Campochiaro, C.; Cavalli, G.; Pepe, G.; Praderio, L.; Sabbadini, M.G.; Dagna, L. Giant cell arteritis restricted to the limb arteries: An overlooked clinical entity. *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14*, 352–357. [\[CrossRef\]](#)
- Salvarani, C.; Cantini, F.; Hunder, G.G. Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *Lancet* **2008**, *372*, 234–245. [\[CrossRef\]](#)
- Salvarani, C.; Macchioni, P.; Zizzi, F.; Mantovani, W.; Rossi, F.; Castri, C.; Capozzoli, N.; Baricchi, R.; Boiardi, L.; Chiaravalloti, F.; et al. Epidemiologic and immunogenetic aspects of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in northern Italy. *Arthritis Rheum.* **1991**, *34*, 351–356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hernandez-Rodriguez, J.; Segarra, M.; Vilardell, C.; Sanchez, M.; Garcia-Martinez, A.; Esteban, M.J.; Grau, J.M.; Urbano-Marquez, A.; Colomer, D.; Kleinman, H.K.; et al. Elevated production of interleukin-6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant-cell arteritis: Angiogenic activity of interleukin-6 as a potential protective mechanism. *Circulation* **2003**, *107*, 2428–2434. [\[CrossRef\]](#)
- Roche, N.E.; Fulbright, J.W.; Wagner, A.D.; Hunder, G.G.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* **1993**, *36*, 1286–1294. [\[CrossRef\]](#)
- Weyand, C.M.; Goronzy, J.J. Medium- and large-vessel vasculitis. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 160–169. [\[CrossRef\]](#)
- Weyand, C.M.; Goronzy, J.J. Immune mechanisms in medium and large-vessel vasculitis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2013**, *9*, 731–740. [\[CrossRef\]](#)
- Watanabe, R.; Zhang, H.; Berry, G.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Immune checkpoint dysfunction in large and medium vessel vasculitis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2017**, *312*, H1052–H1059. [\[CrossRef\]](#)

11. Chaudhry, I.A.; Shamsi, F.A.; Elzaridi, E.; Arat, Y.O.; Bosley, T.M.; Riley, F.C. Epidemiology of giant-cell arteritis in an Arab population: A 22-year study. *Br. J. Ophthalmol.* **2007**, *91*, 715–718. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Lee, J.L.; Naguwa, S.M.; Cheema, G.S.; Gershwin, M.E. The geo-epidemiology of temporal (giant cell) arteritis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2008**, *35*, 88–95. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Salvarani, C.; Crowson, C.S.; O'Fallon, W.M.; Hunder, G.G.; Gabriel, S.E. Reappraisal of the epidemiology of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota, over a fifty-year period. *Arthritis Rheum.* **2004**, *51*, 264–268. [\[CrossRef\]](#)
14. Lugo, J.Z.; Deitch, J.S.; Yu, A.; Jang, J.H.; Patel, R.; Slova, D.; Lantis, J.; Leitman, I.M. Demographic and laboratory data may predict positive temporal artery biopsy. *J. Surg. Res.* **2011**, *170*, 332–335. [\[CrossRef\]](#)
15. Samson, M.; Corbera-Bellalta, M.; Audia, S.; Planas-Rigol, E.; Martin, L.; Cid, M.C.; Bonnotte, B. Recent advances in our understanding of giant cell arteritis pathogenesis. *Autoimmun. Rev.* **2017**, *16*, 833–844. [\[CrossRef\]](#)
16. Bignon, J.D.; Barrier, J.; Souillou, J.P.; Martin, P.; Grolleau, J.Y. HLA DR4 and giant cell arteritis. *Tissue Antigens* **1984**, *24*, 60–62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Cid, M.C.; Ercilla, G.; Vilaseca, J.; Sanmarti, R.; Villalta, J.; Ingelmo, M.; Urbano-Marquez, A. Polymyalgia rheumatica: A syndrome associated with HLA-DR4 antigen. *Arthritis Rheum.* **1988**, *31*, 678–682. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Combe, B.; Sany, J.; Le Quellec, A.; Clot, J.; Eliaou, J.F. Distribution of HLA-DRB1 alleles of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in a Mediterranean population. *J. Rheumatol.* **1998**, *25*, 94–98.
19. Dababneh, A.; Gonzalez-Gay, M.A.; Garcia-Porrua, C.; Hajeer, A.; Thomson, W.; Ollier, W. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica can be differentiated by distinct patterns of HLA class II association. *J. Rheumatol.* **1998**, *25*, 2140–2145.
20. Hansen, J.A.; Healey, L.A.; Wilske, K.R. Association between giant cell (temporal) arteritis and HLA-Cw3. *Hum. Immunol.* **1985**, *13*, 193–198. [\[CrossRef\]](#)
21. Jacobsen, S.; Baslund, B.; Madsen, H.O.; Tvede, N.; Svejgaard, A.; Garred, P. Mannose-binding lectin variant alleles and HLA-DR4 alleles are associated with giant cell arteritis. *J. Rheumatol.* **2002**, *29*, 2148–2153.
22. Martinez-Taboda, V.M.; Bartolome, M.J.; Lopez-Hoyos, M.; Blanco, R.; Mata, C.; Calvo, J.; Corrales, A.; Rodriguez-Valverde, V. HLA-DRB1 allele distribution in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: Influence on clinical subgroups and prognosis. *Semin. Arthritis Rheum.* **2004**, *34*, 454–464. [\[CrossRef\]](#)
23. Rauzy, O.; Fort, M.; Nourhashemi, F.; Alric, L.; Juchet, H.; Ecoiffier, M.; Abbal, M.; Adoue, D. Relation between HLA DRB1 alleles and corticosteroid resistance in giant cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **1998**, *57*, 380–382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Weyand, C.M.; Hicok, K.C.; Hunder, G.G.; Goronzy, J.J. The HLA-DRB1 locus as a genetic component in giant cell arteritis. Mapping of a disease-linked sequence motif to the antigen binding site of the HLA-DR molecule. *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*, 2355–2361. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Weyand, C.M.; Hunder, N.N.; Hicok, K.C.; Hunder, G.G.; Goronzy, J.J. HLA-DRB1 alleles in polymyalgia rheumatica, giant cell arteritis, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **1994**, *37*, 514–520. [\[CrossRef\]](#)
26. Mackie, S.L.; Taylor, J.C.; Haroon-Rashid, L.; Martin, S.; Dasgupta, B.; Gough, A.; Green, M.; Hordon, L.; Jarrett, S.; Pease, C.T.; et al. Association of HLA-DRB1 amino acid residues with giant cell arteritis: Genetic association study, meta-analysis and geo-epidemiological investigation. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Carmona, F.D.; Mackie, S.L.; Martin, J.E.; Taylor, J.C.; Vaglio, A.; Eyre, S.; Bossini-Castillo, L.; Castaneda, S.; Cid, M.C.; Hernandez-Rodriguez, J.; et al. A large-scale genetic analysis reveals a strong contribution of the HLA class II region to giant cell arteritis susceptibility. *Am. J. Hum. Genet.* **2015**, *96*, 565–580. [\[CrossRef\]](#)
28. Gonzalez-Gay, M.A. Genetic epidemiology. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Res.* **2001**, *3*, 154–157. [\[CrossRef\]](#)
29. Carmona, F.D.; Vaglio, A.; Mackie, S.L.; Hernandez-Rodriguez, J.; Monach, P.A.; Castaneda, S.; Solans, R.; Morado, I.C.; Narvaez, J.; Ramentol-Sintas, M.; et al. A Genome-wide Association Study Identifies Risk Alleles in Plasminogen and P4HA2 Associated with Giant Cell Arteritis. *Am. J. Hum. Genet.* **2017**, *100*, 64–74. [\[CrossRef\]](#)
30. Prieto-Pena, D.; Remuzgo-Martinez, S.; Ocejio-Vinyals, J.G.; Atienza-Mateo, B.; Genre, F.; Munoz-Jimenez, A.; Ortiz-Sanjuan, F.; Romero-Yuste, S.; Moriano, C.; Galindez-Agirregoikoa, E.; et al. The presence of both HLA-DRB1*04:01 and HLA-B*15:01 increases the susceptibility to cranial and extracranial giant cell arteritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2021**, *39* (Suppl. S129), 21–26. [\[CrossRef\]](#)
31. Gilkes, D.M.; Bajpai, S.; Chaturvedi, P.; Wirtz, D.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 10819–10829. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Renauer, P.; Coit, P.; Sawalha, A.H. Epigenetics and Vasculitis: A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2016**, *50*, 357–366. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Djuretic, I.M.; Levanon, D.; Negreanu, V.; Groner, Y.; Rao, A.; Ansel, K.M. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 145–153. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Coit, P.; De Lott, L.B.; Nan, B.; Elner, V.M.; Sawalha, A.H. DNA methylation analysis of the temporal artery microenvironment in giant cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2016**, *75*, 1196–1202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Deng, J.; Younge, B.R.; Olshen, R.A.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation* **2010**, *121*, 906–915. [\[CrossRef\]](#)

36. Samson, M.; Audia, S.; Fraszczak, J.; Trad, M.; Ornetti, P.; Lakomy, D.; Ciudad, M.; Leguy, V.; Berthier, S.; Vinit, J.; et al. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum.* **2012**, *64*, 3788–3798. [\[CrossRef\]](#)
37. Terrier, B.; Geri, G.; Chaara, W.; Allenbach, Y.; Rosenzweig, M.; Costedoat-Chalumeau, N.; Fouret, P.; Musset, L.; Benveniste, O.; Six, A.; et al. Interleukin-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* **2012**, *64*, 2001–2011. [\[CrossRef\]](#)
38. Mohan, S.V.; Liao, Y.J.; Kim, J.W.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Giant cell arteritis: Immune and vascular aging as disease risk factors. *Arthritis Res. Ther.* **2011**, *13*, 231. [\[CrossRef\]](#)
39. Li, Y.; Liu, Y.; Strickland, F.M.; Richardson, B. Age-dependent decreases in DNA methyltransferase levels and low transmethylation micronutrient levels synergize to promote overexpression of genes implicated in autoimmunity and acute coronary syndromes. *Exp. Gerontol.* **2010**, *45*, 312–322. [\[CrossRef\]](#)
40. Youinou, P.; Pers, J.O.; Gershwin, M.E.; Shoenfeld, Y. Geo-epidemiology and autoimmunity. *J. Autoimmun.* **2010**, *34*, J163–J167. [\[CrossRef\]](#)
41. Beck, D.B.; Ferrada, M.A.; Sikora, K.A.; Ombrello, A.K.; Collins, J.C.; Pei, W.; Balanda, N.; Ross, D.L.; Ospina Cardona, D.; Wu, Z.; et al. Somatic Mutations in UBA1 and Severe Adult-Onset Autoinflammatory Disease. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2628–2638. [\[CrossRef\]](#)
42. Czesnikiewicz-Guzik, M.; Lee, W.W.; Cui, D.; Hiruma, Y.; Lamar, D.L.; Yang, Z.Z.; Ouslander, J.G.; Weyand, C.M.; Goronzy, J.J. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin. Immunol.* **2008**, *127*, 107–118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Goronzy, J.J.; Fulbright, J.W.; Crowson, C.S.; Poland, G.A.; O’Fallon, W.M.; Weyand, C.M. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J. Virol.* **2001**, *75*, 12182–12187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Vallejo, A.N.; Weyand, C.M.; Goronzy, J.J. T-cell senescence: A culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 119–124. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Weyand, C.M.; Fujii, H.; Shao, L.; Goronzy, J.J. Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2009**, *5*, 583–588. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Wen, Z.; Shimojima, Y.; Shirai, T.; Li, Y.; Ju, J.; Yang, Z.; Tian, L.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. NADPH oxidase deficiency underlies dysfunction of aged CD8⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 1953–1967. [\[CrossRef\]](#)
47. Campisi, J.; d’Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 729–740. [\[CrossRef\]](#)
48. Grolleau-Julius, A.; Harning, E.K.; Abernathy, L.M.; Yung, R.L. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 6341–6349. [\[CrossRef\]](#)
49. Panda, A.; Qian, F.; Mohanty, S.; van Duin, D.; Newman, F.K.; Zhang, L.; Chen, S.; Towle, V.; Belshe, R.B.; Fikrig, E.; et al. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 2518–2527. [\[CrossRef\]](#)
50. Lee, H.Y.; Oh, B.H. Aging and arterial stiffness. *Circ. J.* **2010**, *74*, 2257–2262. [\[CrossRef\]](#)
51. Hiratzka, L.F.; Bakris, G.L.; Beckman, J.A.; Bersin, R.M.; Carr, V.F.; Casey, D.E.; Eagle, K.A.; Hermann, L.K.; Isselbacher, E.M.; Kazerooni, E.A.; et al. 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM Guidelines for the Diagnosis and Management of Patients With Thoracic Aortic Disease: Executive Summary. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **2010**, *76*, E43–E86. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Sawabe, M. Vascular aging: From molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr. Gerontol. Int.* **2010**, *10* (Suppl. S1), S213–S220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Wang, M.; Monticone, R.E.; Lakatta, E.G. Arterial aging: A journey into subclinical arterial disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2010**, *19*, 201–207. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Rhee, R.L.; Grayson, P.C.; Merkel, P.A.; Tomasson, G. Infections and the risk of incident giant cell arteritis: A population-based, case-control study. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *76*, 1031–1035. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Duhaut, P.; Bosshard, S.; Ducroix, J.P. Is giant cell arteritis an infectious disease? Biological and epidemiological evidence. *Presse Med.* **2004**, *33*, 1403–1408. [\[CrossRef\]](#)
56. Ly, K.H.; Regent, A.; Tamby, M.C.; Mouthon, L. Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun. Rev.* **2010**, *9*, 635–645. [\[CrossRef\]](#)
57. Gilden, D.; Nagel, M.A. Varicella zoster virus triggers the immunopathology of giant cell arteritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2016**, *28*, 376–382. [\[CrossRef\]](#)
58. Nagel, M.A.; Cohrs, R.J.; Mahalingam, R.; Wellish, M.C.; Forghani, B.; Schiller, A.; Safdieh, J.E.; Kamenkovich, E.; Ostrow, L.W.; Levy, M.; et al. The varicella zoster virus vasculopathies: Clinical, CSF, imaging, and virologic features. *Neurology* **2008**, *70*, 853–860. [\[CrossRef\]](#)
59. Gilden, D.H.; Kleinschmidt-DeMasters, B.K.; Wellish, M.; Hedley-Whyte, E.T.; Rentier, B.; Mahalingam, R. Varicella zoster virus, a cause of waxing and waning vasculitis: The New England Journal of Medicine case 5-1995 revisited. *Neurology* **1996**, *47*, 1441–1446. [\[CrossRef\]](#)
60. Evangelatos, G.; Grivas, A.; Pappa, M.; Kouna, K.; Iliopoulos, A.; Fragoulis, G.E. Cranial giant cell arteritis mimickers: A masquerade to unveil. *Autoimmun. Rev.* **2022**, *21*, 103083. [\[CrossRef\]](#)

61. Cooper, R.J.; D'Arcy, S.; Kirby, M.; Al-Buhtori, M.; Rahman, M.J.; Proctor, L.; Bonshek, R.E. Infection and temporal arteritis: A PCR-based study to detect pathogens in temporal artery biopsy specimens. *J. Med. Virol.* **2008**, *80*, 501–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Alvarez-Lafuente, R.; Fernandez-Gutierrez, B.; Jover, J.A.; Judez, E.; Loza, E.; Clemente, D.; Garcia-Asenjo, J.A.; Lamas, J.R. Human parvovirus B19, varicella zoster virus, and human herpes virus 6 in temporal artery biopsy specimens of patients with giant cell arteritis: Analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann. Rheum. Dis.* **2005**, *64*, 780–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Rodriguez-Pla, A.; Bosch-Gil, J.A.; Echevarria-Mayo, J.E.; Rossello-Urgell, J.; Solans-Laqué, R.; Huguet-Redecilla, P.; Stone, J.H.; Vilardell-Tarres, M. No detection of parvovirus B19 or herpesvirus DNA in giant cell arteritis. *J. Clin. Virol.* **2004**, *31*, 11–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kennedy, P.G.; Grinfeld, E.; Esiri, M.M. Absence of detection of varicella-zoster virus DNA in temporal artery biopsies obtained from patients with giant cell arteritis. *J. Neurol. Sci.* **2003**, *215*, 27–29. [[CrossRef](#)]
65. Helweg-Larsen, J.; Tarp, B.; Obel, N.; Baslund, B. No evidence of parvovirus B19, Chlamydia pneumoniae or human herpes virus infection in temporal artery biopsies in patients with giant cell arteritis. *Rheumatology* **2002**, *41*, 445–449. [[CrossRef](#)]
66. Nordborg, C.; Nordborg, E.; Petursdottir, V.; LaGuardia, J.; Mahalingam, R.; Wellish, M.; Gilden, D.H. Search for varicella zoster virus in giant cell arteritis. *Ann. Neurol.* **1998**, *44*, 413–414. [[CrossRef](#)]
67. Nagel, M.A.; White, T.; Khmeleva, N.; Rempel, A.; Boyer, P.J.; Bennett, J.L.; Haller, A.; Lear-Kaul, K.; Kandasmy, B.; Amato, M.; et al. Analysis of Varicella-Zoster Virus in Temporal Arteries Biopsy Positive and Negative for Giant Cell Arteritis. *JAMA Neurol.* **2015**, *72*, 1281–1287. [[CrossRef](#)]
68. Muratore, F.; Croci, S.; Tamagnini, I.; Zerbini, A.; Bellafiore, S.; Belloni, L.; Boiardi, L.; Bisagni, A.; Parmeggiani, M.; Cavazza, A.; et al. No Detection of Varicella-Zoster Virus in Temporal Arteries of Patients with Giant Cell Arteritis. *Arthritis Rheum.* **2016**, *68*, 2676–2677. [[CrossRef](#)]
69. Proven, A.; Gabriel, S.E.; Orces, C.; O'Fallon, W.M.; Hunder, G.G. Glucocorticoid therapy in giant cell arteritis: Duration and adverse outcomes. *Arthritis Rheum.* **2003**, *49*, 703–708. [[CrossRef](#)]
70. Hoffman, G.S.; Cid, M.C.; Hellmann, D.B.; Guillevin, L.; Stone, J.H.; Schousboe, J.; Cohen, P.; Calabrese, L.H.; Dickler, H.; Merkel, P.A.; et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of adjuvant methotrexate treatment for giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* **2002**, *46*, 1309–1318. [[CrossRef](#)]
71. Jover, J.A.; Hernandez-Garcia, C.; Morado, I.C.; Vargas, E.; Banares, A.; Fernandez-Gutierrez, B. Combined treatment of giant-cell arteritis with methotrexate and prednisone. a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **2001**, *134*, 106–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Spiera, R.F.; Mitnick, H.J.; Kupersmith, M.; Richmond, M.; Spiera, H.; Peterson, M.G.; Paget, S.A. A prospective, double-blind, randomized, placebo controlled trial of methotrexate in the treatment of giant cell arteritis (GCA). *Clin. Exp. Rheumatol.* **2001**, *19*, 495–501. [[PubMed](#)]
73. Hoffman, G.S.; Cid, M.C.; Rendt-Zagar, K.E.; Merkel, P.A.; Weyand, C.M.; Stone, J.H.; Salvarani, C.; Xu, W.; Visvanathan, S.; Rahman, M.U. Infliximab for maintenance of glucocorticosteroid-induced remission of giant cell arteritis: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **2007**, *146*, 621–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Martinez-Taboada, V.M.; Rodriguez-Valverde, V.; Carreno, L.; Lopez-Longo, J.; Figueroa, M.; Belzunegui, J.; Mola, E.M.; Bonilla, G. A double-blind placebo controlled trial of etanercept in patients with giant cell arteritis and corticosteroid side effects. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67*, 625–630. [[CrossRef](#)]
75. Seror, R.; Baron, G.; Hachulla, E.; Debandt, M.; Larroche, C.; Puechal, X.; Maurier, F.; de Wazieres, B.; Quemeneur, T.; Ravaud, P.; et al. Adalimumab for steroid sparing in patients with giant-cell arteritis: Results of a multicentre randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 2074–2081. [[CrossRef](#)]
76. Samson, M.; Devilliers, H.; Ly, K.H.; Maurier, F.; Biennu, B.; Terrier, B.; Charles, P.; Besancenot, J.F.; Fauchais, A.L.; Binquet, C.; et al. Tocilizumab As an Add-on Therapy to Glucocorticoids during the First 3 Months of Treatment of Giant Cell Arteritis: Results of a French Multicenter Prospective Open-Label Study. *Arthritis Rheum.* **2016**, *68*, 1294–1295.
77. Stone, J.H.; Tuckwell, K.; Dimonaco, S.; Klearman, M.; Aringer, M.; Blockmans, D.; Brouwer, E.; Cid, M.C.; Dasgupta, B.; Rech, J.; et al. Efficacy and Safety of Tocilizumab in Patients with Giant Cell Arteritis: Primary and Secondary Outcomes from a Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheum.* **2016**, *68*, 1203–1205.
78. Villiger, P.M.; Adler, S.; Kuchen, S.; Wermelinger, F.; Dan, D.; Fiege, V.; Butikofer, L.; Seitz, M.; Reichenbach, S. Tocilizumab for induction and maintenance of remission in giant cell arteritis: A phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2016**, *387*, 1921–1927. [[CrossRef](#)]
79. Ferfar, Y.; Mirault, T.; Desbois, A.C.; Comarmond, C.; Messas, E.; Savey, L.; Domont, F.; Cacoub, P.; Saadoun, D. Biotherapies in large vessel vasculitis. *Autoimmun. Rev.* **2016**, *15*, 544–551. [[CrossRef](#)]
80. Pisapia, D.J.; Lavi, E. VZV, temporal arteritis, and clinical practice: False positive immunohistochemical detection due to antibody cross-reactivity. *Exp. Mol. Pathol.* **2016**, *100*, 114–115. [[CrossRef](#)]
81. Hoffman, G.S.; Getz, T.M.; Padmanabhan, R.; Villa-Forte, A.; Clifford, A.H.; Funchain, P.; Sankunny, M.; Perry, J.D.; Blandford, A.; Kosmorsky, G.; et al. The Microbiome of Temporal Arteries. *Pathog. Immun.* **2019**, *4*, 21–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Getz, T.M.; Hoffman, G.S.; Padmanabhan, R.; Villa-Forte, A.; Roselli, E.E.; Blackstone, E.; Johnston, D.; Pettersson, G.; Soltesz, E.; Svensson, L.G.; et al. Microbiomes of Inflammatory Thoracic Aortic Aneurysms Due to Giant Cell Arteritis and Clinically Isolated Aortitis Differ From Those of Non-Inflammatory Aneurysms. *Pathog. Immun.* **2019**, *4*, 105–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

83. Krupa, W.M.; Dewan, M.; Jeon, M.S.; Kurtin, P.J.; Younge, B.R.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1815–1823. [\[CrossRef\]](#)
84. Ma-Krupa, W.; Jeon, M.S.; Spoerl, S.; Tedder, T.F.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 173–183. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Ma-Krupa, W.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Toll-like receptors in giant cell arteritis. *Clin. Immunol.* **2005**, *115*, 38–46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Pryshchep, O.; Ma-Krupa, W.; Younge, B.R.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. *Circulation* **2008**, *118*, 1276–1284. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Brack, A.; Geisler, A.; Martinez-Taboada, V.M.; Younge, B.R.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Giant cell vasculitis is a T cell-dependent disease. *Mol. Med.* **1997**, *3*, 530–543. [\[CrossRef\]](#)
88. Martinez-Taboada, V.; Hunder, N.N.; Hunder, G.G.; Weyand, C.M.; Goronzy, J.J. Recognition of tissue residing antigen by T cells in vasculitic lesions of giant cell arteritis. *J. Mol. Med.* **1996**, *74*, 695–703. [\[CrossRef\]](#)
89. Martinez-Taboada, V.M.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Clonally expanded CD8 T cells in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **1996**, *79*, 263–270. [\[CrossRef\]](#)
90. Weyand, C.M.; Schonberger, J.; Oppitz, U.; Hunder, N.N.; Hicok, K.C.; Goronzy, J.J. Distinct vascular lesions in giant cell arteritis share identical T cell clonotypes. *J. Exp. Med.* **1994**, *179*, 951–960. [\[CrossRef\]](#)
91. Annunziato, F.; Cosmi, L.; Liotta, F.; Maggi, E.; Romagnani, S. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol.* **2012**, *33*, 505–512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Noack, M.; Miossec, P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 668–677. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Samson, M.; Lakomy, D.; Audia, S.; Bonnotte, B. [T(H)17 lymphocytes: Induction, phenotype, functions, and implications in human disease and therapy]. *Rev. Med. Interne* **2011**, *32*, 292–301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Piggott, K.; Biousse, V.; Newman, N.J.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Vascular damage in giant cell arteritis. *Autoimmunity* **2009**, *42*, 596–604. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Gonzalez-Gay, M.A.; Garcia-Porrúa, C.; Llorca, J.; Hajeer, A.H.; Branas, F.; Dababneh, A.; Gonzalez-Louzao, C.; Rodriguez-Gil, E.; Rodriguez-Ledo, P.; Ollier, W.E. Visual manifestations of giant cell arteritis. Trends and clinical spectrum in 161 patients. *Medicine* **2000**, *79*, 283–292. [\[CrossRef\]](#)
96. Coll-Vinent, B.; Vilardell, C.; Font, C.; Oristrell, J.; Hernandez-Rodriguez, J.; Yague, J.; Urbano-Marquez, A.; Grau, J.M.; Cid, M.C. Circulating soluble adhesion molecules in patients with giant cell arteritis. Correlation between soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) concentrations and disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* **1999**, *58*, 189–192. [\[CrossRef\]](#)
97. Deng, J.; Ma-Krupa, W.; Gewirtz, A.T.; Younge, B.R.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Toll-like receptors 4 and 5 induce distinct types of vasculitis. *Circ. Res.* **2009**, *104*, 488–495. [\[CrossRef\]](#)
98. Corbera-Bellalta, M.; Garcia-Martinez, A.; Lozano, E.; Planas-Rigol, E.; Tavera-Bahillo, I.; Alba, M.A.; Prieto-Gonzalez, S.; Butjosa, M.; Espigol-Frigole, G.; Hernandez-Rodriguez, J.; et al. Changes in biomarkers after therapeutic intervention in temporal arteries cultured in Matrigel: A new model for preclinical studies in giant-cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 616–623. [\[CrossRef\]](#)
99. Mainbourg, S.; Addario, A.; Samson, M.; Puechal, X.; Francois, M.; Durupt, S.; Gueyffier, F.; Cucherat, M.; Durieu, I.; Reynaud, Q.; et al. Prevalence of Giant Cell Arteritis Relapse in Patients Treated With Glucocorticoids: A Meta-Analysis. *Arthritis Care Res.* **2020**, *72*, 838–849. [\[CrossRef\]](#)
100. Zhang, H.; Watanabe, R.; Berry, G.J.; Tian, L.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Inhibition of JAK-STAT Signaling Suppresses Pathogenic Immune Responses in Medium and Large Vessel Vasculitis. *Circulation* **2018**, *137*, 1934–1948. [\[CrossRef\]](#)
101. Samson, M.; Greigert, H.; Ciudad, M.; Gerard, C.; Ghesquiere, T.; Trad, M.; Corbera-Bellalta, M.; Genet, C.; Ouandji, S.; Cladiere, C.; et al. Improvement of Treg immune response after treatment with tocilizumab in giant cell arteritis. *Clin. Transl. Immunol.* **2021**, *10*, e1332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T.B.; Oukka, M.; Weiner, H.L.; Kuchroo, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **2006**, *441*, 235–238. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Crotty, S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* **2014**, *41*, 529–542. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Delaval, L.; Samson, M.; Schein, F.; Agard, C.; Trefond, L.; Deroux, A.; Dupuy, H.; Garrouste, C.; Godmer, P.; Landron, C.; et al. Temporal Arteritis Revealing Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitides: A Case-Control Study. *Arthritis Rheumatol.* **2020**, *73*, 286–294. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Cavazza, A.; Muratore, F.; Boiardi, L.; Restuccia, G.; Pipitone, N.; Pazzola, G.; Tagliavini, E.; Ragazzi, M.; Rossi, G.; Salvarani, C. Inflamed temporal artery: Histologic findings in 354 biopsies, with clinical correlations. *Am. J. Surg. Pathol.* **2014**, *38*, 1360–1370. [\[CrossRef\]](#)
106. Ciccica, F.; Rizzo, A.; Guggino, G.; Cavazza, A.; Alessandro, R.; Maugeri, R.; Cannizzaro, A.; Boiardi, L.; Iacopino, D.G.; Salvarani, C.; et al. Difference in the expression of IL-9 and IL-17 correlates with different histological pattern of vascular wall injury in giant cell arteritis. *Rheumatology* **2015**, *54*, 1596–1604. [\[CrossRef\]](#)
107. Corbera-Bellalta, M.; Planas-Rigol, E.; Lozano, E.; Terrades-Garcia, N.; Alba, M.A.; Prieto-Gonzalez, S.; Garcia-Martinez, A.; Alberó, R.; Enjuanes, A.; Espigol-Frigole, G.; et al. Blocking interferon gamma reduces expression of chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 and decreases macrophage infiltration in ex vivo cultured arteries from patients with giant cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *75*, 1177–1186. [\[CrossRef\]](#)

108. Samson, M.; Ly, K.H.; Tournier, B.; Janikashvili, N.; Trad, M.; Ciudad, M.; Gautheron, A.; Devilliers, H.; Quipourt, V.; Maurier, F.; et al. Involvement and prognosis value of CD8(+) T cells in giant cell arteritis. *J. Autoimmun.* **2016**, *72*, 73–83. [\[CrossRef\]](#)
109. Cid, M.C.; Hoffman, M.P.; Hernandez-Rodriguez, J.; Segarra, M.; Elkin, M.; Sanchez, M.; Vilardell, C.; Garcia-Martinez, A.; Pla-Campo, M.; Grau, J.M.; et al. Association between increased CCL2 (MCP-1) expression in lesions and persistence of disease activity in giant-cell arteritis. *Rheumatology* **2006**, *45*, 1356–1363. [\[CrossRef\]](#)
110. Van Sleen, Y.; Graver, J.C.; Abdulahad, W.H.; van der Geest, K.S.M.; Boots, A.M.H.; Sandovici, M.; Brouwer, E. Leukocyte Dynamics Reveal a Persistent Myeloid Dominance in Giant Cell Arteritis and Polymyalgia Rheumatica. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1981. [\[CrossRef\]](#)
111. Van Sleen, Y.; Wang, Q.; van der Geest, K.S.M.; Westra, J.; Abdulahad, W.H.; Heeringa, P.; Boots, A.M.H.; Brouwer, E. Involvement of Monocyte Subsets in the Immunopathology of Giant Cell Arteritis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6553. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
112. Esen, I.; Jiemy, W.F.; van Sleen, Y.; van der Geest, K.S.M.; Sandovici, M.; Heeringa, P.; Boots, A.M.H.; Brouwer, E. Functionally Heterogenous Macrophage Subsets in the Pathogenesis of Giant Cell Arteritis: Novel Targets for Disease Monitoring and Treatment. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 4958. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
113. Weyand, C.M.; Wagner, A.D.; Bjornsson, J.; Goronzy, J.J. Correlation of the topographical arrangement and the functional pattern of tissue-infiltrating macrophages in giant cell arteritis. *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 1642–1649. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Jiemy, W.F.; van Sleen, Y.; van der Geest, K.S.; Ten Berge, H.A.; Abdulahad, W.H.; Sandovici, M.; Boots, A.M.; Heeringa, P.; Brouwer, E. Distinct macrophage phenotypes skewed by local granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) are associated with tissue destruction and intimal hyperplasia in giant cell arteritis. *Clin. Transl. Immunol.* **2020**, *9*, e1164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
115. Van Sleen, Y.; Jiemy, W.F.; Pringle, S.; van der Geest, K.S.M.; Abdulahad, W.H.; Sandovici, M.; Brouwer, E.; Heeringa, P.; Boots, A.M.H. A Distinct Macrophage Subset Mediating Tissue Destruction and Neovascularization in Giant Cell Arteritis: Implication of the YKL-40/Interleukin-13 Receptor alpha2 Axis. *Arthritis Rheumatol.* **2021**, *73*, 2327–2337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Weyand, C.M.; Goronzy, J.J. Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Ann. Intern. Med.* **2003**, *139*, 505–515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
117. Nikkari, S.T.; Hoyhtya, M.; Isola, J.; Nikkari, T. Macrophages contain 92-kd gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated internal elastic lamina in temporal arteritis. *Am. J. Pathol.* **1996**, *149*, 1427–1433.
118. Segarra, M.; Garcia-Martinez, A.; Sanchez, M.; Hernandez-Rodriguez, J.; Lozano, E.; Grau, J.M.; Cid, M.C. Gelatinase expression and proteolytic activity in giant-cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2007**, *66*, 1429–1435. [\[CrossRef\]](#)
119. Watanabe, R.; Maeda, T.; Zhang, H.; Berry, G.J.; Zeisbrich, M.; Brockett, R.; Greenstein, A.E.; Tian, L.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. MMP (Matrix Metalloprotease)-9-Producing Monocytes Enable T Cells to Invade the Vessel Wall and Cause Vasculitis. *Circ. Res.* **2018**, *123*, 700–715. [\[CrossRef\]](#)
120. Kaiser, M.; Weyand, C.M.; Bjornsson, J.; Goronzy, J.J. Platelet-derived growth factor, intimal hyperplasia, and ischemic complications in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* **1998**, *41*, 623–633. [\[CrossRef\]](#)
121. Lozano, E.; Segarra, M.; Garcia-Martinez, A.; Hernandez-Rodriguez, J.; Cid, M.C. Imatinib mesylate inhibits in vitro and ex vivo biological responses related to vascular occlusion in giant cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67*, 1581–1588. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
122. Lozano, E.; Segarra, M.; Corbera-Bellalta, M.; Garcia-Martinez, A.; Espigol-Frigole, G.; Pla-Campo, A.; Hernandez-Rodriguez, J.; Cid, M.C. Increased expression of the endothelin system in arterial lesions from patients with giant-cell arteritis: Association between elevated plasma endothelin levels and the development of ischaemic events. *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69*, 434–442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
123. Ly, K.H.; Regent, A.; Molina, E.; Saada, S.; Sindou, P.; Le-Jeunne, C.; Brezin, A.; Witko-Sarsat, V.; Labrousse, F.; Robert, P.Y.; et al. Neurotrophins are expressed in giant cell arteritis lesions and may contribute to vascular remodeling. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, 487. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Galis, Z.S.; Khatri, J.J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* **2002**, *90*, 251–262. [\[CrossRef\]](#)
125. Regent, A.; Ly, K.H.; Groh, M.; Khifer, C.; Lofek, S.; Clary, G.; Chafey, P.; Baud, V.; Broussard, C.; Federici, C.; et al. Molecular analysis of vascular smooth muscle cells from patients with giant cell arteritis: Targeting endothelin-1 receptor to control proliferation. *Autoimmun. Rev.* **2017**, *16*, 398–406. [\[CrossRef\]](#)
126. Planas-Rigol, E.; Terrades-Garcia, N.; Corbera-Bellalta, M.; Lozano, E.; Antonio Alba, M.; Espigol-Frigolé, G.; Prieto-González, S.; Segarra, M.; Hernández-Rodríguez, J.; Preciado, S.; et al. Endothelin 1 Induces a Myofibroblastic Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells. A Mechanism Potentially Contributing to Vascular Remodeling and Intimal Hyperplasia in Giant Cell Arteritis. *Arthritis Rheum.* **2016**, *68*, 4063–4064.
127. Kaiser, M.; Younge, B.; Bjornsson, J.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 765–774. [\[CrossRef\]](#)
128. Ciccia, F.; Alessandro, R.; Rizzo, A.; Raimondo, S.; Giardina, A.; Raiata, F.; Boiardi, L.; Cavazza, A.; Guggino, G.; De Leo, G.; et al. IL-33 is overexpressed in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2013**, *72*, 258–264. [\[CrossRef\]](#)
129. Graver, J.C.; Boots, A.M.H.; Haacke, E.A.; Diepstra, A.; Brouwer, E.; Sandovici, M. Massive B-Cell Infiltration and Organization Into Artery Tertiary Lymphoid Organs in the Aorta of Large Vessel Giant Cell Arteritis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 83. [\[CrossRef\]](#)

130. Ciccia, F.; Rizzo, A.; Maugeri, R.; Alessandro, R.; Croci, S.; Guggino, G.; Cavazza, A.; Raimondo, S.; Cannizzaro, A.; Iacopino, D.G.; et al. Ectopic expression of CXCL13, BAFF, APRIL and LT-beta is associated with artery tertiary lymphoid organs in giant cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *76*, 235–243. [\[CrossRef\]](#)
131. Graver, J.C.; Abdulahad, W.; van der Geest, K.S.M.; Heeringa, P.; Boots, A.M.H.; Brouwer, E.; Sandovici, M. Association of the CXCL9-CXCR3 and CXCL13-CXCR5 axes with B-cell trafficking in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *J. Autoimmun.* **2021**, *123*, 102684. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
132. Desbois, A.C.; Regnier, P.; Quiniou, V.; Lejoncour, A.; Maciejewski-Duval, A.; Comarmond, C.; Vallet, H.; Rosenzweig, M.; Darrasse-Jeze, G.; Derian, N.; et al. Specific Follicular Helper T Cell Signature in Takayasu Arteritis. *Arthritis Rheumatol.* **2021**, *73*, 1233–1243. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
133. Hadjadj, J.; Canaud, G.; Mirault, T.; Samson, M.; Bruneval, P.; Régent, A.; Goulvestre, C.; Witko-Sarsat, V.; Costedoat-Chalumeau, N.; Guillemin, L.; et al. mTOR pathway is activated in endothelial cells from patients with Takayasu arteritis and is modulated by serum immunoglobulin G. *Rheumatology* **2018**, *57*, 1011–1020. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. McAlees, J.W.; Lajoie, S.; Dienger, K.; Sproles, A.A.; Richgels, P.K.; Yang, Y.; Khodoun, M.; Azuma, M.; Yagita, H.; Fulkerson, P.C.; et al. Differential control of CD4(+) T-cell subsets by the PD-1/PD-L1 axis in a mouse model of allergic asthma. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 1019–1029. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. Zhang, H.; Watanabe, R.; Berry, G.J.; Vaglio, A.; Liao, Y.J.; Warrington, K.J.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Immunoinhibitory checkpoint deficiency in medium and large vessel vasculitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E970–E979. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
136. Hid Cadena, R.; Reitsema, R.D.; Huitema, M.G.; van Sleen, Y.; van der Geest, K.S.M.; Heeringa, P.; Boots, A.M.H.; Abdulahad, W.H.; Brouwer, E. Decreased Expression of Negative Immune Checkpoint VISTA by CD4⁺ T Cells Facilitates T Helper 1, T Helper 17, and T Follicular Helper Lineage Differentiation in GCA. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1638. [\[CrossRef\]](#)
137. Langford, C.A.; Cuthbertson, D.; Ytterberg, S.R.; Khalidi, N.; Monach, P.A.; Currence, S.; Seo, P.; Moreland, L.W.; Weisman, M.; Koenig, C.L.; et al. A randomized, double-blind trial of abatacept (CTLA4-IG) for the treatment of giant cell arteritis. *Arthritis Rheumatol.* **2017**, *69*, 837–845. [\[CrossRef\]](#)
138. Goldstein, B.L.; Gedmintas, L.; Todd, D.J. Drug-associated polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis occurring in two patients after treatment with ipilimumab, an antagonist of ctla-4. *Arthritis Rheumatol.* **2014**, *66*, 768–769. [\[CrossRef\]](#)
139. Betrans, A.; Blockmans, D.E. Immune Checkpoint Inhibitor-Associated Polymyalgia Rheumatica/Giant Cell Arteritis Occurring in a Patient After Treatment With Nivolumab. *J. Clin. Rheumatol.* **2019**, *27*, S555–S556. [\[CrossRef\]](#)
140. Miyara, M.; Gorochov, G.; Ehrenstein, M.; Musset, L.; Sakaguchi, S.; Amoura, Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **2011**, *10*, 744–755. [\[CrossRef\]](#)
141. Miyara, M.; Yoshioka, Y.; Kitoh, A.; Shima, T.; Wing, K.; Niwa, A.; Parizot, C.; Taflin, C.; Heike, T.; Valeyre, D.; et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **2009**, *30*, 899–911. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
142. Miyabe, C.; Miyabe, Y.; Strle, K.; Kim, N.D.; Stone, J.H.; Luster, A.D.; Unizony, S. An expanded population of pathogenic regulatory T cells in giant cell arteritis is abrogated by IL-6 blockade therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **2016**, *76*, 898–905. [\[CrossRef\]](#)
143. Adriawan, I.R.; Atschekzei, F.; Dittrich-Breiholz, O.; Garantziotis, P.; Hirsch, S.; Risser, L.M.; Kosanke, M.; Schmidt, R.E.; Witte, T.; Sogkas, G. Novel aspects of regulatory T cell dysfunction as a therapeutic target in giant cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2022**, *81*, 124–131. [\[CrossRef\]](#)
144. Martin, E.; Treiner, E.; Duban, L.; Guerri, L.; Laude, H.; Toly, C.; Premel, V.; Devys, A.; Moura, I.C.; Tilloy, F.; et al. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
145. Ussher, J.E.; Willberg, C.B.; Klenerman, P. MAIT cells and viruses. *Immunol. Cell Biol.* **2018**, *96*, 630–641. [\[CrossRef\]](#)
146. Loh, L.; Wang, Z.; Sant, S.; Koutsakos, M.; Jegaskanda, S.; Corbett, A.J.; Liu, L.; Fairlie, D.P.; Crowe, J.; Rossjohn, J.; et al. Human mucosal-associated invariant T cells contribute to antiviral influenza immunity via IL-18-dependent activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 10133–10138. [\[CrossRef\]](#)
147. Van Wilgenburg, B.; Scherwitzl, I.; Hutchinson, E.C.; Leng, T.; Kurioka, A.; Kulicke, C.; de Lara, C.; Cole, S.; Vasanaawathana, S.; Limpitikul, W.; et al. MAIT cells are activated during human viral infections. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11653. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
148. Ussher, J.E.; Bilton, M.; Attwood, E.; Shadwell, J.; Richardson, R.; de Lara, C.; Mettke, E.; Kurioka, A.; Hansen, T.H.; Klenerman, P.; et al. CD161⁺ CD8⁺ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur. J. Immunol.* **2014**, *44*, 195–203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
149. Braudeau, C.; Amouriaux, K.; Néel, A.; Herbreteau, G.; Salabert, N.; Rimbart, M.; Martin, J.C.; Hémond, C.; Hamidou, M.; Josien, R. Persistent deficiency of circulating mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in ANCA-associated vasculitis. *J. Autoimmun.* **2016**, *70*, 73–79. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
150. Espigol-Frigole, G.; Planas-Rigol, E.; Lozano, E.; Corbera-Bellalta, M.; Terrades-Garcia, N.; Prieto-Gonzalez, S.; Garcia-Martinez, A.; Hernandez-Rodriguez, J.; Grau, J.M.; Cid, M.C. Expression and Function of IL12/23 Related Cytokine Subunits (p35, p40, and p19) in Giant-Cell Arteritis Lesions: Contribution of p40 to Th1- and Th17-Mediated Inflammatory Pathways. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 809. [\[CrossRef\]](#)
151. Bigas, A.; Espinosa, L. Hematopoietic stem cells: To be or Notch to be. *Blood* **2012**, *119*, 3226–3235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
152. Bray, S.J. Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 678–689. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

153. Boucher, J.; Gridley, T.; Liaw, L. Molecular pathways of notch signaling in vascular smooth muscle cells. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
154. Koyanagi, A.; Sekine, C.; Yagita, H. Expression of Notch receptors and ligands on immature and mature T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *418*, 799–805. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
155. Wen, Z.; Shen, Y.; Berry, G.; Shahram, F.; Li, Y.; Watanabe, R.; Liao, Y.J.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. The microvascular niche instructs T cells in large vessel vasculitis via the VEGF-Jagged1-Notch pathway. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaal3322. [\[CrossRef\]](#)
156. Piggott, K.; Deng, J.; Warrington, K.; Younge, B.; Kubo, J.T.; Desai, M.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Blocking the NOTCH pathway inhibits vascular inflammation in large-vessel vasculitis. *Circulation* **2011**, *123*, 309–318. [\[CrossRef\]](#)
157. Jin, K.; Wen, Z.; Wu, B.; Zhang, H.; Qiu, J.; Wang, Y.; Warrington, K.J.; Berry, G.J.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. NOTCH-induced rerouting of endosomal trafficking disables regulatory T cells in vasculitis. *J. Clin. Investig.* **2021**, *131*, e136042. [\[CrossRef\]](#)
158. Hamilton, J.A. GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2055. [\[CrossRef\]](#)
159. Shi, Y.; Liu, C.H.; Roberts, A.I.; Das, J.; Xu, G.; Ren, G.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Yuan, Z.R.; Tan, H.S.; et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: What we do and don't know. *Cell Res.* **2006**, *16*, 126–133. [\[CrossRef\]](#)
160. Corbera-Bellalta, M.; Alba-Rovira, R.; Muralidharan, S.; Espigol-Frigole, G.; Rios-Garces, R.; Marco-Hernandez, J.; Denuc, A.; Kamberovic, F.; Perez-Galan, P.; Joseph, A.; et al. Blocking GM-CSF receptor alpha with mavrilimumab reduces infiltrating cells, pro-inflammatory markers and neoangiogenesis in ex vivo cultured arteries from patients with giant cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2022**, *81*, 524–536. [\[CrossRef\]](#)
161. Zheng, Q.; Li, X.; Cheng, X.; Cui, T.; Zhuo, Y.; Ma, W.; Zhao, X.; Zhao, P.; Liu, X.; Feng, W. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases tumor growth and angiogenesis directly by promoting endothelial cell function and indirectly by enhancing the mobilization and recruitment of proangiogenic granulocytes. *Tumour Biol.* **2017**, *39*, 1010428317692232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
162. Cid, M.C.; Unizony, S.H.; Blockmans, D.; Brouwer, E.; Dagna, L.; Dasgupta, B.; Hellmich, B.; Molloy, E.; Salvarani, C.; Trapnell, B.C.; et al. Efficacy and safety of mavrilimumab in giant cell arteritis: A phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* **2022**, *81*, 653–661. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
163. Calabrese, L.H.; Rose-John, S. IL-6 biology: Implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2014**, *10*, 720–727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
164. Stone, J.H.; Tuckwell, K.; Dimonaco, S.; Kleerman, M.; Aringer, M.; Blockmans, D.; Brouwer, E.; Cid, M.C.; Dasgupta, B.; Rech, J.; et al. Trial of Tocilizumab in Giant-Cell Arteritis. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 317–328. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
165. Espigol-Frigole, G.; Planas-Rigol, E.; Ohnuki, H.; Salvucci, O.; Kwak, H.; Ravichandran, S.; Luke, B.; Cid, M.C.; Tosato, G. Identification of IL-23p19 as an endothelial proinflammatory peptide that promotes gp130-STAT3 signaling. *Sci. Signal.* **2016**, *9*, ra28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
166. O'Neill, L.; McCormick, J.; Gao, W.; Veale, D.J.; McCarthy, G.M.; Murphy, C.C.; Fearon, U.; Molloy, E.S. Interleukin-6 does not upregulate pro-inflammatory cytokine expression in an ex vivo model of giant cell arteritis. *Rheumatol. Adv. Pract.* **2019**, *3*, rkz011. [\[CrossRef\]](#)
167. Venhoff, N.; Schmidt, W.A.; Lamprecht, P.; Tony, H.P.; App, C.; Sieder, C.; Legeler, C.; Jentzsch, C.; Thiel, J. Efficacy and safety of secukinumab in patients with giant cell arteritis: Study protocol for a randomized, parallel group, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *Trials* **2021**, *22*, 543. [\[CrossRef\]](#)
168. Koster, M.J.; Crowson, C.S.; Giblon, R.E.; Jaquith, J.M.; Duarte-Garcia, A.; Matteson, E.L.; Weyand, C.M.; Warrington, K.J. Baricitinib for relapsing giant cell arteritis: A prospective open-label 52-week pilot study. *Ann. Rheum. Dis.* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
169. Samson, M.; Bonnotte, B. Ustekinumab for the Treatment of Giant Cell Arteritis: Comment on the Article by Matza et al. *Arthritis Care Res.* **2021**, *73*, 1058–1059. [\[CrossRef\]](#)
170. Matza, M.A.; Fernandes, A.D.; Stone, J.H.; Unizony, S.H. Ustekinumab for the Treatment of Giant Cell Arteritis. *Arthritis Care Res.* **2021**, *73*, 893–897. [\[CrossRef\]](#)
171. Conway, R.; O'Neill, L.; Gallagher, P.; McCarthy, G.M.; Murphy, C.C.; Veale, D.J.; Fearon, U.; Molloy, E.S. Ustekinumab for refractory giant cell arteritis: A prospective 52-week trial. *Semin. Arthritis Rheum.* **2018**, *48*, 523–528. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
172. Regent, A.; Mouthon, L. Treatment of Giant Cell Arteritis (GCA). *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 1799. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

3/ Manifestations cliniques et signes paracliniques

L'ACG est définie par un ensemble de symptômes plus ou moins spécifiques. En l'absence de traitement, les symptômes peuvent conduire à des séquelles fonctionnelles. Les signes généraux, comprenant asthénie, fièvre, amaigrissement et anorexie sont fréquemment observés au diagnostic (160,201). Ces signes sont le reflet de l'intense réaction inflammatoire systémique qui est quasi constante dans cette maladie. En parallèle, le remodelage vasculaire est à l'origine des manifestations ischémiques de la maladie : céphalées, hyperesthésie du cuir chevelu, claudication de la mâchoire, nécrose du scalp ou de la langue, complications visuelles et manifestations neurologiques centrales (160,201).

Dans 30 à 50% des cas, les patients présentent également une pseudopolyarthrite rhizomélique (PPR) associée (201). La PPR est un rhumatisme inflammatoire chronique dont la physiopathologie est proche de celle de l'ACG. Elle est caractérisée par une raideur articulaire et péri-articulaire au niveau des ceintures scapulaire et pelvienne (160).

Sur le plan biologique, il n'existe pas de marqueur diagnostique spécifique de l'ACG. Les patients ont presque toujours un syndrome inflammatoire (95%). Dans une série de 240 patients atteints d'ACG, la vitesse de sédimentation (VS) était en moyenne à 93 ± 23 mm/h et la protéine C-réactive (CRP) à 94 ± 63 mg/L (202). Une anémie (hémoglobine <12 g/dL) est observée chez 54,6% des patients et une thrombocytose dans 48,8% des cas, toutes deux d'origine inflammatoire.

4/ Diagnostic

Historiquement, ce sont les critères de classification établis par l'*American College of Rheumatology* (ACR) en 1990, qui sont utilisés comme référence pour l'inclusion des patients dans les études (203). Cette classification comporte cinq items, dont au moins trois sont nécessaires pour pouvoir classer le patient comme ayant une ACG. Ces items sont les suivants :

- Age du patient devant être de 50 ans ou plus
- Céphalées d'apparition récente
- Anomalie de l'artère temporale à la palpation
- Elévation de la VS > 50 mm à la première heure
- BAT positive

Cependant, ces critères ne sont pas parfaits car ils ne comprennent pas les manifestations ophtalmologiques de l'ACG. De plus, ils ne prennent pas en compte les ACG extra-céphaliques dans lesquelles l'atteinte prédomine au niveau de l'aorte et des troncs supra-aortique et moins des artères

temporales. Ainsi, on considère aujourd'hui qu'un patient présente une ACG s'il est âgé de plus de 50 ans, présente au moins un signe d'ACG ou de PPR avec un syndrome inflammatoire, et une preuve de vascularite (204).

Chez les patients atteints d'ACG, l'artère temporale est très fréquemment atteinte. Elle peut apparaître nettement plus saillante qu'à la normale. A la palpation, l'artère peut être plus dure et sensible. Il est également fréquent que le pouls temporal soit diminué, voire aboli.

Facilement accessible, la méthode de référence pour prouver l'existence d'une vascularite dans l'ACG repose sur la BAT (205). Ce geste chirurgical est réalisé sous anesthésie locale. Le prélèvement artériel est analysé et met typiquement en évidence une panartérite granulomateuse caractérisée par un infiltrat inflammatoire constitué de LT et de macrophages avec parfois la présence de cellules géantes multinucléées. Une destruction de la limitante élastique interne et une hyperplasie intimale sont également caractéristiques du diagnostic. Cependant, la sensibilité de la BAT varie entre 50 et 70% car l'atteinte de l'artère est segmentaire et focale et car certains patients atteints d'ACG n'ont pas d'atteinte de l'artère temporale (160,201).

L'imagerie vasculaire représente donc une aide précieuse pour confirmer le diagnostic d'ACG (206,207). L'échographie-doppler, l'angioscanner de l'aorte, l'angio-imagerie par résonance magnétique (IRM) et le tomographie par émission de positons (TEP) - Scanner sont autant de techniques utilisés pour identifier une anomalie au niveau de la paroi vasculaire. Bien qu'il subsiste des interrogations quant au type d'imagerie à utiliser et la pertinence des informations délivrées sur l'activité de la maladie et les dommages engendrés par celle-ci, l'*European Alliance of Associations for Rheumatology* (EULAR) recommande l'utilisation de l'imagerie pour le diagnostic de l'ACG dans un contexte de forte suspicion clinique (206).

5/ Traitements

Il existe une grande variabilité inter-individuelle concernant l'évolution de la maladie et la réponse aux traitements.

La corticothérapie est le traitement de première ligne recommandé dans le traitement de l'ACG. La dose journalière recommandée est de 0,7 mg/kg de prednisone. L'EULAR recommande de réduire la dose de manière progressive et sur un an (208). Les corticoïdes sont responsables d'importants effets secondaires. En 2016, une analyse basée sur 2 497 patients atteints d'ACG a notamment montré que la corticothérapie était associée à un risque accru de cataracte, d'ostéoporose, de glaucome, d'infection et de diabète (209). Dans une étude sur 206 patients, publiée en 2021 par notre équipe, il a été montré que 64% des patients présentaient des effets indésirables liés au traitement (210). Par

ailleurs, il est décrit un phénomène de corticodépendance chez les patients traités. En effet, des rechutes surviennent chez 41% des patients pendant le sevrage des corticoïdes (210).

Dans l'objectif de diminuer l'exposition des patients à la corticothérapie, des stratégies d'épargne stéroïdienne ont été testées. Aujourd'hui, seul le MTX et le tocilizumab ont fait la preuve de leur efficacité et sont indiqués dans la prise en charge thérapeutique de l'ACG. Cependant, ces traitements ne permettent pas de se passer complètement des corticoïdes. De plus, même si l'inflammation vasculaire est plutôt bien contrôlée par les traitements actuels, ce n'est pas le cas pour le remodelage vasculaire, qui est à l'origine des signes ischémiques chez les patients.

Le MTX appartient à la classe des immunosuppresseurs. Il s'agit d'un antagoniste de l'acide folique qui joue un rôle d'inhibition de la prolifération cellulaire. Bien que ses effets soient controversés chez les patients atteints d'ACG, une méta analyse a montré sur 161 patients que l'utilisation de MTX diminuait le risque de survenue d'une 1^{ère} rechute de 3,6 fois et réduisait l'exposition aux corticoïdes en permettant une épargne en prednisone de 848 mg sur quarante-huit mois (211).

Le Tocilizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre les récepteurs solubles et membranaires de l'IL-6. Son intérêt thérapeutique a été démontré dans un essai clinique de phase II (212) puis de phase III (204). Dans cette dernière étude 251 patients ont été inclus et traités pendant un an avec du tocilizumab en sous-cutané (dose de 162 mg) et de la prednisone. Douze mois après la fin de l'étude, les patients du groupe tocilizumab étaient en rémission pour 56% d'entre eux (groupe injections hebdomadaires) ou 53% (groupe injections bihebdomadaires) contre 14% et 18% respectivement dans le groupe témoin. La dose cumulée de corticoïdes était deux fois plus faible chez les patients traités par tocilizumab par rapport aux témoins. Bien que ces résultats soient encourageants, la recherche a encore besoin de temps pour établir notamment le risque de rechute à long terme. Par ailleurs, le tocilizumab modifie la VS et le niveau de CRP chez les patients. Or ces éléments font aujourd'hui partie intégrante des critères définissant l'état de rémission ou de rechute des patients (207).

L'amélioration des connaissances sur la physiopathologie de l'ACG a permis d'envisager l'utilisation de nouveaux traitements. Ainsi, plusieurs études sont en cours et des résultats prometteurs apparaissent avec des traitements tels que l'abatacept (CTLA-4Ig) (213), le Mavrilimumab (cible la sous unité α du récepteur du GM-CSF) (214), le Secukinumab (anti-IL-17A) (215) et les inhibiteurs de Janus kinase (JAKi) (bloquent les voies de signalisation de plusieurs cytokines comprenant l'IL-6, l'IL-12 et l'IFN- γ) (216).

Partie II : La Sclérodermie Systémique

1/ Introduction et épidémiologie

La SSc est une maladie auto-immune complexe, qui provoque une fibrose progressive et chronique des tissus et des organes, entraînant des défaillances généralement irréversibles. Cette fibrose s'associe à des phénomènes d'inflammation et de remodelage vasculaire dans les tissus atteints. La SSc est une maladie rare dont le taux d'incidence est estimé à 1,4 personnes pour 100 000 habitants par an (217). En France, l'incidence par million d'habitants a été estimée à 158 cas en Seine St Denis (218) et à 132 cas en Lorraine (219). Très peu de cas pédiatriques ont été rapportés (220). Le pic d'incidence se situe entre 45 et 64 ans (221,222). Les femmes sont plus souvent touchées que les hommes (sexe ratio = 7 : 1). La cause de la SSc est mal identifiée mais semble être multifactorielle.

A) Le rôle de la génétique

La prévalence varie selon des facteurs ethniques, ce qui suggère le rôle de facteur de risque génétiques. Dans une méta analyse parue en 2021, la prévalence était la plus faible en Asie tandis qu'elle était la plus haute en Amérique du Nord (217). En Europe, il existe un gradient nord-sud avec une prévalence plus élevée dans les pays du sud. Ceci reflète probablement le rôle d'allèles de susceptibilité dans l'apparition de la SSc. En effet, une étude a montré que les allèles *HLA-DRB1*01*, *HLA-DRB1*11*, *HLA-A*30* et *HLA-A*32* prédisposaient les patients au développement d'une SSc (223). Plusieurs polymorphismes associés à la SSc ont également été décrits dont certains sont spécifiques de la population étudiée et varient selon l'atteinte des patients (224).

En dehors de ces allèles de susceptibilité, on observe une surexpression de gènes liés à l'immunité (225). De nombreux loci non HLA ont été impliqués dans l'étiologie de la SSc, comme c'est le cas pour la tyrosine kinase lymphoïde B (BLK) (226), CD247 (227), STAT4 (228), la tyrosine kinase c-SRC (CSK) (229), la *protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22* (PTPN22) (230) et le quatrième membre de la superfamille du facteur de nécrose tumorale (TNFSF4) (231), tous codants pour des facteurs impliqués dans l'immunité adaptative. Des gènes codants pour des facteurs de l'apoptose ou de l'autophagie tels que la protéine d'autophagie 5 (ATG5) (232) et la *desoxyribonucléase 1-like 3* (DNASE1L3) (232), ont également été impliqués. De plus, la SSc est une maladie dans laquelle une « signature interféron de type I » a été identifiée. En ce sens, le polymorphisme rs2004640 du gène IRF5, qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la signalisation de l'IFN de type I, était associé au diagnostic de SSc dans une cohorte de 1641 patients européens (233).

B) Les facteurs environnementaux

Outre le terrain génétique, des facteurs environnementaux jouent certainement un rôle dans le déclenchement de la maladie. Les expositions professionnelles à la poussière de silice, au chlorure de vinyle et aux solvants organiques ont fait l'objet d'études et les conclusions montrent qu'ils jouent certainement un rôle dans la genèse de la SSc (234). Des lésions d'origine mécanique ou thermique, un déséquilibre des hormones stéroïdiennes et le stress ont également été mis en cause (235). La question d'un rôle des implants mammaires en silicone dans le développement de la SSc s'est également posée. Une étude a décrit 101 femmes portant des implants mammaires en silicone et 242 femmes témoins et a montré une association entre le port de ces implants et l'existence d'une SSc (236).

Parmi les facteurs environnementaux, un rôle des agents infectieux, tel que le CMV (237,238), *Toxoplasma gondii* (238), et les Herpès virus (le virus d'Epstein-Barr notamment) (238,239), a été supposé car les patients sclérodermiques ont davantage d'Ac dirigés contre ces agents infectieux par rapport à des individus sains.

Le rôle de l'environnement dans le développement de la SSc est illustré par des données plus récentes s'étant intéressées aux variations épigénétiques au cours de la SSc. Des niveaux de méthylation de l'ADN différents ont été identifiés en comparaison avec des témoins sains. Les LT CD4 des patients présentaient globalement une réduction de la méthylation de l'ADN, avec une diminution des protéines DNMT1 et *methyl-CpG-binding domain protein* (MBD) 3 et 4 (240). En revanche, *FOXP3* était hyperméthylé dans les LT CD4 et cela corrélait négativement avec son expression. La quantité de Treg était significativement diminuée chez les patients atteints de SSc (241).

L'expression des microARN (miR) est également modifiée dans la SSc. Les miR sont des ARN non codants qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes. Les expressions de miR-155 (intervenant dans la synthèse de collagène) et miR-21 (inhibe l'expression de Smad7 ce qui augmente la synthèse de TGF- β) sont augmentées dans les fibroblastes, tandis que celles de miR-150 (diminue l'expression de Smad3) et miR-7 (diminue le collagène) sont diminuées (242). De même, l'expression de miR-29a est diminuée dans le sérum et les fibroblastes dermiques des patients atteints de sclérodermie. Or, dans un contexte physiologique, ce miR est impliqué dans la diminution de la fibrose. L'inhibition de miR-29a-3p (forme mature de miR-29a) a totalement aboli l'efficacité thérapeutique des VE issues des CSM dans un modèle de fibrose *in vivo* (243). L'équipe de Rozier *et al.* a identifié les gènes *Dnmt3a*, *PDGFRBB*, *Bcl2*, *Bcl-xl* comme cibles de miR-29a-3p, dont la régulation était associée à l'amélioration de la fibrose cutanée.

D'autres miR ont également été identifiés et pourraient être impliqués dans la maladie, en particulier dans le processus de fibrose. Une liste des principaux miR est reprise dans le tableau suivant (tableau 1) (224,244,245).

microARN (miR)	Localisation	Expression modifiée dans la SSc	Fonctions
miR-21	Peau, fibroblastes, sang	+	Stimule la prolifération des fibroblastes, favorise la synthèse de TGF- β , action anti-apoptotique
miR-33a-3p	Fibroblastes	+	Cible antagoniste voie Wnt
miR-92a	Sérum et fibroblastes	+	Cible MMP-1
miR-155	Fibroblastes	+	Stimule la production de collagènes et module la fibrose dermique et pulmonaire
miR-182	Fibroblastes	+	Favorise la fibrogénèse cutanée et pulmonaire
miR-202-3p	Peau et fibroblastes	+	Cible MMP-1
miR-7	Peau et fibroblastes	-	Diminue la fibrose en diminuant la production de collagène
miR-let-7a	Peau, fibroblastes et sérum	-	Diminue la fibrose en diminuant la production de collagène
miR-16-5p	Fibroblastes et sérum	-	Cible Notch2
miR-29a	Peau et sérum	-	Diminue la fibrose en diminuant la production de collagène, favorise l'apoptose
miR-29b	Peau et fibroblastes	-	Inhibe la fibrose
miR-30b	Peau et fibroblastes	-	Inhibe PDGFR- β
miR-125a	Fibroblastes	-	Régule la prolifération et l'apoptose des cellules immunitaires et régule également la fibrogenèse
miR-129-5p	Fibroblastes	-	Diminue la fibrose en diminuant la production de collagène
miR-135b	Fibroblastes, serum et monocytes	-	Cible STAT6
miR-150	Sérum et fibroblastes	-	Diminue l'expression du collagène et des intégrines et diminue la phosphorylation de Smad3
miR-196a	Sérum et fibroblastes	-	Diminue la fibrose en diminuant la production de collagène

Tableau 1 : Principaux miR impliqués dans la fibrose, inspiré de Szabo *et al.* 2021

+ = expression augmentée ; - = expression diminuée

2/ Manifestations cliniques

A) Symptômes

Il existe une grande hétérogénéité inter-individuelle concernant l'atteinte clinique et l'évolution de la maladie. Historiquement, la classification de la SSc repose sur l'étendue de l'atteinte cutanée. Elle a été proposée en 1988 par Leroy *et al.* (246). Ainsi, deux formes principales ont été décrites : la forme cutanée limitée et la forme cutanée diffuse. Dans la forme limitée, l'atteinte cutanée est limitée aux doigts (sclérodactylie), aux membres en aval des coudes et des genoux et au visage, tandis que dans la forme diffuse, le tronc et les extrémités proximales des membres sont également affectés (figure 26).

De manière plus rare, certains patients présentent une forme de SSc sans atteinte cutanée ou « *sine scleroderma* ». Parfois, la SSc s'associe à d'autres maladies auto-immunes, en particulier à la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Sharp ou les myopathies inflammatoires. On parle alors de syndrome de chevauchement (247).

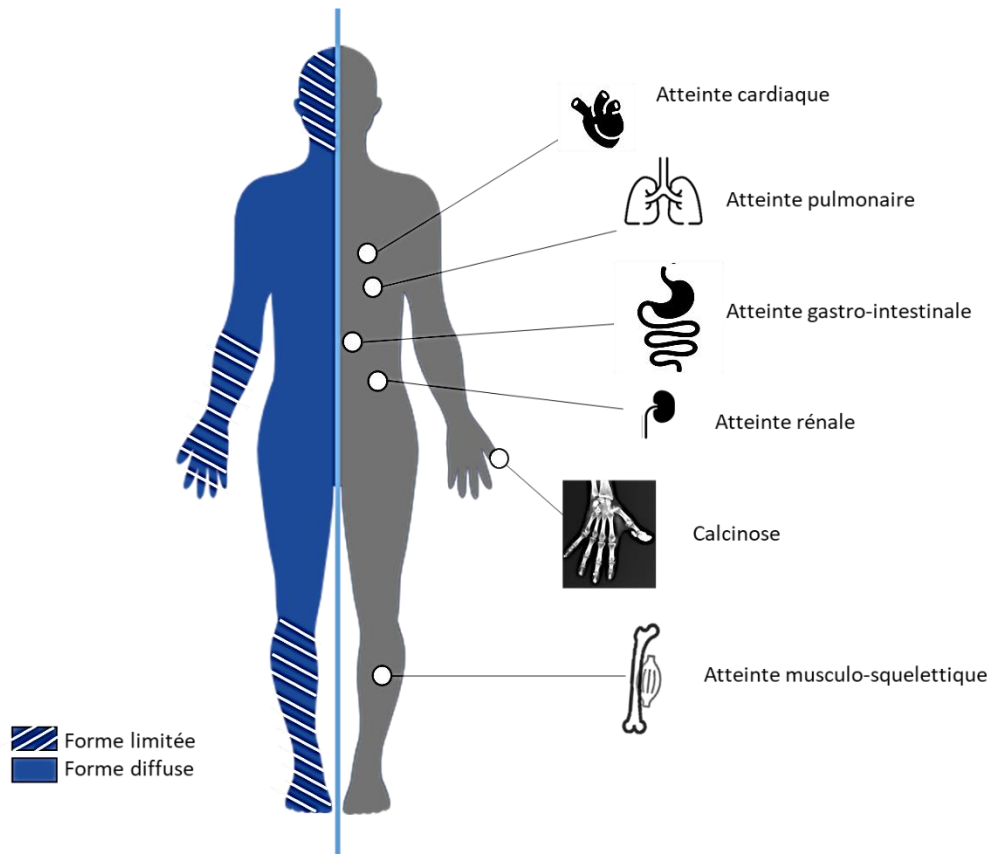


Figure 26 : Principales manifestations cliniques de la SSc, inspiré d'Allanore *et al.* 2015

Deux formes majoritaires existent dans la SSc : la forme cutanée limitée où la sclérose affecte les extrémités distales et le visage, et la forme diffuse où le tronc et les extrémités proximales sont également touchés. Les complications décrites dans cette maladie sont graves et invalidantes. Elles peuvent concerner l'ensemble des systèmes dont le cœur, les poumons, le tractus gastro-intestinal, les reins et les muscles/squelette.

Dans un premier temps, les symptômes associés à la SSc se concentrent principalement au niveau des extrémités. Ils résultent des modifications vasculaires et du remodelage du tissu conjonctif. Une inflammation touchant en particulier les doigts des patients est décrite (248). Elle est généralement suivie par un phénomène de fibrose caractérisée par un épaississement et une induration de la peau. L'apparition de lésions (ulcères), la présence de capillaires anormaux et de télangiectasies (dilatation des petits vaisseaux sanguins) sont également typiques chez ces patients. Par ailleurs, des symptômes moins spécifiques comme de la fatigue peuvent être ressentis.

Le phénomène de Raynaud concerne plus de 95% des patients SSc (249). Il est caractérisé par un changement de couleur des extrémités, en particulier des doigts, conséquence d'un dysfonctionnement vasomoteur à l'origine d'un arrêt temporaire de la circulation sanguine. Sa présence est quasi constante au cours de la SSc et peut précéder l'apparition de la maladie de plusieurs années (247). La réaction est déclenchée en réponse à une exposition au froid ou au vent (235,250). Dans la SSc, le syndrome de Raynaud est généralement sévère avec des crises survenant tout au long de l'année. De plus, les patients peuvent développer des complications ischémiques : ulcères digitaux, ischémie digitale persistante, voire une gangrène des membres (247).

B) Complications

La fibrose incontrôlée du tissu conjonctif et la vasculopathie peuvent entraîner l'apparition de complications qui font la gravité de la maladie : atteinte pulmonaire, manifestations musculo-squelettiques, insuffisance rénale, affections gastro-intestinales et atteinte cardiaque (figure 26). Toutes ces complications surviennent généralement dans les trois ans suivant le début de la maladie (251). La fréquence de leur apparition est difficile à établir en raison des variabilités inter-individuelles et de l'absence de critères diagnostiques consensuels.

Selon la forme de SSc, l'évolution de la maladie et les complications associées peuvent être différentes. Les patients présentant une forme limitée ont une évolution plus lente de la maladie et ont tendance à développer plus fréquemment une Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP), tandis que les patients atteints d'une forme diffuse ont une progression rapide de la maladie avec le développement de nombreuses complications, notamment la survenue d'une pneumopathie interstitielle (252).

a- L'atteinte pulmonaire

La fibrose pulmonaire ou pneumopathie interstitielle diffuse (PID) et l'HTAP sont responsables de plus de la moitié des décès chez les patients atteints de SSc (253).

La PID est retrouvée chez 80 à 90% des patients atteints de SSc mais seuls 30 à 40% des patients développent des signes cliniques (254). La PID associée à la SSc se révèle le plus souvent par une dyspnée, une toux sèche ou une fatigue découverte dans le cadre de la surveillance systématique des patients.

Dix à 20% des patients atteints d'une PID ont aussi une HTAP. La combinaison de ces deux atteintes assombrit le pronostic.

L'HTAP peut également exister sans PID du fait d'une vasculopathie des petites artères pulmonaires (HTAP pré-capillaire) ou plus rarement être la conséquence d'une atteinte myocardique (HTAP post-capillaire) (255).

b- L'atteinte musculo-squelettique

La SSc peut atteindre l'appareil locomoteur (256) :

- Atteinte musculaire à type de myopathie inflammatoire.
- Atteinte articulaire avec des arthralgies dans 30 à 70% des cas (et plus rarement arthrites). Dans 4,6 à 5,2% des cas, les patients présentent également une authentique polyarthrite rhumatoïde.
- Atteinte osseuse à type d'ostéolyse.
- Ostéoporose due aux traitements, à l'activité de la maladie ou à des carences nutritionnelles aggravées par la maladie.
- Atteinte tendineuse à type de frottements tendineux et de ténosynovites. D'après la base de données *European Scleroderma Trials and Research group* (EUSTAR), les fréquences de synovites et des frottements tendineux étaient respectivement de 16% et 11% chez les patients atteints de SSc (257).

Ces atteintes sont à l'origine de douleurs intenses et ont un impact sévère sur la mobilité et la qualité de vie des patients.

c- L'atteinte rénale

La crise rénale sclérodermique survient chez 5% des patients atteints de SSc (258). Il s'agit de la principale atteinte rénale décrite chez ces patients, en particulier ceux présentant une forme diffuse de la maladie. Cette manifestation survient au cours des premières années d'évolution. Il s'agit d'une manifestation très sévère de la maladie mais dont le pronostic a été transformé par l'utilisation systématique des inhibiteurs de l'enzyme de conversion dans cette situation. Cliniquement, la symptomatologie est caractérisée par une hypertension artérielle sévère et une insuffisance rénale aiguë. Certains facteurs, comme l'utilisation de fortes doses de corticoïdes, favorisent sa survenue (258).

d- L'atteinte gastro-intestinale

Les complications gastro-intestinales surviennent chez plus de 80% des patients (259). L'ensemble du tractus gastro-intestinal peut être affecté. L'atteinte la plus fréquente résulte d'un trouble de la motilité œsophagienne avec une altération des capacités du sphincter inférieur de l'œsophage, responsable de reflux gastro-œsophagiens. A long terme, les reflux peuvent être à l'origine d'œsophagite ou d'œsophage de Barrett et se compliquer de la survenue d'un adénocarcinome. La SSc peut aussi toucher le reste du tube digestif et en particulier l'intestin grêle, aboutissant à une malabsorption et/ou une pseudo-occlusion intestinale chronique, qui a généralement un retentissement majeur sur l'état général des patients. L'apparition d'ectasies vasculaires au niveau du

tube digestif, fréquemment au niveau de l'estomac (estomac pastèque), peut causer des hémorragies chroniques et/ou aiguës.

Globalement les manifestations gastro-intestinales dans la SSc sont toujours de mauvais pronostic.

e- L'atteinte cardiaque

Il existe deux types d'atteintes cardiaques dans la SSc (260) : l'atteinte primaire et secondaire. L'atteinte primaire est la conséquence directe de la maladie et peut se manifester par des atteintes myocardiques dans moins de 4% des cas ou péricardiques dans 5 à 16% des cas, une fibrose des structures responsable entre autres d'arythmies, et, moins fréquemment, par une maladie valvulaire. L'atteinte secondaire résulte de l'hypertension artérielle pulmonaire et de l'atteinte rénale. Dans une cohorte de 953 patients atteints d'une forme diffuse de SSc, l'atteinte cardiaque concernait 15% des patients. Cette atteinte est associée à un mauvais pronostic. En effet, on estime que 4,5% des patients décèdent en raison d'une complication cardiaque (222).

f- Autres

La calcinose est définie par un dépôt de calcium insoluble dans la peau et les tissus sous-cutanés. La prévalence chez les patients atteints de SSc varie de 18 à 49% selon la population étudiée et l'outil de diagnostic utilisé (261). Son apparition survient tardivement dans la maladie, généralement plus de dix ans après le diagnostic. La calcinose dans la SSc se présente sous la forme de nodules et touche le plus souvent les doigts. Les zones de points de pression telles que le coude ou le genou peuvent être affectées. Ces nodules sont souvent source de douleur et peuvent s'accompagner d'un gonflement des tissus, d'ulcères ou de déformations des membres entraînant des limitations fonctionnelles. Au niveau des calcinoses, la peau peut parfois se rompre. L'effraction cutanée devient alors un point d'entrée pour les agents infectieux.

Bien que l'incidence reste faible, une étude a également mis en évidence un risque augmenté de cancer chez les patients atteints de SSc, en particulier les cancers du poumon, du foie, de la vessie et d'hémopathies (262). Une étude rétrospective menée entre 2003 et 2018 parmi 55 patients atteints de SSc au CHU de Montpellier, a mis en évidence deux pics de survenue de cancers : les cancers d'apparition précoce associés à la SSc et ceux d'apparition tardive, conséquence d'une interaction entre plusieurs facteurs (inflammation répétée, immunosuppresseurs...) (263).

Enfin, la SSc altère considérablement la qualité de vie des patients (264), puisqu'elle engendre notamment de la fatigue, une anémie, des démangeaisons, des douleurs chroniques, une réduction de la mobilité et des symptômes gastro-intestinaux lourds. De nombreux patients développent des complications psychologiques, en particulier des symptômes de dépression (265).

La prise en charge des patients atteints de SSc et les connaissances des mécanismes physiopathologiques évoluent, ce qui a permis d'améliorer la survie des patients au cours des trois dernières décennies. Une étude menée aux Etats-Unis a montré que le taux de survie à dix ans était passé de 54% à 66% entre 1972 et 1996 (266). Cependant, le pourcentage de mortalité reste relativement élevé, en particulier à cause des complications pulmonaires.

3/ Marqueurs biologiques

Les auto-anticorps (auto-Ac) sont retrouvés chez 90% des patients atteints de SSc et sont majoritairement des anticorps anti-antigènes nucléaires (ANA), comprenant des anti-centromères (ACA) (plutôt associé à la forme limitée de la maladie), des anti-topoisomérase de type 1 (ATA) (plutôt associé à la forme diffuse de la maladie) et des anti-ARN polymérase III (RNAP, également associés à la forme diffuse de la maladie, au risque de crise rénale et de cancer associé) (221,248). De plus, les protéines ribonucléaires U3-RNP (ou fibrillarine), les antigènes nucléolaires Th/To et les enzymes polymérases ARN-polymérase I et II ont également été décrits dans la SSc. Les patients présentant un syndrome de chevauchement peuvent également partager des auto-Ac avec une autre maladie rhumatismale auto-immune, notamment les anti-PM/Scl, les anti-Ku, les anti-U1-RNP, les anti-SS-A/Ro60 et les anti-NOR 90 (267). Plus récemment, de nouveaux auto-Ac ont été retrouvés chez les patients atteints de SSc. Ces auto-Ac peuvent cibler directement des cellules comme les cellules endothéliales ou les fibroblastes, des récepteurs membranaires tels que le récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R), le récepteur de l'ET-1 de type A (ET-1RA) ou le récepteur du PDGF (PDGFR) et des composants de l'ECM parmi lesquels nous pouvons citer la fibrilline ou les MMP-1 (268).

Ces auto-Ac contribuent à la pérennité de la maladie. Bien que des corrélations aient été montrées entre les auto-Ac présents chez les patients, leur phénotype clinique et leur pronostic, ces associations ne sont ni systématiques, ni mutuellement exclusives. Par exemple, les auto-Ac dirigés contre les cellules endothéliales ont été détectés chez 44% à 84% des patients atteints de SSc (269–271) mais sont également détectables dans d'autres maladies auto-immunes et inflammatoires ainsi que chez des individus sains (272).

Enfin, la sensibilité et la spécificité des auto-Ac varient dans les cohortes, notamment en fonction de l'origine des patients et des méthodes de dosage employées (267,273).

Malgré cela, l'intérêt de l'étude des auto-Ac dans la SSc ne cesse de croître ces dernières années. En 2020, un nouveau schéma de classification SSc a été présenté par Nihtyanova *et al.* intégrant la diversité des auto-Ac et le degré d'atteinte cutanée. Sept groupes ont ainsi été proposés : ACA-forme limitée, ATA-forme limitée, ATA-forme diffuse, anti-RNAP, anti-U3-RNP, les autres anticorps de la forme limitée et les autres anticorps de la forme diffuse (274).

4/ Diagnostic

Un diagnostic très précoce et précis est primordial pour ralentir la progression de la maladie, limiter les atteintes d'organes nobles et ainsi le pronostic des patients. Les critères diagnostiques de la SSc ont été révisés en 2013 par l'EULAR et l'ACR (275) (tableau 2). Contrairement à la classification établie dans les années 80, cette version inclut les trois axes pathogéniques de la SSc en considérant les caractéristiques à la fois immunologiques, fibrotiques et vasculaires de la maladie. La sensibilité et la spécificité de ces critères sont de 91% et 92% respectivement. Le tableau des critères tient compte de l'atteinte cutanée proximale, de l'épaisseur de la peau des doigts, des lésions au niveau des extrémités, des capillaires anormaux, de l'observation de télangiectasies, de la présence d'une atteinte pulmonaire, de l'existence d'un phénomène de Raynaud et de la présence d'auto-Ac. Un score ≥ 9 points permet de retenir le diagnostic de SSc. Bien que les critères essaient d'intégrer un maximum d'items, certains patients atteints de SSc ne rentrent pas précisément dedans. D'autres peuvent également changer d'affectation au cours du temps (247).

Item	Sous-item	Score
Epaississement cutané des doigts	Sclérodactylie sur les deux mains, s'étendant au-delà des articulations métacarpo-phalangiennes	9
	Doigts gonflés	2
	Sclérodactylie ne dépassant pas les articulations métacarpo-phalangiennes	4
Lésions digitales distales	Ulcération	2
	Cicatrices déprimées	3
Télangiectasies		2
Anomalie à la capillaroscopie		2
Atteinte pulmonaire	Hypertension artérielle pulmonaire	2
	Maladie interstitielle pulmonaire	
Phénomène de Raynaud		3
Auto-anticorps spécifiques	Anti-centromères	3
	Anti-Scl70	
	Anti-ARN polymérase III	

Tableau 2 : Critères de classification de la SSc d'après l'EULAR et l'ACR (2013)

Pour les items comportant des sous-item avec des scores différents, seul le score le plus élevé est pris en compte. Si le score obtenu est supérieur ou égal à 9, alors le diagnostic de SSc est retenu.

Le diagnostic de SSc est envisagé face à des symptômes évocateurs et doit donner lieu à un bilan sanguin à la recherche d'auto-Ac. La capillaroscopie est également utile afin de mettre en évidence un nombre et/ou une morphologie anormale des capillaires au niveau de la base de l'ongle de la main (221). L'étendue de la fibrose cutanée est quantifiée à l'aide du score de Rodnan modifié (mRSS). Il s'agit de la méthode standard pour évaluer l'épaisseur de la peau donnant ainsi une indication sur l'avancée de la fibrose cutanée. Ce score attribue une note de 0 (normal) à 3 (sévère) au niveau de dix-sept zones corporelles. Le score varie de 0 à 51 points.

D'autres examens biologiques, fonctionnels et d'imagerie sont réalisés afin de mettre en évidence une complication viscérale. L'atteinte pulmonaire, responsable de plus de la moitié des décès chez les

patients sclérodermiques, est particulièrement surveillée. La PID est détectée par le scanner thoracique et les épreuves fonctionnelles respiratoires qui évaluent la capacité pulmonaire totale, la capacité vitale forcée (CVF) et la mesure de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) (254). La progression de la PID est définie par une étendue de la fibrose $\geq 20\%$ au scanner et/ou une diminution de la CVF $\geq 10\%$ ou une diminution de 5 à 9% associé à une diminution $\geq 15\%$ de la DLCO (254). Les patients SSc présentant des auto-Ac ATA ont un risque plus élevé de développer une fibrose pulmonaire sévère (276).

5/ Traitements

La médiane de survie des patients atteints de SSc est de onze ans (277). Bien que de nombreux traitements soient à l'étude, aucun d'entre eux ne parvient encore à stopper et à inverser l'évolution naturelle de la maladie, et en particulier le processus fibrotique. Cette réalité rend la prise en charge des patients particulièrement difficile.

Les patients reçoivent surtout des traitements symptomatiques. Ces traitements ont pour but de soulager les douleurs et/ou de pallier les défaillances d'organe afin de rétablir, dans la mesure du possible, une activité fonctionnelle et d'améliorer la qualité de vie des patients.

Certains traitements ont pour objectif de ralentir la progression de la maladie. Pour cela, jouer sur les différents aspects de la physiopathologie de la SSc est indispensable. C'est pourquoi les patients peuvent bénéficier de plusieurs traitements afin d'avoir un contrôle sur les trois axes de la maladie. Dans ce paragraphe, nous nous intéressons essentiellement aux traitements indiqués dans la fibrose et les atteintes pulmonaires de type PID.

La prescription d'immunosuppresseurs comme le MTX, le CYC, ou le MMF est justifiée dans la forme diffuse précoce, mais le bénéfice sur la fibrose cutanée reste modéré. Ces résultats ont été publiés en 2017, à la suite d'une étude prospective sur 326 patients suivis tous les trois mois pendant un an (278). Deux petits essais comparant le MTX à un placebo, ont confirmé une amélioration modérée de la fibrose cutanée chez les patients atteints de SSc diffuse précoce sans amélioration significative de la DLCO (279,280).

Chez des patients présentant une PID, une étude clinique a montré que le CYC permettait une amélioration modérée de la fonction pulmonaire et de l'épaississement de la peau après un an de traitement (281).

Enfin, dans une étude clinique sur deux ans, le MMF a permis d'améliorer le score mRSS des patients présentant une forme diffuse ainsi que leur capacité pulmonaire (282). Cette étude a également montré que le MMF avait une efficacité comparable au CYC mais avec un meilleur profil de tolérance.

Cet immunosuppresseur est actuellement le traitement de première ligne dans le traitement de la PID (221).

L'utilisation de corticoïdes à faible dose (15 mg/jour), en association avec des immunosuppresseurs ou des anti-fibrotiques, est fréquente. Néanmoins leur efficacité sur la sclérose cutanée reste débattue (221). Une étude clinique parue en 1994 montrait une amélioration de l'atteinte cutanée pour le groupe de patients traités par dexaméthasone en voie intraveineuse (283). Ce traitement a été répété tous les mois pendant six mois et concernait dix-sept patients sur trente-cinq. En 2020, une nouvelle étude de phase II a commencé afin d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de la prednisolone chez soixante-douze patients atteints de la forme diffuse de la SSc (284). Un des objectifs du projet portait sur l'évaluation du score de fibrose cutanée. Les résultats ne sont pas encore publiés. A notre connaissance, l'effet des corticoïdes sur la PID n'a pas été évalué dans un essai contrôlé randomisé.

Le nintédanib est un inhibiteur de tyrosine kinase dont le rôle anti-fibrosant a été démontré au cours de la fibrose pulmonaire idiopathique (étude INPULSIS (285)), la SSc (étude SENSIS (286)) et les PID évolutives au cours des pathologies auto-immunes (étude INBUILD (287)). Dans l'étude SENSIS portant sur 576 patients atteints de SSc le nintédanib réduisait le déclin de la CVF, y compris en association au MMF. Par contre, il n'a pas d'effet sur la sclérose cutanée. Malgré des effets indésirables fréquents (diarrhée), le nintédanib est le seul médicament ayant actuellement une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de la PID au cours de la SSc.

Le rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20, a fait l'objet de deux essais cliniques montrant un possible intérêt pour le traitement de la fibrose cutanée (288,289) et de la PID (288).

Le tocilizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-6, a été évalué dans un essai de phase III récemment (290), incluant 210 patients atteints de SSc. La fibrose cutanée, qui était le critère de jugement principal, n'a pas été améliorée mais, parmi les critères de jugement secondaires, l'étude a montré que le tocilizumab avait probablement un effet bénéfique pour le traitement de la PID précoce. Le traitement a été validé par la *Food and Drug Association* (FDA, USA) mais pas en France.

La greffe autologue de CSH est réservée aux cas les plus sévères de SSc, en particulier en cas de progression rapide. Il s'agit du seul traitement pour lequel une amélioration significative de la survie à long terme a été montrée (291).

La transplantation pulmonaire représente une option thérapeutique chez des patients non répondeurs aux traitements et sans autre complication viscérale sévère (292). Les patients éligibles à ce traitement sont rares.

L'enjeu actuel repose sur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de la SSc. De nombreuses molécules sont à l'étude avec des cibles extrêmement variées (293,294). Pour le traitement de la fibrose cutanée et pulmonaire, des immunomodulateurs comme l'abatacept sont en cours d'étude ainsi que des anti-fibrosants, tel que le riociguat par exemple. Toutes les voies d'activation des fibroblastes représentent autant de cibles potentielles pour l'inhibition de la fibrose. Dans un modèle de souris injectées avec de l'HOCl, une équipe a montré que le récepteur cannabinoïdes (CB) 2 représentait une cible potentielle pour le traitement de la SSc. En effet, en administrant un agoniste des récepteurs CB 1 et 2 (WIN-55,212) ou juste un agoniste du CB 2 (JWH-133), le développement de la fibrose, la prolifération des fibroblastes et le taux d'auto-Ac étaient diminués (295). Des expériences réalisées sur des souris déficientes en CB 2 ont confirmé l'influence de ce récepteur dans le développement de la fibrose systémique et de l'auto-immunité. Un essai de phase II sur 42 patients avec une forme diffuse a montré l'innocuité et l'efficacité du lenabasum, un agoniste de CB 2 (296). Une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et la fibrose a été observée dans les biopsies cutanées réalisées.

Des thérapies cellulaires ont également été envisagées pour le traitement de la fibrose dans la SSc. Dans un modèle de fibrose induite par l'injection d'HOCl chez la souris, l'injection de CSM avait permis de réduire l'inflammation et la fibrose dans le tissu cutané (297). Les propriétés anti-fibrotiques de ces cellules dépendaient de l'enzyme iNOS (298). De même, l'injection de VE issues de CSM murines ou dérivées du tissu adipeux humain, avait ralenti l'évolution de la maladie et amélioré la fibrose cutanée chez les souris traitées avec de l'HOCl (243).

6/ Physiopathologie

La SSc est une maladie complexe du tissu conjonctif impliquant trois axes physiopathologiques interconnectés : une hyperactivité et un remodelage vasculaire, un dysfonctionnement du système immunitaire et une suractivation des fibroblastes à l'origine du processus de fibrose de la peau et des organes (299) (figure 27).

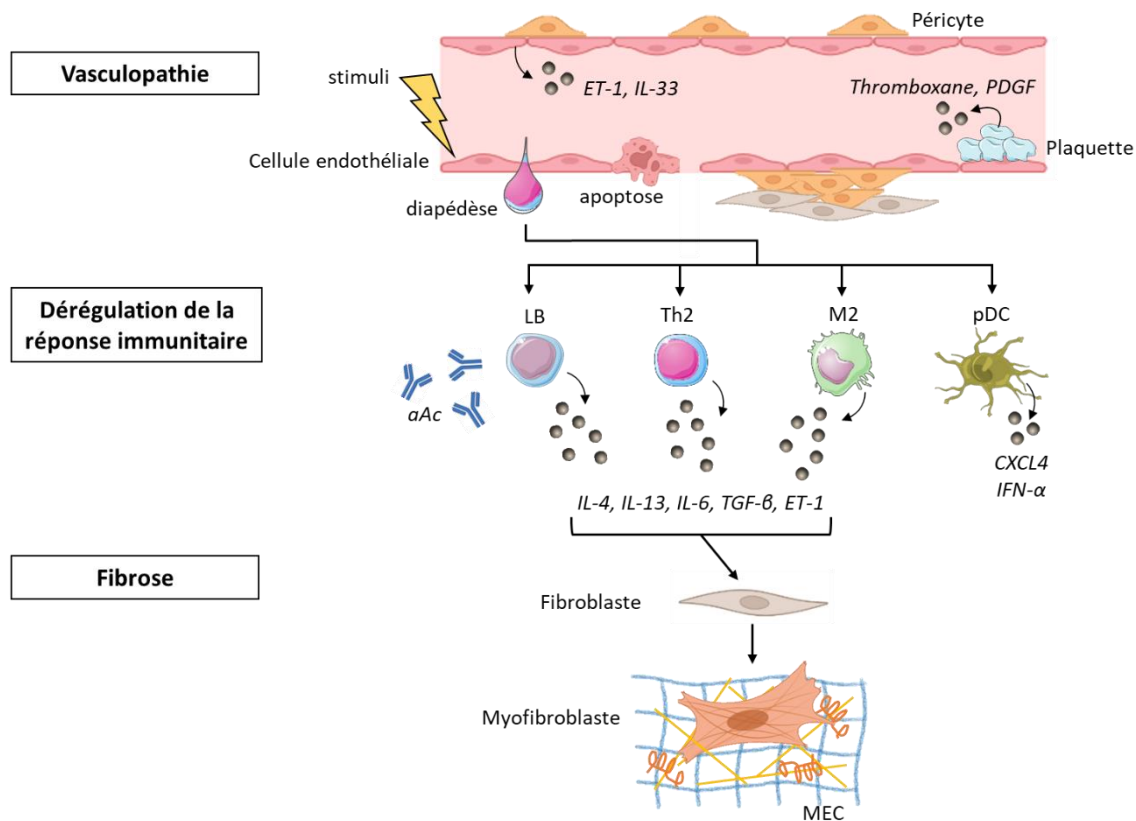


Figure 27 : Physiopathologie de la SSc reprenant les principaux acteurs cellulaires et moléculaires conduisant à la fibrose, inspiré de Volkmann et al. 2019

Phase 1 : Suractivation des cellules endothéliales, perte du contrôle de la vasomotricité, activation plaquettaire et augmentation de la perméabilité. L'atteinte vasculaire se traduit par des lésions microvasculaires, responsable d'hémorragies et d'œdème avec à terme une raréfaction des capillaires. Phase 2 : Recrutement et activation des cellules immunitaires. Signature IFN de type I et production de nombreux facteurs pro-fibrosants. Phase 3 : Suractivation des fibroblastes à l'origine de la fibrogénèse, caractérisée par une transition phénotypique vers des myofibroblastes et la synthèse de nombreux composants de la MEC, conduisant au remodelage des gros vaisseaux et à la fibrose tissulaire.

MEC = matrice extracellulaire ; ET-1 = endothéline-1 ; PDGF = facteur de croissance dérivé des plaquettes ; pDC = cellule dendritique plasmacytoïde ; IFN-α = interféron α ; Th2 = lymphocytes T auxiliaires 2 ; M2 = macrophage de type 2 ; TGF-β = facteur de croissance transformant β ; LB = lymphocyte B ; aAc = auto-anticorps

A) Vasculopathie

L'atteinte vasculaire et les manifestations cliniques qui y sont associées, au premier rang desquelles le syndrome de Raynaud, précèdent généralement l'apparition des autres signes de la SSc. Les cellules endothéliales jouent un rôle central dans la pathogenèse de la vasculopathie. L'endothélium est un tissu métaboliquement actif impliqué dans la régulation du flux sanguin, le transport de nutriments, la coagulation et la migration des cellules sanguines (300). Il existe dans la SSc un dysfonctionnement endothélial qui correspond à une altération du tonus vasculaire. Ce dysfonctionnement est causé par une perte du contrôle de la vasomotricité avec une production excessive de facteurs vasoconstricteurs par l'endothélium, comme par exemple l'ET-1 (301). A l'inverse, il y a une diminution des facteurs

vasodilatateurs, tels que le NO et la prostacycline. Les plaquettes contribuent également à augmenter la vasoconstriction des microvaisseaux *via* la libération de thromboxane. La perte de contrôle de la vasomotricité entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, induit une apoptose précoce des cellules endothéliales et engendre des lésions structurelles.

Les lésions vasculaires entraînent progressivement une perte importante de capillaires et de petits vaisseaux chez les patients atteints de SSc. En raison d'un défaut du processus d'angiogenèse, la perte des microvaisseaux n'est pas compensée. Paradoxalement, de forts taux d'agents impliqués dans l'angiogenèse ont été retrouvés chez les patients atteints de SSc. C'est le cas du VEGF et de ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 par exemple (302). Par ailleurs, une équipe a mis en évidence une surproduction du facteur anti-angiogénique VEGF165b par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages (303). La fixation de ce ligand sur le récepteur VEGF2 entraînait une inhibition des signaux de survie ainsi qu'une diminution de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales, deux processus indispensables à la formation de nouveaux vaisseaux. L'implication d'autres facteurs anti-angiogéniques tels que l'angiostatine, le CXCL4, la TSP-1 et l'IL-4 a été rapportée chez des patients atteints de SSc, expliquant en partie la raréfaction des microvaisseaux (224). De plus, la néo-angiogenèse est limitée en raison du nombre réduit de progéniteurs endothéliaux chez les patients sclérodermiques (304). Le défaut d'angiogenèse perturbe l'irrigation des tissus, entraînant une hypoxie tissulaire persistante.

Les dommages microvasculaires conduisent également à un remodelage des plus gros vaisseaux. Ce remodelage est caractérisé par un épaississement de la paroi vasculaire dû à l'excès de prolifération des péricytes et des CML vasculaires. L'hyperplasie intima et média augmente le risque d'obstruction de la lumière, favorisant ainsi l'hypoxie tissulaire et le stress oxydatif.

En plus de leur rôle dans les lésions vasculaires, les cellules endothéliales participent également à l'inflammation et à la fibrose *via* la sécrétion d'IL-33. Cette interleukine appartient à la famille des interleukines 1 et est également exprimée par les cellules épithéliales et les fibroblastes/myofibroblastes (305). L'IL-33 cible principalement les cellules de l'immunité innée. Elle favorise notamment la polarisation M2 et entraîne l'expansion des *Innate Lymphoid Cells* de type 2 (ILC2). Chez les patients atteints de SSc, une étude a montré que les taux sériques d'IL-33 et de sST2 (forme soluble du récepteur à IL-33 : ST2) étaient élevés et que ces taux étaient positivement corrélés avec l'étendue de la sclérose cutanée, la sévérité de la fibrose pulmonaire et l'atteinte vasculaire (306).

B) Dérégulation de la réponse immunitaire

Principalement sous l'effet du CCL2, les cellules endothéliales permettent le passage de cellules immunitaires (diapédèse) afin de réparer les dommages au niveau de l'endothélium vasculaire (307). Les patients atteints de SSc présentent une altération de la réponse immunitaire innée et adaptative.

α- TLR et signature IFN

Le système immunitaire inné, et en particulier les TLR, participe à la pathogenèse de la SSc. Les TLR sont capables de reconnaître les DAMP. Il existe une variété de ligands endogènes pouvant stimuler les TLR parmi lesquels HMGB1, Ca^{2+} , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les ROS, l'adénosine triphosphate (ATP), les protéines de choc thermique, les protéines S100 (alarmines) et des fragments de l'ECM. TLR4, TLR7, TLR8 et TLR9 sont les TLR les plus décrits dans la physiopathologie de la SSc (308). Ils participent d'une part à l'initiation et au maintien de l'inflammation, et d'autre part entretiennent le processus fibrotique.

Une surexpression de TLR4 a été décrite dans la peau et les poumons des patients SSc (309). TLR4 est surtout exprimé par les macrophages, les fibroblastes et les myofibroblastes. Il a été montré que l'expression de TLR4 était corrélée à la sévérité de la fibrose. *Ex vivo*, la stimulation du TLR4 sur les fibroblastes entraîne une augmentation de la synthèse du collagène de type I. De plus, l'activation de TLR4 améliore la sensibilité des fibroblastes à l'effet du TGF- β (309).

De même, il a été montré que le TLR9 était fortement exprimé dans les biopsies cutanées des patients SSc, en particulier au niveau des myofibroblastes (310). *Ex vivo*, l'activation du TLR9 dans des fibroblastes sains a conduit à une augmentation des gènes *COL1A1* et *COL1A2* ainsi qu'à une augmentation du collagène de type I.

TLR8 participe à la fibrose dans la SSc en augmentant TIMP-1 (311). TIMP-1 est un inhibiteur des MMP qui bloque la dégradation des protéines matricielles. Une autre équipe a montré que chez des souris porteuses du gène *TLR8* humain, la fibrose induite par bléomycine était exacerbée. A l'inverse, dans ce même modèle de fibrose, la déplétion en pDC a conduit à une réduction de la fibrose cutanée (312). Les auteurs ont montré que les pDC s'infiltraient au niveau de la peau des patients sclérodermiques et qu'elles étaient activées de manière chronique, entraînant une sécrétion importante d'IFN- α et de CXCL4. Ils ont mis en évidence que cette activité était liée à la présence aberrante de TLR8 dans les pDC de ces patients. En effet, CXCL4 induit la synthèse d'IFN- α *via* le TLR8 et le TLR9, contribuant à la signature IFN de type I (308,312). CXCL4 pourrait ainsi être un biomarqueur précoce de la SSc sévère.

b- Les acteurs de l'immunité innée

Monocytes/macrophages

Les monocytes CD16⁺ sont augmentés dans le sang des patients atteints de SSc et ce nombre est corrélé à la sévérité de la fibrose cutanée ainsi qu'à l'atteinte pulmonaire (313). Les monocytes/macrophages sont présents principalement dans le sang, la peau et les poumons des patients atteints de SSc (314). Un déséquilibre de la balance M1/M2 est observé en faveur d'une polarisation M2 (CD163⁺ CD204⁺). Ces macrophages produisent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10, et des médiateurs favorisant la cicatrisation des tissus tels que le TGF- β , le VEGF, CCL2 et l'ET-1 (315,316). Ces cellules induisent la synthèse de protéines de l'ECM et favorisent une polarisation de type Th2 (314). Les macrophages M2 ont donc un rôle central dans la fibrose des tissus dans la SSc.

Une étude récente a montré la présence d'une population de cellules circulantes présentant à la fois des marqueurs de surface de type monocytes/macrophages M1 (CD80, CD86, TLR4) et M2 (CD163, CD206) (317). Ce phénotype était associé aux complications de la SSc, en particulier à l'atteinte pulmonaire.

Mastocytes

Il a été montré que les mastocytes représentaient une source importante de TGF- β et contribuaient ainsi à la fibrose. En effet, une étude a mis en évidence la présence de TGF- β actif dans les vésicules mastocytaires (318). Le nombre élevé de mastocytes et de vésicules est positivement corrélé avec le caractère récent de la SSc. Contrairement aux sujets témoins, les mastocytes des patients SSc présentent une capacité de dégranulation plus élevée (318).

Cellules NK et polynucléaires neutrophiles

D'autres acteurs de l'immunité innée, tels que les cellules NK et les polynucléaires neutrophiles (PMN), ont des propriétés et des phénotypes modifiés au cours de la SSc.

Dans la forme diffuse de la maladie, la fréquence et le nombre absolu de cellules NK sont augmentés (319). Quelle que soit la forme de SSc, ces cellules présentent un profil phénotypique de cellules actives mais leur activité cytotoxique est réduite. De manière étonnante, la production d'IFN- γ est augmentée sans que les cellules des patients SSc aient été stimulées *ex vivo*, tandis que dans un contexte de stimulation la quantité d'IFN- γ reste faible. Chez les patients avec une forme diffuse, les cellules NK stimulées produisent également de plus grandes quantités d'IL-6.

De même, le profil des neutrophiles semble altéré dans la SSc. Une étude a montré que suite à la stimulation *ex vivo* de neutrophiles des patients atteints de SSc, une augmentation de la synthèse de ROS était observée (320). De plus, la production de *neutrophil extracellular traps* (NET) est également modifiée dans la SSc. En particulier, une augmentation de la production de NET par les PNN des

patients de SSc est observée par rapport à des témoins. De plus, les PMN des patients atteints d'une forme sévère de SSc produisent davantage de NET comparés aux autres patients sclérodermiques (321).

Innate lymphoid cells de type 2

Le nombre d'ILC2 (ICOS⁺, ST2⁺, CD3⁻, CD11b⁻ ou ST2⁺, IL-17RB⁺, KLRG1⁺, Lin⁻) circulant et cutané est augmenté chez les patients SSc par rapport à des sujets sains (322). Cela est d'autant plus vrai chez les patients présentant une forme diffuse de la maladie. Les ILC2 sécrètent principalement de l'IL-5 et de l'IL-13. Leur augmentation est positivement corrélée à l'étendue de la fibrose cutanée et à la présence d'une fibrose pulmonaire, suggérant un rôle pro-fibrotique des ILC2 dans la SSc.

c- Les acteurs de l'immunité adaptative

Lymphocytes T

Au sein des LT CD4⁺, les Th2 prédominent (323). Ils sont caractérisés par la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13, deux interleukines impliquées dans la fibrose (324). Les lymphocytes Th17 circulants sont également augmentés chez les patients atteints de SSc (325). Ils contribuent à l'inflammation en sécrétant de l'IL-17A, IL-21 et IL-22. Par ailleurs, il a été montré que la population de Treg était altérée. Les études portant sur leur fréquence et leur fonction donnent cependant des résultats contradictoires (224). Une étude a par exemple montré que les Treg étaient augmentés dans le sang des patients atteints de SSc (326), tandis qu'une autre a montré l'inverse (327). Au cours de la SSc, le phénotype des lymphocytes Treg évolue vers un phénotype de LT effecteurs, avec une perte d'expression du marqueur FOXP3 parfois et une différenciation en « *Th17-like* » (FOXP3⁺CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁺CCR10⁻) et en « *Th2-like* » (FOXP3⁺CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁻), favorisant ainsi l'inflammation et la fibrose tissulaire (328,329). Principalement étudiés en cancérologie (330), la question du rôle des lymphocytes Th9 dans les maladies rhumatologiques, comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus systémique et la SSc, a été soulevée. Le taux sérique d'IL-9 est augmenté chez ces patients par rapport à des sujets sains (331). D'autres travaux ont montré une surexpression d'IL-9 dans la peau et dans certains organes, comme les reins, des patients SSc. De plus, dans cette étude la quantité de lymphocytes Th9 était directement corrélée à l'atteinte cutanée (332).

Outre les LT CD4⁺, la quantité de LT CD8⁺ est également augmentée dans la circulation et la peau des patients à un stade précoce de la maladie. Leur présence est positivement corrélée avec l'étendue de la fibrose cutanée (333). Les LT CD8⁺ présentent une forte activité cytolytique *ex vivo* et sont impliqués dans la production d'IL-13 qui induit un phénotype pro-fibrotique des fibroblastes dermiques (333,334).

Lymphocytes B

Une étude parue en 2017 a montré que le nombre de LB activés était augmenté dans le sang des patients atteints de SSc (335). Les LB produisent de l'IL-6 et du TGF- β , ce qui permet *in vitro* d'induire la prolifération des fibroblastes et la production de collagène de type I. L'IL-6 est une cytokine produite par différents types cellulaires comprenant les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Ses effets sont pléiotropes, car en plus de son rôle dans l'induction de l'inflammation, des expériences ont confirmé un puissant effet pro-fibrotique (336). Une expression élevée d'IL-6 au début de la forme diffuse de la sclérodermie semble être associée à une atteinte cutanée plus grave et est de mauvais pronostic pour le patient (337,338).

La SSc est une maladie auto-immune associée à la présence d'auto-Ac qui ont une valeur diagnostique. Les LB activés peuvent se différencier en plasmocytes responsables de leur production. Une grande variété d'auto-Ac existe chez les patients. Leur rôle n'est pas évident. En effet, les auto-Ac les plus décrits ciblent des antigènes nucléaires (ANA) donc théoriquement inaccessibles, rendant la preuve de leur pathogénicité difficile à établir. Le manque de preuve tangible pour l'ensemble des auto-Ac, ne permet pas aujourd'hui d'envisager clairement leur responsabilité dans la maladie. Néanmoins des données récentes soutiennent leur implication dans la physiopathologie de la SSc. En effet, les auto-Ac sont des marqueurs biologiques pouvant précéder l'apparition des manifestations cliniques de plusieurs années et leur ciblage thérapeutique a montré des résultats intéressants. En particulier, les immunoglobulines intraveineuses sont connues pour moduler l'action des auto-Ac dans diverses maladies auto-immunes (339). Cette thérapie est bien tolérée et permettrait de réduire les doses de corticothérapie chez les patients présentant une SSc associée à une myopathie (340). De plus, elle pourrait améliorer l'atteinte cutanée, en particulier chez les patients réfractaires aux autres traitements standards (341).

Certains de ces auto-Ac sont dits fonctionnels en raison de leur capacité à interagir avec différents types cellulaires et à induire une réponse. Une équipe a par exemple montré que les auto-Ac anti-AT1R et anti-ET-1RA augmentent les niveaux d'expression des d'ARNm de l'IL-8 et des molécules d'adhésion VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales microvasculaires humaines (342). Cela entraînait un fort recrutement des PMN et la synthèse de ROS, suggérant un effet pro-inflammatoire des auto-Ac anti-AT1R et anti-ET-1RA. De même, le comportement des fibroblastes était modifié en présence de ces auto-Ac avec une augmentation de l'expression du collagène de type I. Dans un modèle de souris traitées par ces deux auto-Ac, les auteurs ont également montré une augmentation du nombre de PMN dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire et des anomalies structurelles au niveau des poumons. D'autres équipes ont montré que les anti-Scl70 (ou ATA) étaient libérés par les cellules endothéliales apoptotiques et se liaient à la membrane des fibroblastes *via* CCR7. Cette liaison

entraînait l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires et pro-fibrotiques et engendrait le recrutement de nouveaux auto-Ac ATA, jouant un rôle dans l'activation monocytaire et favorisant les mécanismes cytotoxiques à médiation cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) (268).

C) Fibrose

Les maladies de peau semblables à la SSc ont été évoquées dans des écrits datant d'avant Jésus-Christ (343). Cependant le premier cas de sclérose décrit remonte à 1753 par le Dr Carlo Curzio. Lors d'un traumatisme, un remodelage tissulaire s'opère afin de réparer la lésion induite. Il s'agit du processus de cicatrisation. La fibrose correspond à une cicatrisation pathologique. Elle intervient dans un contexte inflammatoire et/ou lésionnel chronique. Elle est caractérisée par un dépôt excessif de protéines matricielles, en particulier de collagène, d'élastine, de glycosaminoglycane, de ténascine, et de fibronectine, et une diminution des acteurs impliqués dans sa dégradation. Ce processus occasionne des lésions qui sont irréversibles. L'accumulation des protéines matricielles et les changements de type cellulaire perturbent l'architecture tissulaire normale au niveau de la peau et des organes internes, conduisant à la rigidification des structures et finalement à une défaillance d'organe (286).

a- Caractéristiques des fibroblastes dans la SSc

Les fibroblastes sont des cellules effectrices clés dans le remodelage tissulaire. Dans la SSc, ces cellules sont activées de manière incontrôlée et persistante conduisant à une forte sécrétion de protéines de matricielles (224). Une étude a identifié 48 ADN complémentaires qui étaient exprimés différemment entre les fibroblastes dermiques sains et ceux provenant de patients atteints de SSc (344). L'analyse a montré une surexpression de gènes dans les fibroblastes SSc parmi lesquels la *lysyl oxydase*, une enzyme impliquée dans la formation du collagène (345), la *fibronectine* et le *précurseur du collagène de type Xlla1*.

Au cours de la SSc, une transition phénotypique des fibroblastes s'opère vers un phénotype de myofibroblastes. Les myofibroblastes sont similaires aux fibroblastes mais avec des propriétés contractiles, comme les CML, et une activité sécrétoire intense. Ces cellules expriment fortement l'*alpha-smooth muscle actin* (α -SMA), contrairement aux fibroblastes (346). Les fibroblastes/myofibroblastes sont résistants à l'apoptose. Dans une étude, les auteurs ont montré que l'apoptose des fibroblastes était inhibée par la présence de surnageant de cellules endothéliales apoptotiques de patients atteints de SSc (347). Cette résistance à l'apoptose était dépendante de la voie PI3K. Dans une autre étude *in vitro*, les fibroblastes SSc étaient résistants à l'apoptose induite par la stimulation des récepteurs Fas, sans qu'une diminution de l'expression de ces récepteurs n'ait été

observée. Par ailleurs, dans cette étude la capacité proliférative des fibroblastes dermiques était augmentée dans la peau de patients atteints de SSc (348).

Les fibroblastes/myofibroblastes ralentissent également la dégradation de l'ECM en produisant très peu de MMP-1, une enzyme nécessaire à la dégradation des composés matriciels et en particulier du collagène, et en synthétisant à l'inverse, de grandes quantités d'inhibiteurs des MMP dont TIMP-1 (349).

Les myofibroblastes représentent une source importante de TGF- β , considéré comme l'acteur majeur dans le processus de fibrose. Il existe trois isoformes du TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, codées par trois gènes distincts (350). Outre les myofibroblastes, le TGF- β est synthétisé par de nombreux types cellulaires dont les plaquettes, les macrophages et les fibroblastes. Les analyses immunohistochimiques montrent que l'expression du TGF- β , et en particulier de TGF- β 1, est augmentée dans la peau des patients atteints de SSc (351). En plus de jouer un grand rôle dans l'homéostasie des tissus en contrôlant la prolifération, la différenciation, la mobilité, l'adhésion ou la mort cellulaire, le TGF- β agit également sur le remodelage des tissus en favorisant la synthèse des protéines matricielles (352,353).

Les fibroblastes des patients SSc produisent du *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) en excès. Une corrélation positive entre l'expression du gène *CTGF* et la sclérose cutanée a été établie (354). Dans un modèle *in vivo*, l'injection simultanée de facteur de croissance des fibroblastes (FGF)-2 et de CTGF augmentait la fibrose cutanée par rapport à une injection unique de FGF-2 (355). Dans une autre étude chez la souris, l'inhibition de ce facteur dans un modèle CTGF KO ou avec un anticorps anti-CTGF, atténuait la fibrose cutanée avec entre autres une diminution de l'expression de PDGFR β , du procollagène, et d' α -SMA au niveau du derme (356). Dans ce modèle, l'inhibition du CTGF avait en outre atténué les lésions vasculaires.

Les fibroblastes activés dans la SSc produisent également de l'ET-1. En effet, la quantité d'ET-1 était significativement plus élevée dans le surnageant de culture des fibroblastes de patients SSc que dans celui des fibroblastes sains (357). De plus, le traitement de fibroblastes dermiques sains avec de l'ET-1 entraînait la production de collagène de type I et III et inhibait la production de MMP-1 (358). L'inhibition de la voie de l'ET-1 par le blocage des récepteurs ETA et ETB (bosentan) inhibait la production de collagène, confirmant ainsi le rôle de l'ET-1 dans le processus de fibrose. Cette même étude a montré une altération de l'expression des récepteurs à l'ET-1 avec notamment une expression réduite des récepteurs ETA à la surface des fibroblastes sclérodermiques. Dans une autre étude, l'ET-1 favorisait *in vitro* l'expression du phénotype M2 chez les macrophages (359).

Le PDGF est impliqué dans la fibrogénèse et la dérégulation de la fonction vasculaire. Ce facteur est produit par les cellules endothéliales, les plaquettes, les macrophages et les fibroblastes. Le PDGF et ses récepteurs sont augmentés dans les lésions dermiques fibrotiques des patients atteints de SSc (360). Par ailleurs, des niveaux élevés de PDGF-A et de PDGF-B ont également été trouvés dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire chez les patients sclérodermiques (361). Dans la SSc, le PDGF pourrait contribuer à la prolifération, la migration et la transition des fibroblastes/myofibroblastes (362).

Enfin, les ROS contribuent à la fibrose. Il a été montré que les ROS étaient impliqués dans la prolifération des fibroblastes, dans leur conversion phénotypique et dans la synthèse des composés matriciels (363). Les sources de stress oxydatif dans la SSc sont nombreuses. La production de radicaux libres est principalement due aux lésions d'ischémie-reperfusion et à la génération de ROS par les fibroblastes et les monocytes (364). En effet, les fibroblastes cutanés des patients SSc libèrent plus de ROS (superoxyde (O_2^-) et H_2O_2) *ex vivo* que les fibroblastes normaux (363). Cette observation a été confirmée par une autre étude où les niveaux de ROS dans les biopsies de peau des patients atteints de SSc étaient significativement plus élevés que chez les témoins (365). De plus, dans cette étude, la quantité de ROS était positivement corrélée avec l'atteinte cutanée des patients. *In vivo*, le stress oxydatif induit par l'injection en sous-cutané de différents agents impliqués dans la génération de ROS ($HOCl$, H_2O_2 , O_2^- et $ONOO^-$), induisait une fibrose dermique chez la souris (366). De plus, certains de ces composés étaient capables d'induire une réponse systémique avec le développement d'une fibrose au niveau pulmonaire et la production d'auto-Ac retrouvés dans le sérum des souris.

b- Les différents acteurs cellulaires et moléculaires

Comme évoqué précédemment, le tissu fibrotique est caractérisé par la présence de myofibroblastes. Outre les fibroblastes, d'autres précurseurs cellulaires vont évoluer vers un phénotype myofibroblastique et ainsi participer à la formation d'un véritable réservoir. Les principales sources alternatives de myofibroblastes dans la SSc sont décrites ci-après (367) (figure 28).

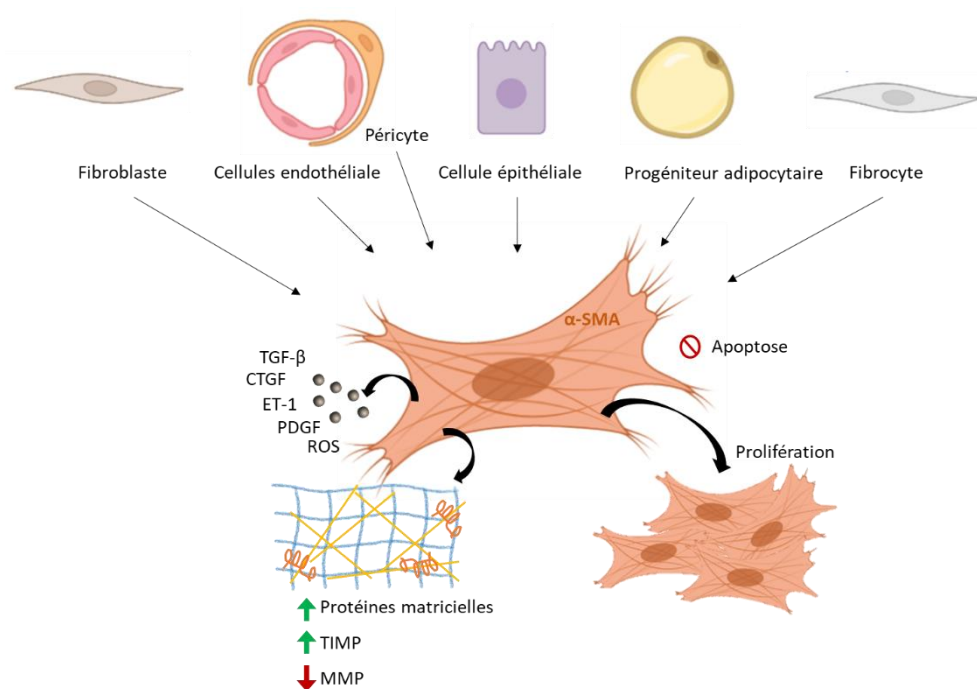


Figure 28 : Origine cellulaire et propriétés des myofibroblastes dans la SSc, inspiré de Van Caam *et al.* 2018

Les myofibroblastes dérivent d'une multitude de cellules dont les fibroblastes, cellules endothéliales, péricytes, cellules épithéliales, progéniteurs adipocytaires et fibrocytes. Elles sont caractérisées par l'expression d' α -smooth muscle actin (α -SMA) et sont résistantes à l'apoptose. De plus, elles ont une activité sécrétoire intense avec la production de protéines matricielles (collagène, fibronectine) et de facteurs pro-fibrotiques (TGF- β , CTGF, ET-1, PDGF et ROS), et participent au maintien de la fibrose en régulant la balance TIMP/MMP. Enfin, leur capacité proliférative est augmentée.

TGF- β = facteur de croissance transformant β ; CTGF = *connective tissue growth factor* ; ET-1 = endothéline-1 ; PDGF = facteur de croissance dérivé des plaquettes ; ROS = espèces réactives de l'oxygène ; TIMP = inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases ; MMP = métalloprotéases matricielles

Cellules endothéliales

Le processus de différenciation des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses/myofibroblastes (EndoMT) est le plus décrit. Parmi plusieurs travaux effectués sur cette thématique, l'équipe de Manetti *et al.* a notamment montré que le traitement de cellules endothéliales saines avec des sérums de patients atteints de SSc ou du TGF- β 1 entraînait une diminution des marqueurs endothéliaux, parallèlement à l'induction de marqueurs mésenchymateux (368). En effet, les cellules endothéliales perdent l'expression de CD31 et des VE-cadhérines au profit de nouveaux marqueurs, tels que α -SMA, collagène I et Twist 1, caractéristiques des cellules mésenchymateuses/myofibroblastes. Dans cette étude, les cellules adoptaient également une morphologie et un phénotype de myofibroblaste (α -SMA⁺, S100A4 et collagène de type I). En plus du TGF- β , d'autres acteurs moléculaires semblent impliqués dans cette reprogrammation cellulaire, comme les ROS (369) ou l'ET-1 (350).

Les progéniteurs endothéliaux participent également au processus EndoMT. Leur taux est diminué dans la circulation des patients SSc, tandis que le nombre de précurseurs mésenchymateux est augmenté (370). Dans une forme avancée de la maladie, la réquisition des cellules endothéliales et de ses précurseurs pour la formation du pool de myofibroblastes pourrait être en partie responsable de l'architecture anormale des micro-vaisseaux et de leur disparition (235).

Les voies de signalisation impliquées dans ce processus ne sont pas clairement identifiées. Le facteur de transcription *Friend leukemia integration 1* (Fli-1) est inhibé au niveau des fibroblastes dermiques des patients et pourrait représenter un facteur de prédisposition à la SSc (371). *In vivo*, la fibrose dermique induite par la bléomycine était plus sévère chez les souris Fli-1(+/-) que chez les souris de type sauvage, en raison d'un processus EndoMT plus important chez les souris mutées (372).

Cellules épithéliales

La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est un processus également impliqué dans la constitution du pool de myofibroblastes. En effet, une expression accrue des facteurs de transcription SNAI1 et TWIST, tous deux impliqués dans l'EMT, a été observée dans la peau de patients sclérodermiques (373). Une étude a montré *in vitro* que les kératinocytes épidermiques humains normaux pouvaient se différencier en cellules mésenchymateuses en présence de TGF- β dans leur environnement (374). Cette transition était caractérisée par une diminution de l'expression des protéines de jonction (E-cadhérine et Zo-1) au profit d'une augmentation de la production de protéines matricielles (fibronectine), la sécrétion de MMP et de l'expression de *COL1 α 1*. Dans cette étude, le blocage de la voie Smad a inhibé l'EMT et a également inversé l'EMT établie.

Péricytes

Les péricytes participent au développement de la fibrose dans la SSc. Une étude a montré par immunofluorescence que la peau issue de patients sclérodermiques présentait des péricytes microvasculaires avec des marqueurs de fibroblastes/myofibroblastes, exprimant la fibronectine (*fibronectin containing extra domain A* (Fn-EDA)) et CD90 (375). De plus, la capacité proliférative des péricytes était augmentée dans la peau des patients par rapport à la peau de témoins. Une autre étude a montré que les péricytes et les fibroblastes de la peau de patients sclérodermiques présentaient une expression accrue d'ADAM12, une désintégrine/métalloprotéase (376). *Ex vivo*, la stimulation de CSM et de fibroblastes avec du TGF- β induisait une augmentation de ce facteur. L'inhibition d'ADAM12 empêchait la différenciation myofibroblastique de ces cellules.

Fibrocytes

Les fibrocytes (CD45⁺ COL I⁺ CXCR4⁺) sont des cellules circulantes d'origine myéloïde possédant un grand pouvoir de différenciation. Ces cellules contribuent à la fibrogénèse dans la SSc. *Ex vivo*, les

fibrocytes des patients sclérodermiques montraient une expression plus élevée de gènes caractéristiques des myofibroblastes, incluant α -SMA, TGF- β et COL I (collagène I) (377). De plus, l'implication des fibrocytes dans la fibrose pulmonaire a été démontrée *in vivo* dans un modèle de souris traitées à la bléomycine (378).

Cellules progénitrices du tissu adipeux

Les myofibroblastes peuplant le derme fibrotique des patients peuvent aussi dériver de progéniteurs adipocytaires. *Ex vivo*, la stimulation d'adipocytes avec du TGF- β a induit une différenciation en myofibroblastes (379). Par ailleurs, dans un modèle de souris traitées à la bléomycine, les cellules progénitrices du tissu adipeux, normalement confinées au compartiment graisseux, étaient retrouvées dans le derme fibrotique avec une diminution des marqueurs adipocytaires et l'apparition de marqueurs myofibroblastiques (379).

c- Facteurs et voies de signalisation impliqués dans l'activation des fibroblastes

L'hyperactivation constante des fibroblastes est due à une diversité de stimuli d'origine exogène ou endogène, comme le TGF- β , le CTGF, l'ET-1, le PDGF et les ROS qui sont responsables de boucles d'activation autocrines. L'ensemble des stimuli mène à l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires complexes et interconnectées (figure 29).

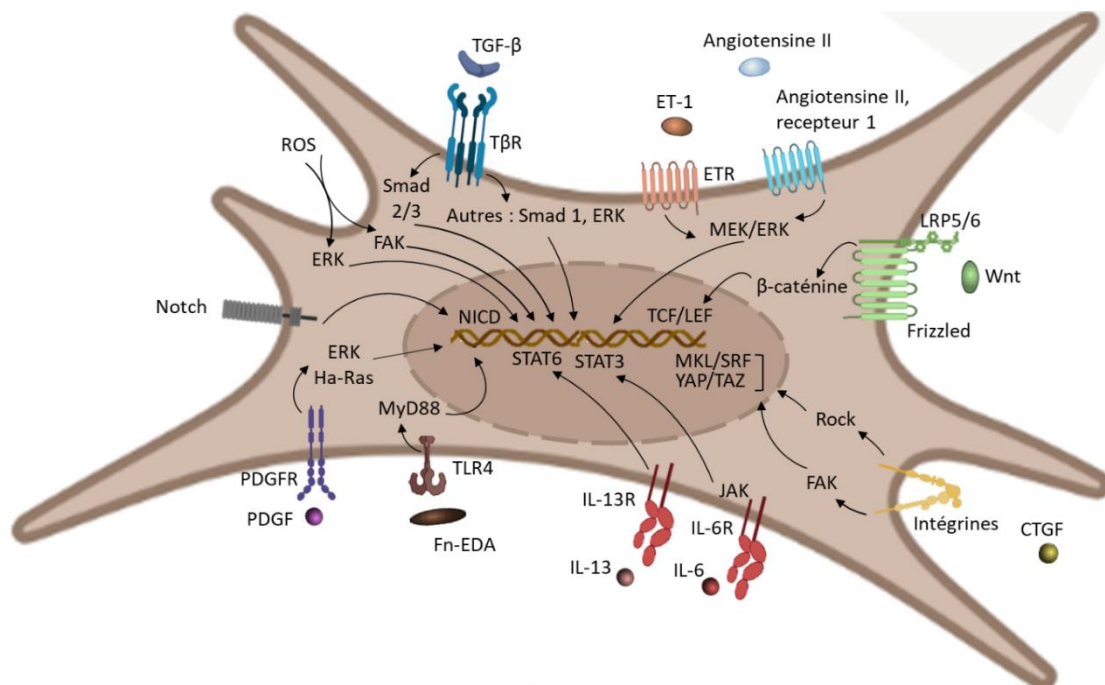


Figure 29 : Facteurs impliqués dans l'activation des fibroblastes sclérodermiques, inspiré d'Allanore *et al.* 2015. Le TGF- β , l'ET-1, l'angiotensine II, la voie Wnt, le CTGF, les intégrines, les interleukines (dont l'IL-13 et l'IL-6), le TLR4, le PDGF, la voie Notch et les ROS participent à l'activation constante des fibroblastes. L'ensemble des voies impliquées conduit à l'activation de gènes impliqués dans la transition phénotypique en myofibroblastes, stimule la production de protéines matricielles et de facteurs pro-fibrotiques et favorise la prolifération cellulaire.

TGF- β

Le TGF- β est synthétisé sous une forme inactive (précurseur latent), puis est converti dans sa forme biologiquement active après interaction avec les intégrines. Les récepteurs T β R du TGF- β forment un complexe associant T β RII et une des deux formes de T β RI (ALK5 ou ALK1) (380). Sur les fibroblastes de patients sclérodermiques, des études ont montré que les récepteurs T β R étaient augmentés et que cela était corrélé avec l'augmentation du taux de collagène produit par les fibroblastes, suggérant une boucle d'activation autocrine (381). La liaison du TGF- β avec T β RII-ALK5 active la voie Smad 2/3 (voie canonique), dont le rôle dans la fibrose est bien documenté (figure 30). Des voies de signalisation alternatives sont également décrites comme les voies *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK), Wnt/ β -caténine et Notch (voie non canonique) (380). Les voies de signalisation du TGF- β sont perturbées chez les patients SSc. En effet, une accumulation de Smad 3 phosphorylé est décrite. Indépendamment de cette voie, les voies Smad 1 (activée par T β RII-ALK1) et ERK 1/2 étaient également dérégulées dans les fibroblastes de patients atteints de SSc (382,383).

La liaison du TGF- β sur son récepteur active également la voie de signalisation JAK2/STAT3. Cette voie est impliquée dans l'inflammation mais participe aussi au maintien de la fibrose en contrôlant l'activité des fibroblastes. Dans des conditions physiologiques, ce sont les suppresseurs de signalisation des cytokines (SOCS), et en particulier SOCS3, qui régulent cette voie de signalisation. Dans la SSc, le TGF- β inhibe l'expression de SOCS3 *via* la voie Smad, entraînant une forte fibrose *in vitro* et *in vivo* (384). L'inhibition du TGF- β permettait de restaurer l'activité de SOCS3 et ainsi de diminuer la fibrose.

Le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR- γ) contribue également à l'activation incontrôlée des fibroblastes. Il s'agit d'un récepteur nucléaire initialement décrit pour son rôle dans la régulation de l'adipogénèse et du métabolisme énergétique. Plus récemment, ce facteur a été étudié pour son effet anti-inflammatoire et anti-fibrotique. *In vivo*, l'inhibition de PPAR- γ dans un modèle de fibrose induite par l'injection de bléomycine chez la souris, renforçait la fibrogénèse (385). Dans une autre étude, l'expression de PPAR- γ était diminuée dans les biopsies cutanées et pulmonaires des patients sclérodermiques (386). De plus, le traitement de fibroblastes sains avec du TGF- β entraînait *ex vivo* une diminution de PPAR- γ *via* la voie T β RII-ALK5-Smad 3. Ces résultats démontrent que l'expression et la fonction de PPAR- γ sont altérées dans la SSc, probablement à cause du TGF- β .

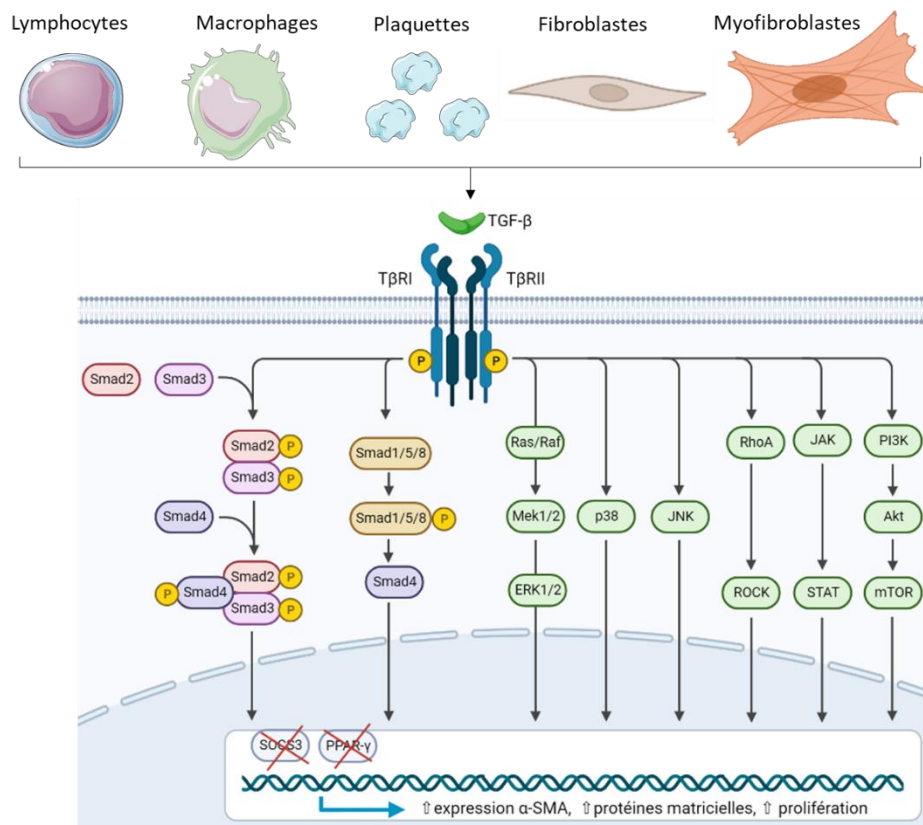


Figure 30 : Voie de signalisation du TGF-β

Le TGF-β est sécrété par de nombreux acteurs cellulaires. La liaison du TGF-β sur son récepteur active la voie Smad 2/3, qui est la plus décrite dans la fibrose. D'autres voies pourraient être impliquées dans la fibrose comme la voie Smad 1/5/8. La signalisation du TGF-β passe également par des voies indépendantes de Smad, comme la voie de MAPK, p38, JNK, Rock, JAK/STAT et PI3K/Akt.

Protéines WNT

Des anomalies dans la voie de signalisation Wnt/β-caténine ont été observées chez les patients SSc. L'activation de cette voie se produit lors de la liaison d'un ligand de la famille des glycoprotéines Wnt à son récepteur Frizzled (FZD) et co-récepteur LRP (387). Cette liaison entraîne une cascade d'événements moléculaires qui conduit à la stabilisation et à l'accumulation de la β-caténine dans le cytoplasme cellulaire. La β-caténine migre ensuite dans le noyau et interagit avec des facteurs de transcription de la famille LEF/TCF pour activer des gènes cibles. En l'absence de ligand Wnt, la β-caténine cytoplasmique est dégradée. Cette voie joue un rôle important dans le processus de fibrogénèse. *Ex vivo*, la stimulation de fibroblastes sains avec Wnt-3a a entraîné une réponse pro-fibrotique, médiée par la voie Smad. En effet, Wnt-3a, un ligand de la voie Wnt, a augmenté l'expression du TGF-β et la phosphorylation de Smad 2/3 (388).

La voie Wnt est hyperactivée dans la peau de patients sclérodermiques. Une analyse génomique a révélé une expression élevée du récepteur *FZD2* et du facteur de transcription *LEF1* ainsi qu'une

diminution de l'expression des antagonistes Wnt *DKK2* et *WIF1* (388). De plus, une forte concentration de β -caténine nucléaire a été détectée dans ces échantillons en immunohistochimie. Une autre étude a montré que l'expression des antagonistes Wnt *DKK1* et *SFRP1* était également diminuée dans les fibroblastes et les cellules mononucléées du sang de patients atteints de SSc (389). La réactivation de la transcription de ces facteurs a permis, *in vitro* et *in vivo*, de diminuer la fibrose *via* l'inhibition de la voie de signalisation Wnt.

Le TGF- β est capable d'agir sur la voie de signalisation Wnt. Dans une étude, la stimulation de fibroblastes avec du TGF- β a induit une accumulation nucléaire de β -caténine, une augmentation de l'activité de LEF/TCF et une diminution de l'expression de *DKK1* (390). Chez des souris dont les récepteurs T β RI étaient suractivés dans la peau, la surexpression de *DKK1* a permis de protéger les animaux de la fibrose (390). Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'interaction entre le TGF- β et la régulation de *DKK1* pour l'induction de la fibrose.

Voie Notch

La voie de signalisation Notch est suractivée dans la peau des patients atteints de SSc (391). De plus, la stimulation de fibroblastes dermiques sains avec Jag-1, un ligand du récepteur Notch, entraînait *ex vivo* une transition phénotypique des fibroblastes en myofibroblastes et une production excessive de collagène. A l'inverse, l'inhibition de la voie Notch dans les fibroblastes SSc causait une diminution de l'expression du collagène, ce qui souligne le rôle de cette voie de signalisation dans l'activation incontrôlée des fibroblastes. La même équipe a montré que *in vivo* l'inhibition de la signalisation Notch empêchait le développement de fibrose et pouvait également induire la régression d'une fibrose déjà établie (392).

CTGF

La signalisation du CTGF passe essentiellement par les intégrines (393). La surexpression du CTGF dans des fibroblastes normaux induit une boucle d'activation autocrine favorisant la synthèse des composés de l'ECM (394).

Il existe une relation étroite entre le CTGF et le TGF- β . En effet, le TGF- β stimule la production du CTGF dans les fibroblastes SSc et sains (394). Comme mentionné précédemment, les voies de signalisation du TGF- β sont perturbées chez les patients SSc. Il a été montré que la quantité de Smad 1 était plus élevée chez les patients sclérodermiques et était corrélée avec le taux de CTGF (382). Par ailleurs, en l'absence de TGF- β , la signalisation Smad 1 n'est pas activée et le CTGF n'induit qu'une faible production de collagène dans les fibroblastes dermiques. A l'inverse, l'inhibition du CTGF diminue également la synthèse de collagène induite par le TGF- β (395). Ces résultats montrent la relation synergique entre le TGF- β et le CTGF, indispensable à la mise en place d'une réponse fibrotique.

Endothéline-1 et angiotensine II

Comme évoqué précédemment, le TGF- β induit l'expression d'autres acteurs pro-fibrotiques comme le CTGF, mais également l'ET-1 par une voie indépendante de Smad mais dépendante de ALK-5/JNK (396). Dans des fibroblastes pulmonaires sains, une étude a montré que la capacité du TGF- β à induire la fibrose était diminuée par l'inhibition des récepteurs de l'ET-1, suggérant un lien étroit entre le TGF- β et la voie de l'ET-1 (397). En effet, le blocage des récepteurs de l'ET-1 dans des fibroblastes de patients atteints de SSc diminue l'effet pro-fibrosant du TGF- β (398). De plus, la mise en évidence par immunoprécipitation d'une association entre les récepteurs du TGF- β et de l'ET-1 souligne encore davantage la synergie de ces deux voies. En outre, la quantité de récepteurs co-précipités était plus importante dans les fibroblastes SSc que chez les témoins, suggérant que cette synergie est encore plus forte en situation de fibrose pathologique comme au cours de la SSc.

L'ET-1 est également capable d'agir de manière indépendante du TGF- β . Une équipe a montré que la présence d'ET-1 dans l'environnement de fibroblastes pulmonaires sains induisait l'expression de gènes impliqués dans la fibrose, dont *CTGF* (399). Dans cette étude, l'ET-1 agissait *via* la voie MEK/ERK dans les fibroblastes.

La production d'angiotensine II est plus élevée dans le sang et la peau des patients sclérodermiques et contribue également au maintien de l'activité des fibroblastes (400). *In vivo*, l'angiotensine II induit l'expression du gène du collagène I (401). De manière similaire à l'ET-1, cette activation se produit *via* la voie de signalisation MEK/ERK dans les fibroblastes. Une autre équipe a montré *in vivo* que l'inhibition du récepteur 1 de l'angiotensine II par l'irbesartan permettait de diminuer l'inflammation ainsi que la fibrose dans un modèle de souris traitées par HOCl (402).

TLR4

Le TLR4 participe à l'activation persistante du fibroblaste. Traditionnellement activé par la présence de LPS, une étude a montré que la Fn-EDA était également capable d'activer TLR4 sur une lignée de cellules épithéliales (403). Plus tard, une équipe a montré que la Fn-EDA était plus élevée dans la circulation et les biopsies cutanées de patients atteints de SSc. Dans des cultures de fibroblastes normaux, la Fn-EDA permettait d'induire la production de collagène et une différenciation en myofibroblastes. La présence de TGF- β dans la culture stimulait la synthèse de Fn-EDA et à l'inverse, la fibrose cutanée était atténuée chez des souris mutées dépourvues de Fn-EDA. De même, l'inhibition de TLR4 atténuait la fibrose cutanée induite par la bléomycine chez la souris. Ces résultats mettent en avant l'implication de l'axe Fn-EDA-TLR4 dans la fibrose. L'accumulation aberrante de Fn-EDA chez les patients sclérodermiques entraîne une hyperactivation des fibroblastes *via* TLR4 (404).

Interleukines

Plusieurs interleukines sont capables d'activer des fibroblastes et participent ainsi à la mise en place de la fibrose.

En se liant à son récepteur à la surface des fibroblastes, l'IL-6 active les voies de signalisation JAK2/STAT3 et ERK aboutissant à la synthèse de collagène, la production de CTGF et l'expression d' α -SMA *in vitro* (336).

Sur des fibroblastes sains cultivés *ex vivo*, l'IL-13 inhibe la production de MMP et induit au contraire la synthèse de TIMP (405). Dans cette étude, des effets similaires avaient été obtenus avec l'IL-4. Les résultats de l'équipe de O'Reilly *et al.* a montré que l'IL-13 induisait l'augmentation de l'expression du collagène de manière dépendante de la voie STAT6 (406).

L'IL-1 (α et β) contrôle également l'activité des fibroblastes en stimulant *ex vivo* leur prolifération ainsi que la synthèse de collagène et de TIMP (407). Une étude a montré que les fibroblastes/myofibroblastes des patients sclérodermiques mourraient *ex vivo* en l'absence de sérum dans le milieu de culture. De manière intéressante, ce phénomène pouvait être stoppé par l'ajout d'IL-1 (α ou β) (408). L'activation du récepteur de l'IL-1 de type I favoriserait donc la longévité des cellules dans la SSc avec pour conséquence le maintien de la fibrose.

PDGF

Le PDGF contribue à la suractivation des fibroblastes dans la SSc. *In vivo*, l'utilisation d'un inhibiteur tyrosine kinase, tel que le sunitinib, permet d'inactiver PDGFR et diminue la fibrose induite par l'injection d'HOCl chez la souris (409).

Dans une autre étude, les auteurs ont montré qu'il était possible de convertir des fibroblastes humains sains en fibroblastes sclérodermiques en surexprimant la protéine Ha-Ras, impliquée dans la prolifération cellulaire (410). L'expression de cette protéine était déclenchée par la stimulation du PDGFR qui active la voie ERK 1/2.

Comme évoqué précédemment, de récentes études ont montré une activité fonctionnelle des auto-Ac et leur rôle dans l'activation des fibroblastes. La découverte en 2006 d'auto-Ac dirigés contre les PDGFR soutient l'implication de la voie du PDGF dans la fibrogénèse. L'activation du PDGFR par ces auto-Ac stimulerait l'expression du gène *collagène I*, favoriserait la transition des fibroblastes sains vers un phénotype de myofibroblastes et entraînerait l'accumulation de ROS (411).

Il existe une boucle d'activation de la voie de signalisation PDGF-A/PDGFR α autocrine, dépendante du TGF- β et de l'IL-1 α dans les fibroblastes SSc. En effet, il a été montré que les fibroblastes sclérodermiques exprimaient en grande quantité l'IL-1 α , qui stimule la production de PDGF-A et d'IL-6 (412). De plus, dans une autre étude, la stimulation de fibroblastes sclérodermiques avec du TGF- β entraînait une augmentation du nombre de récepteurs PDGF α (360). Par ailleurs, il a été montré que

le PDGF stimulait également le T β R (362). Par conséquent, un contrôle réciproque entre ces deux voies s'opère permettant de réguler le processus de fibrose chronique dans la SSc.

Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires intervenant dans l'adhésion cellulaire. L'équipe d'Asano *et al.* a montré que ces récepteurs participaient à la fibrogénèse. Dans leurs études, les fibroblastes dermiques sclérodermiques exprimaient de façon accrue les isoformes α v β 3 et α v β 5 en comparaison avec des fibroblastes sains (413,414). La surexpression transitoire de ces intégrines dans des fibroblastes normaux a induit une augmentation de l'expression de gènes pro-fibrotiques et a favorisé une différenciation myofibroblastique. Ces effets ont nettement diminué voire ont disparu, lors de l'inhibition des intégrines ou du TGF- β . Les intégrines participent également à la maturation du TGF- β . L'équipe a ainsi mis en évidence l'existence d'interactions entre les intégrines, le T β R et le TGF- β endogènes et que ces interactions sont augmentées dans la SSc conduisant à l'établissement d'une boucle autocrine de TGF- β dans les fibroblastes (413,414).

La mécanotransduction

Les changements de type cellulaire ainsi que l'accumulation des composants de l'ECM sont responsables du changement des propriétés mécaniques du tissu. Le tissu conjonctif perd son élasticité pour devenir rigide et compact entraînant le maintien de l'activité des fibroblastes et l'exacerbation du processus fibrotique. Un cercle vicieux se met alors en place (415).

Les fibroblastes sont des cellules particulièrement sensibles aux forces mécaniques qu'elles perçoivent par l'intermédiaire de leurs intégrines. Dans les fibroblastes sclérodermiques, il a été montré que la focal adhesion kinase (FAK), qui est impliquée dans l'organisation du cytosquelette, était constamment activée (416). Cette activation était due à l'intégrine β 1, surexprimée à la surface des fibroblastes SSc. L'activation de FAK est corrélée avec l'augmentation de l'inflammation et de la fibrose. *Ex vivo*, l'inhibition de FAK diminuait la capacité contractile et migratoire des cellules. Dans un modèle murin, l'inhibition de FAK avait entraîné une diminution de la fibrose pulmonaire induite par injection de bléomycine (417).

Les *Rho-associated protein kinase* (Rock) sont les principaux médiateurs cellulaires des Rho GTPases et jouent un rôle clé dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Cette voie de signalisation est activée par différents *stimuli* dont l'angiotensine II, l'ET-1 et les intégrines. *Ex vivo*, une étude a montré que Rock stimulait la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la production de protéines matricielles (418). Ces résultats ont été confirmés dans une étude *in vivo* où l'inhibition de cette voie atténuait la fibrose pulmonaire induite par l'injection de bléomycine chez la souris (419).

FAK et Rock activent en aval deux voies impliquées dans la réponse cellulaire aux signaux mécaniques. L'une des voies fait intervenir les facteurs de transcription liés à la myocardine (MKL) et le facteur de

réponse sérique (SRF), l'autre engage la *Yes associated protein* (YAP) et le co-activateur transcriptionnel avec motif de liaison PDZ (TAZ) (415).

L'hypoxie tissulaire persistante et les ROS

Les ROS contribuent à l'activation chronique des fibroblastes. En effet, l'hypoxie tissulaire et le TGF- β entraînent l'activation du facteur de transcription Egr-1 dans les fibroblastes. Ce facteur code pour l'enzyme NOX4 qui catalyse la génération de ROS (420). En plus des intégrines, l'activation de FAK dans les fibroblastes SSc dépend également des ROS (416). Les ROS agissent aussi en activant la voie ERK1/2, responsable de l'induction de la protéine Ha-Ras (410). Une étude *ex vivo* a montré une diminution de la production des protéines matricielles et des marqueurs fibrotiques par des fibroblastes dermiques SSc traités avec un anti-oxydant (421). Dans ces conditions, les ROS intracellulaires, la voie de signalisation ERK 1/2 ainsi que l'activité NF- κ B étaient inhibés.

7/ Modèles *in vivo*

De nombreux modèles *in vivo* de SSc sont décrits dans la littérature. Les principaux modèles murins présentant une fibrose sont repris dans ce paragraphe.

A) Modèles génétiques

Les souris *Tight skin* (TSK)-1 présentent une mutation de la fibrilline 1, un acteur intervenant dans l'assemblage des fibres élastiques. Entre douze et seize semaines, ce modèle développe une fibrose cutanée, caractérisée par une production excessive de protéines matricielles par les fibroblastes (422). Les souris TSK-2 sont porteuses d'une mutation sur le gène *COL3 α 1*. En dix semaines, elles présentent une augmentation de l'expression du collagène de type I et III, ainsi qu'un infiltrat de cellules inflammatoires (423).

B) Modèles transgéniques

Les souris sur-exprimant *Fos-related antigen-2* (Fra2) sont caractérisées par une vasculopathie autour de neuf semaines puis une fibrose cutanée et pulmonaire progressive à l'âge de douze semaines. Autour de dix-huit semaines, les souris présentent des signes d'insuffisance cardiaque et pulmonaire due à une HTAP et à de la fibrose (424). Ce modèle ne présente pas de signe d'auto-immunité.

Le facteur Fli-1 est un important régulateur de la fonction immunitaire et de la fibrillogenèse du collagène. Les souris déficientes pour ce facteur présentent une vasculopathie importante et une fibrose cutanée (425).

Les modèles T β R1^{CA}; Cre-ER (426) et T β R1 Δ k (427) reposent sur une surexpression du récepteur du TGF- β . Il s'agit de modèles essentiellement axés sur la fibrose, sans inflammation, auto-Ac ou

vasculopathie marqués. Les auteurs décrivent une déstructuration des couches de la peau avec notamment une fibrose du derme, un amincissement de l'épiderme et une perte des follicules pileux.

Les souris déficientes pour le récepteur *urokinase-type plasminogen activator* (uPAR) sont un autre modèle de sclérodémie. Dans des conditions physiologiques, le complexe uPA-uPAR favorise la dégradation des protéines matricielles. Les souris déficientes pour ce récepteur présentent une fibrose cutanée et pulmonaire ainsi qu'une atteinte vasculaire (428).

C) Modèles induits

Le modèle utilisant la bléomycine est le plus utilisé pour l'étude de sclérodémie *in vivo*. En clinique, la bléomycine est utilisée comme traitement antitumoral. Chez la souris, elle entraîne une inflammation et la production d'auto-Ac, puis une fibrose localisée. Elle peut être injectée par voie intradermique pour induire une fibrose cutanée (429) ou par voie intratrachéale pour le développement d'une fibrose pulmonaire (430).

La fibrose peut également être induite par l'angiotensine II. Elle induit à la fois une inflammation et une fibrose de la peau (431).

Des modèles murins de GVHD-sclérodémique existent (432). La GVH chronique est cliniquement proche de celle de la SSc avec un dépôt excessif de collagène. Dans ces modèles, les auteurs décrivent une fibrose cutanée et pulmonaire, en plus d'une importante inflammation. Ces modèles sont délicats à mettre en place en raison de l'utilisation d'animaux immunodéprimés.

Le modèle HOCl met en avant le rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la SSc. Il permet de reproduire l'atteinte systémique présente dans la SSc, en induisant une fibrose cutanée et pulmonaire, une atteinte vasculaire (en particulier rénale) ainsi que la production d'auto-Ac. Il repose sur des injections intradermiques quotidiennes d'HOCl, chez des souris femelles Balb/C âgées de 6 semaines (366).

OBJECTIFS DE LA THESE

Le phénomène de remodelage est un processus physiologique indispensable intervenant dans la réparation des tissus. Dans un contexte pathologique, ce remodelage peut être dérégulé et contribuer à la pathogénèse de nombreuses maladies, dont deux ont fait l'objet de notre étude.

L'ACG est une vascularite affectant les vaisseaux de gros calibres, caractérisée par une inflammation et un remodelage vasculaire. Bien que les corticoïdes soient efficaces dans le traitement de l'inflammation, ils n'ont peu ou pas d'effet sur le remodelage vasculaire. De plus, les patients sont exposés aux effets délétères de la corticothérapie au long cours et sont confrontés à un risque élevé de rechute.

La SSc est une maladie auto-immune complexe, à l'origine d'une fibrose progressive et chronique des tissus. Actuellement, très peu de traitements efficaces sont disponibles.

Notre équipe a développé une nouvelle thérapie cellulaire reposant sur l'utilisation de cellules d'origine myéloïde, appelées HuMoSC. *In vitro*, les HuMoSC inhibent la prolifération lymphocytaire et favorise l'expansion des Treg. *In vivo*, les HuMoSC préviennent l'apparition de la GVHD. En plus de confirmer leur rôle anti-inflammatoire, l'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer l'intérêt thérapeutique des HuMoSC dans l'inhibition du remodelage vasculaire et la fibrogénèse.

Dans un premier temps, nous avons étudié le potentiel thérapeutique des HuMoSC et de leur surnageant au cours de l'ACG. Des fragments d'artères temporales de patients atteints d'ACG ont été cultivés *ex vivo*. L'effet des HuMoSC, et de leur surnageant, a été étudié sur l'expression des marqueurs d'inflammation et de remodelage. La prolifération et la migration des CML ont également été évaluées en présence de HuMoSC ou de leur surnageant. Enfin, cette étude s'est intéressée à l'identification de nouveaux mécanismes d'action des HuMoSC.

Dans un second temps, nous avons évalué l'intérêt que pourraient avoir les HuMoSC pour le traitement de la SSc. Pour cela, nous avons isolé et caractérisé des fibroblastes issus de biopsies de peau humaine. Puis, à l'aide d'un modèle d'activation *in vitro* des fibroblastes en présence de TGF- β , nous avons étudié l'expression de marqueurs de fibrose et la capacité de prolifération des fibroblastes/myofibroblastes en présence de surnageant de HuMoSC. Enfin, l'effet du surnageant de HuMoSC a été étudié dans un modèle murin de fibrose induite par HOCl.

Les HuMoSC et leur surnageant présentent des propriétés suppressives similaires, suggérant la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires par les HuMoSC. Le dernier axe de recherche de ce travail de thèse reposait sur l'identification de ces facteurs, afin de comprendre les mécanismes d'action du surnageant de HuMoSC et d'améliorer son processus de fabrication. Ainsi, nous nous sommes

intéressés au rôle des VE et à celui des protéines présentes dans le surnageant. Enfin, nous avons évalué l'impact de la congélation à long terme sur le surnageant, dans l'optique d'un passage en clinique.

RESULTATS

Intérêt thérapeutique des HuMoSC pour le traitement de l'artérite à cellules géantes

L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel thérapeutique des HuMoSC et de leur surnageant pour le traitement de l'ACG, en analysant d'une part leur effet sur l'inflammation vasculaire, mais surtout en s'intéressant à leur effet sur le remodelage vasculaire. Ce dernier repose sur la migration et la prolifération des CML ainsi que sur la synthèse excessive de protéines matricielles (collagène 1, collagène 3, fibronectine), entraînant à terme une hyperplasie intimale à l'origine de l'obstruction de la lumière artérielle.

Les précédents travaux de l'équipe ont montré que les HuMoSC, comme leur surnageant, inhibaient l'activation et la prolifération lymphocytaire. Le but de cette étude était de montrer qu'en plus de leurs propriétés anti-inflammatoires, les HuMoSC possèdent également des propriétés anti-remodelage.

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de culture *ex vivo* d'artères temporales humaines présentant des lésions d'ACG. Pour cela, des fragments d'artère temporale de patients atteints d'ACG avec une BAT positive, étaient récupérés le jour de la biopsie, puis disséqués, découpés en sections d'1 mm d'épaisseur, inclus dans 25µL de MATRIGEL puis cultivés seuls (RPMI) ou en présence de HuMoSC (250.10^3 /mL) ou de leur surnageant (25%). Après 5 jours de culture, l'expression des ARNm des gènes impliqués dans l'inflammation (*IL6*, *IL1β*, *CXCR3*, *CCL2*, *CCR2*, *HLADRA*) et le remodelage vasculaire (*COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *VEGFA*, *PDGFA*, *PDGFB*) a été mesurée dans les artères et les concentrations de protéines ont été mesurées dans les surnageants de culture (collagène 1, fibronectine 1, VEGF, PDGF).

Dans la première partie de ce travail, nous avons analysé l'expression des gènes engagés dans l'inflammation vasculaire. Nous avons montré que l'expression du gène *CCL2*, impliqué dans le recrutement des monocytes, était diminué en présence de HuMoSC ou de leur surnageant. De même, les diminutions de *CCR2* et *HLADRA* suggéraient une baisse de l'activité pro-inflammatoire des monocytes et des LT respectivement. Enfin, une diminution de l'expression de *CXCR3* en présence de HuMoSC ou de leur surnageant évoquait une diminution de la polarisation Th1 au niveau artériel. *In vitro*, nous avons également montré que les HuMoSC diminuaient la polarisation Th1/Th17 ainsi que la prolifération des LT.

Outre les propriétés anti-inflammatoires de ces cellules, ce travail a mis en évidence un rôle inédit des HuMoSC dans le contrôle du remodelage vasculaire. En effet, l'expression des gènes codant pour les protéines de la matrice extra-cellulaire (*COL1A1*, *COL3A1* et *FN1*) était diminuée dans les artères traitées avec les HuMoSC ou leur surnageant. Nous avons également observé une diminution de

l'expression du gène du *VEGFA* après traitement par HuMoSC, suggérant ainsi un effet sur la néoangiogenèse, un processus impliqué dans la physiopathologie de l'ACG (433). Dans les surnageants de culture, la concentration des protéines collagène 1, fibronectine 1 et VEGF diminuait également en présence de HuMoSC ou de leur surnageant.

Nous avons ensuite confirmé ces résultats en utilisant des cultures de CML afin de mieux étudier l'effet des HuMoSC sur leur prolifération et leur migration, qui sont les deux principaux phénomènes cellulaires impliqués dans le remodelage vasculaire (188). Progressivement, les CML ont proliféré et migré hors de l'explant puis ont été récupérées et cultivées en présence de PDGF AB (20 ng/mL) pour stimuler leur prolifération et leur capacité de migration et reproduire ainsi les conditions pathologiques rencontrées dans l'ACG (196). Nos résultats ont montré que le surnageant de HuMoSC ralentissait fortement la prolifération ainsi que la migration des CML, selon un effet dose dépendant, ce qui confirmait leur potentiel pour contrôler le remodelage vasculaire au cours de l'ACG.

En l'absence de PDGF pour stimuler les CML *in vitro*, aucun effet du surnageant de HuMoSC n'a pu être observé, du fait d'une activation cellulaire trop faible pour démasquer une potentielle inhibition. Cela souligne également que les HuMoSC ont probablement un effet anti-remodelage mineur en dehors des processus pathologiques.

Ce besoin de PDGF pour démasquer l'effet thérapeutique des HuMoSC nous a poussé à explorer leur effet sur la voie de signalisation du PDGF. Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression du PDGF lui-même et celle de son récepteur. L'expression des ARNm des deux chaînes du récepteur du PDGF (*PDGFRA* et *PDGFRB*) était significativement diminuée dans les BAT positives cultivées en présence de HuMoSC. La liaison du ligand sur son récepteur entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire, incluant les protéines Akt et Erk. Les HuMoSC ne modifiaient pas la phosphorylation de ces protéines dans les CML. En revanche, notre travail a montré que les HuMoSC et leur surnageant agissaient principalement *via* l'inhibition de l'activité du complexe mTORC1, ce qui pourrait expliquer leur effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire.

Enfin, nous avons montré que les HuMoSC pouvaient être une thérapie cellulaire intéressante dans l'ACG car elles avaient la capacité de migrer dans les artères. En effet, nous avons montré que les HuMoSC migraient significativement plus vers les BAT positives plutôt que négatives et que cette migration était dépendante d'une interaction entre CCR5 et ses ligands (CCL3, CCL4 et CCL5), lesquels sont fortement exprimés dans les artères atteintes d'ACG.

En conclusion, cette étude montre que les HuMoSC ou leur surnageant sont capables de diminuer l'inflammation et surtout le remodelage vasculaire dans un modèle d'artères temporales cultivées *ex vivo*. Cet effet sur le remodelage vasculaire est particulièrement intéressant puisqu'il est mal contrôlé

par les traitements actuellement disponibles dans l'ACG. Notre étude montre que cet effet passe par l'inhibition du complexe mTORC1, qui peut être bloqué par des traitements comme la rapamycine, dont l'effet sur l'inflammation, le remodelage vasculaire et la néoangiogenèse a déjà été rapporté (434,435).

Ce travail ouvre également de nouvelles perspectives pour le traitement d'autres maladies dans lesquelles le remodelage tissulaire joue un rôle prépondérant, comme par exemple la SSc.

Cet article est en cours de soumission.

Human monocyte-derived suppressive cells (HuMoSC) for cellular therapy in Giant Cell Arteritis

Maxime Samson,^{1,2,3*} Coraline Genet,^{2*} Marc Corbera-Bellata,³ Hélène Greigert,^{1,2} Georgina Espígol-Frigolé,³ Claire Gérard,² Claudie Cladière,² Roser Alba-Rovira,³ Marion Ciudad,² Pierre-Henry Gabrielle,⁴ Catherine Creuzot-Garcher,⁴ Georges Tarris,⁵ Laurent Martin,⁵ Philippe Saas,^{2,6} Sylvain Audia,^{1,2} Bernard Bonnotte,^{1,2#} and Maria Cinta Cid^{3#}

*contributed equally and share the first co-authorship

contributed equally and share the last co-authorship

¹ Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Dijon University Hospital, F-21000 Dijon, France

² Université Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-21000 Dijon, France

³ Vasculitis Research Unit, Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clinic, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CRB-CELLEX, Barcelona, Spain.

⁴ Department of Ophtalmology, Dijon University Hospital, F-21000 Dijon, France

⁵ Department of Pathology, Dijon University Hospital, F-21000 Dijon, France

⁶ CIC-1431, INSERM, Besançon University Hospital, EFS, F-25000 Besançon, France

CORRESPONDENCE TO:

Prof. Maxime Samson

Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique

Hôpital François Mitterrand,

Centre Hospitalier Universitaire de Dijon

14 boulevard Gaffarel

21000 Dijon, France

Tel: +33 3 80 29 34 32

Fax: +33 3 80 29 38 46

Email: maxime.samson@u-bourgogne.fr; maxime.samson@chu-dijon.fr

WORD COUNT:

Abstract: 240 words

Main document: 3741 words

References: 40

6 figures; 0 table

Supplementary file: 1 file with supplementary methods, 3 sup tables and 3 sup figures

DISCLOSURES

Maxime SAMSON: Roche-Chugai (consulting), Abbvie (consulting), Boehringer Ingelheim (consulting), Novartis (consulting and research grant), VIFOR pharma (consulting)

Bernard BONNOTTE: Roche-Chugai (personal fees for consulting), Boehringer Ingelheim (consulting)

Catherine CREUZOT-GARCHER: Horus and Bayer (grant), Novartis and Bayer (honoraria) and Novartis, Bayer, Thea, Horus, Alcon and Allergan (medical advisory board).

Pierre-Henry GABRIELLE: Allergan, Bayer and Novartis (travel expenses), Novartis and Bayer (honoraria).

ROLE OF THE FUNDING SOURCES

This work was supported by grants (MS) from research grants from the French Vasculitis Study Group (FVSG) and the Foundation for the Development of Internal Medicine in Europe (FDIME).

CONTRIBUTORSHIP STATEMENT

MS, BB and MCC were the principal investigators and take primary responsibility for the paper. MS, HG, GEF, SPG, PHG, CCG, SA, BB and MCC recruited the patients. MS, CG, MCB, HG, CG, CC, RAR, MC, GT and LM performed the laboratory work. MS and CG did the statistical analyses. MS, BB and MCC coordinated the research. MS, CG, MCC and BB contributed to data interpretation. MS, CG, PS, BB and MCC drafted the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laetitia BARBIER (Department of Pathology, Dijon University Hospital, F-21000 Dijon, France) for her help in analyzing temporal artery biopsies; Sabine Berthier, Thibault Ghesquière, Barbara Nicolas, Vanessa Leguy (Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Dijon University Hospital, F-21000 Dijon, France), Sergio Prieto-González and José Hernández-Rodríguez (Vasculitis Research Unit, Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clinic, Barcelona, Spain) for their help in recruiting patients. We thank Amandine Bataille (CellimaP, Plateforme d'imagerie cellulaire, UMR1231, Inserm; Université de Bourgogne, AgroSup; Dijon, France) and Elodie Noirot (DImaCell – UMR Agroécologie, Université de Bourgogne, Dijon, France) for her help in performing experiments.

ABSTRACT

Objective: The pathogenesis of Giant Cell Arteritis (GCA) relies on vascular inflammation and vascular remodelling, the latter being poorly controlled by current treatments. This work aimed to assess the therapeutic potential of Human Monocyte-derived Suppressor Cells (HuMoSC) for the treatment of GCA.

Methods: Fragments of temporal arteries (TA) from GCA patients were cultured alone or in the presence of HuMoSC or their supernatant. After 5 days, mRNA expression was measured in TA and proteins were measured in the supernatant of cultures. The proliferation and the migration capacity of VSMC were also analysed with or without supernatant of HuMoSC.

Results: mRNA expression of gene implicated in vascular inflammation (*CCL2*, *CCR2*, *CXCR3*, *HLADR*), vascular remodelling (*PDGF*, *PDGFR*), angiogenesis (*VEGF*), as well as extracellular matrix composition (*COL1A1*, *COL3A1* and *FN1*) were decreased in arteries treated with HuMoSC or their supernatant. Likewise, concentrations of Collagen1 and VEGF were lower in the supernatants of TA cultivated with HuMoSC. In the presence of PDGF, the proliferation and the migration of VSMC were both decreased after treatment with HuMoSC supernatant. Study of the PDGF pathway suggested that HuMoSC act through an inhibition of the activity of mTOR. Finally, we showed that HuMoSC could be recruited in the arterial wall through the implication of CCR5 and its ligands.

Conclusion: Altogether, our results suggest that HuMoSC or their supernatant could be useful to decrease vascular inflammation and remodelling in GCA, the latter being an unmet need in GCA treatment.

Keywords: suppressive cells, giant cell arteritis, treatment, cellular therapy, vascular remodelling

INTRODUCTION

Giant cell arteritis (GCA) is a large vessel vasculitis characterized by the association of systemic and vascular inflammation leading to vascular remodeling that triggers progressive occlusion of affected arteries [1,2]. Diagnosis of GCA is usually established by the identification of lesions of granulomatous vasculitis in a temporal artery biopsy (TAB). TAB also allows researchers to obtain affected tissues in order to better study pathways involved in this vasculitis and ultimately test new treatments [3,4].

Pathogenesis of GCA is not fully understood but it is admitted that following activation of dendritic cells of the arterial wall, CD4 T-cells are recruited in the arterial wall and then activate, proliferate and polarize into Th1 and Th17 cells [5]. Interferon-gamma (IFN- γ), which is produced by Th1 cells, activates vascular smooth muscle cells (VSMC) that produce chemokines (CXCL9, -10, 11 and CCL2) triggering the recruitment of monocytes and other CD4 and CD8 T-cells. Mononuclear cells infiltrating the granulomatous lesions in the arterial wall then contribute in producing mediators, such as Platelets Derived Growth Factor (PDGF) [6] and endothelin-1 [7,8], that triggers the proliferation and the migration of VSMC from the media to the intima, which, together with the production of proteins of the extracellular matrix (collagen-1, collagen-3 and fibronectin), causes intimal hyperplasia leading to vascular occlusion and ischemic signs of GCA [5,9]. Thus, VSMC play a major role in the pathophysiology of GCA because they contribute to the recruitment of inflammatory cells and they also produce extracellular matrix components that contribute to stenosis of the vascular lumen and generate the ischemic signs of GCA. Previous data have demonstrated that the migration and proliferation of VSMC, that supports this remodeling process, is mainly due to an excess of endothelin-1 and PDGF in GCA lesions [6-8,10]. In addition, a neoangiogenesis process due to increased VEGF production contributes to increased inflammation and vascular remodeling. [5].

Glucocorticoids (GC) are the cornerstone of the treatment of GCA. They are very effective but must be given for > 1 year to avoid relapses, so that the great majority of GCA-patients develop GC-related complications, which causes important morbidity and disability [11]. In addition, GC have no significant effect on vascular remodeling processes, which might be involved in the occurrence of relapses and cardiovascular events during the follow-up of these patients [3]. To date, only methotrexate and tocilizumab have been shown to be effective for the treatment of GCA, especially to decrease the frequency of relapses and spare GC [12,13]. Other molecules are being developed but the majority of them target inflammation and very little vascular remodeling that remains an unmet need for improving the outcome of GCA patients [14].

Immunosuppressive/regulatory immune cell-based therapy is a relatively recent approach that may make it possible to reduce doses of immunosuppressive drugs and GC in the treatment of autoimmune diseases. Along this line, our team has recently reported on the development of a novel clinically relevant and feasible approach to generate *ex vivo* human suppressor cells of monocytic origin (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD163⁺CD206⁺HLA-DR⁺ cells), referred to as “human monocyte-derived suppressive cells” (HuMoSC) [15]. HuMoSC are highly potent at inhibiting the proliferation and activation of autologous and allogeneic effector T cells *in vitro* and *in vivo* [15]. Interestingly, HuMoSC express CCR5 [15], the receptor of CCL3, CCL4 and CCL5, which makes HuMoSC theoretically able to home to inflammatory lesions in order to exert their inhibitory function. Furthermore, HuMoSC are generated in the presence of IL-6 and GM-CSF, that are two cytokines highly involved in GCA pathogenesis [16-21], which could *in vivo* promote the stability of HuMoSC.

Ex vivo generated allogenic HuMoSC or their supernatant could therefore represent a novel therapeutic tool to prevent vascular inflammation and vascular remodeling in GCA. This is what we investigated in this study.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Fresh TABs with histopathological features of GCA (TAB+) were obtained from 12 newly diagnosed patients suffering from GCA. Patients were prospectively enrolled at the Vasculitis Research Unit, Department of Systemic Autoimmune Diseases, Hospital Clínic, University of Barcelona (Spain) and the department of internal medicine and clinical immunology, Dijon University Hospital, Dijon (France) after obtaining their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki (Collection DC-2016-2675). Usual clinical, biological and therapeutic data were recorded at diagnosis. Main clinical and biological characteristics of these patients are summarized in **Supplementary Table 1**.

HuMoSC generation and preparation of HuMoSC supernatant

HuMoSC were generated *ex vivo* from circulating monocytes, as already described [15]. Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Ficoll gradient centrifugation. Then, monocytes were purified by Percoll gradient centrifugation and cultured in X Vivo medium (Lonza®) supplemented with GM-CSF (10 ng/mL) and IL-6 (10 ng/mL) (Miltenyi Biotec®). Cultured cells were harvested after 7 days by gentle scraping. At this stage, the cells could be frozen in liquid nitrogen, eventually transported, and thawed within 3 months. To obtain HuMoSC, a CD33 positive selection

was finally performed according to the Miltenyi kit and protocol for human CD33 isolation (AutoMACS Pro, Miltenyi Biotec®). The purity of CD33⁺ isolation was checked by flow cytometry (anti-CD33 FITC, clone HIM 3-4, eBioscience) and was always >80%. Otherwise, cells were not kept for subsequent experiments.

For preparation of HuMoSC supernatant, HuMoSC were cultured (10^6 cells/mL) in complete RPMI during 48h before collecting the supernatant.

Ex vivo cultures of temporal artery

Sections of TAB specimens affected by GCA were embedded in MATRIGEL® and cultured as previously described [3]. Briefly, surrounding tissue was carefully removed to keep the temporal artery before cutting regular sections of ~1 mm of thickness. These sections were embedded in 25 µL of MATRIGEL® in a 24-well plate (1 section/well and 2 sections/condition) and then covered by 750 µL of RPMI 1640 medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, amphotericin B at 2.5 µg/ml and gentamycin at 200 µg/ml. At day 1, HuMoSC (250.10^3 cells/mL) or supernatant of HuMoSC (25%) were added. After 5 days of culture, arterial sections were collected and homogenized in TRIzol reagent using a Minilys homogenizer (Bertin instruments®) before extraction of total mRNA.

RT-PCR

Total RNA was extracted from cultured artery and cDNA obtained by reverse-transcription employing random hexamer priming kit (ThermoFisher Scientific, Applied Bioscience) in a final volume of 100 µL. Then, specific pre-developed TaqMan probes from ThermoFisher Scientific (TaqMan Gene Expression Assays) were used for PCR amplification (listed in **Supplementary table 2**). Fluorescence was detected with CFX96™ Real-Time PCR Detection System and results analyzed with the CFX Manager™ software (Bio-Rad Laboratories). Gene expression was normalized to the expression of the endogenous control *GUSB* using comparative ΔC_t method. mRNA concentration was expressed in relative units with respect to *GUSB* expression (relative expression).

Cytokine assays

PDGF-AA, PDGF-BB, fibronectin, COL1 α 1, and VEGF concentrations were measured in the supernatant of *ex vivo* TAB cultures by luminex® (R&D Systems, Bio-Techne) following manufacturer instructions. Data were acquired and analyzed on a Bio-Plex® 200 system (Bio-Rad, France).

Generation of vascular smooth muscle cell (VSMC)

VSMC were isolated from negative TABs. Briefly, healthy arteries were embedded in MATRIGEL® to ensure prolonged survival and then covered by DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, amphotericin B at 2.5 µg/ml and gentamycin at 200 µg/ml. Cells were treated with trypsina-EDTA (Gibco) between each passage. VSMC were used after 4-7 doubling passages.

Scratch-wound healing tests

VSMC were cultured in 6-well plates with or without human PDGF-AB (R&D systems, 20 ng/mL) to stimulate VSMC migration [6], and supernatant of HuMoSC at 10% or 25%. After 72 hours, medium was removed and replaced by fresh medium with the corresponding additives and molecules. VSMC reached confluence after 6 days of culture. One scratch per well was done using a sterile 10 µL pipette tip. Three pictures per well at different levels were automatically taken using phase contrast microscope (Axio Observer 7, Zeiss) every 6 hours during 48 hours. The analyze of videos was performed by Cellimap Platform (University of Burgundy, Dijon, France).

Proliferation Assay for VSMC

VSMC were plated in flat-bottom 96-well plates at 4000 cells/well in triplicate wells and incubated at 37° C in 5% CO₂ for 1 to 7 days. VSMC were cultured with fresh DMEM (10% FBS), with or without human PDGF-AB (R&D systems, 20 ng/mL) to stimulate VSMC proliferation [6], supernatant of HuMoSC at 10% or 25% and Dexamethasone at 0,5 µg/ml. After 2, 4 and 7 days of culture, cells were fixed and stained with 0.2% crystal violet (Sigma-Aldrich) in 20% methanol for 20 min. Wells were washed, air-dried, and solubilized in 1% sodium dodecyl sulfate (SDS). Optical density was measured with a plate reader (Multiskan Ascent, Thermo Scientific) at 620 nm wavelength in order to assess the proliferation of VSMC.

Western blot

Cell lysates were obtained using modified radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer supplemented with protease inhibitors (Complete, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), NaF (50mM), PMSF (1mM), protinine, leupeptine, pepstatine (1ng/ml) and orthovanadate (2mM) (Sigma-Aldrich). The following primary antibodies were used for immunodetection: rabbit anti-total AKT, anti-phospho-AKT (Thr 308) and anti-phospho AKT (Ser 473) and used at 1:1000 dilution (Cell signaling), rabbit anti-total Erk1/2 (dilution 1:2000) and rabbit anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (dilution

1:1000) (cell signaling), mouse anti β -actin used at 1:5000 dilution (Sigma Aldrich), rabbit anti-vincullin used at 1:30000 dilution (Abcam). Goat anti-rabbit IgG HRP-linked (Cell Signaling) and goat anti-mouse IgG HRP-conjugated (Bio-Rad) were used as secondary antibodies at 1:2000 dilution.

mTOR pathway analysis by confocal microscopy

Cultured artery sections were fixed in cold paraformaldehyde (4%), followed by exposure to increasing concentrations of saccharose (15-30%). Sections were then embedded in optimal cutting temperature OCT (Sakura, Flemingweg, The Netherlands) and stored at -80°C. Then, 10 μ m cryostat sections were fixed, blocked and incubated with primary antibodies against human phospho-S6 ribosomal protein (p-rpS6, Ser 235/236, Cell Signaling, at 1:200 dilution) and α -smooth muscle actin (polyclonal, Abcam, at 1:500 dilution), and then donkey secondary antibodies conjugated with fluorochromes A488 (green) and A647 (red) (Abcam, at 1:300 dilution). We used DAPI to stain nuclei (blue). Visualization was performed with Leica TCS SP8 fluorescence microscope available at DimaCell Platform (INRAE, University of Burgundy, Dijon, France).

Flow cytometry

Membrane labeling was performed on HuMoSC. Antibodies were incubated for 30 minutes, at 4°C, in PBS with 0.5% FBS. Antibodies are listed in **supplementary Table 3**. Data were acquired on a BD Biosciences Canto II cytometer and analyzed with FlowJo® v10.

Chemotaxis assay

HuMoSC chemotaxis was assessed using Boyden chambers with 10 μ m pore polycarbonate filters. The lower chamber was filled with undiluted supernatants of control TAB or GCA-TAB cultivated during 5 days in MATRIGEL. A total of $30 \cdot 10^3$ HuMoSC/well in 50 μ L of 10% FBS RPMI medium were loaded in the upper chamber. In selected chambers, an antagonist of CCR2 (Calbiochem, used at 100 nM) or of CCR5 (maraviroc, R&D systems, used at 1 μ M) was added. After 4.5-hour incubation, the polycarbonate membrane was stained with hematoxylin and eosin and washed before counting number of cells/field.

Statistics

Data are expressed as numbers (%) for categorical variables and median (IQR) or mean (SEM) for continuous variables. Mann Whitney or Wilcoxon tests were performed to compare continuous

variable, as appropriate. Statistical significance was set at $P < 0.05$ (two-tailed). GraphPad Prism® was used for statistical analyses.

RESULTS

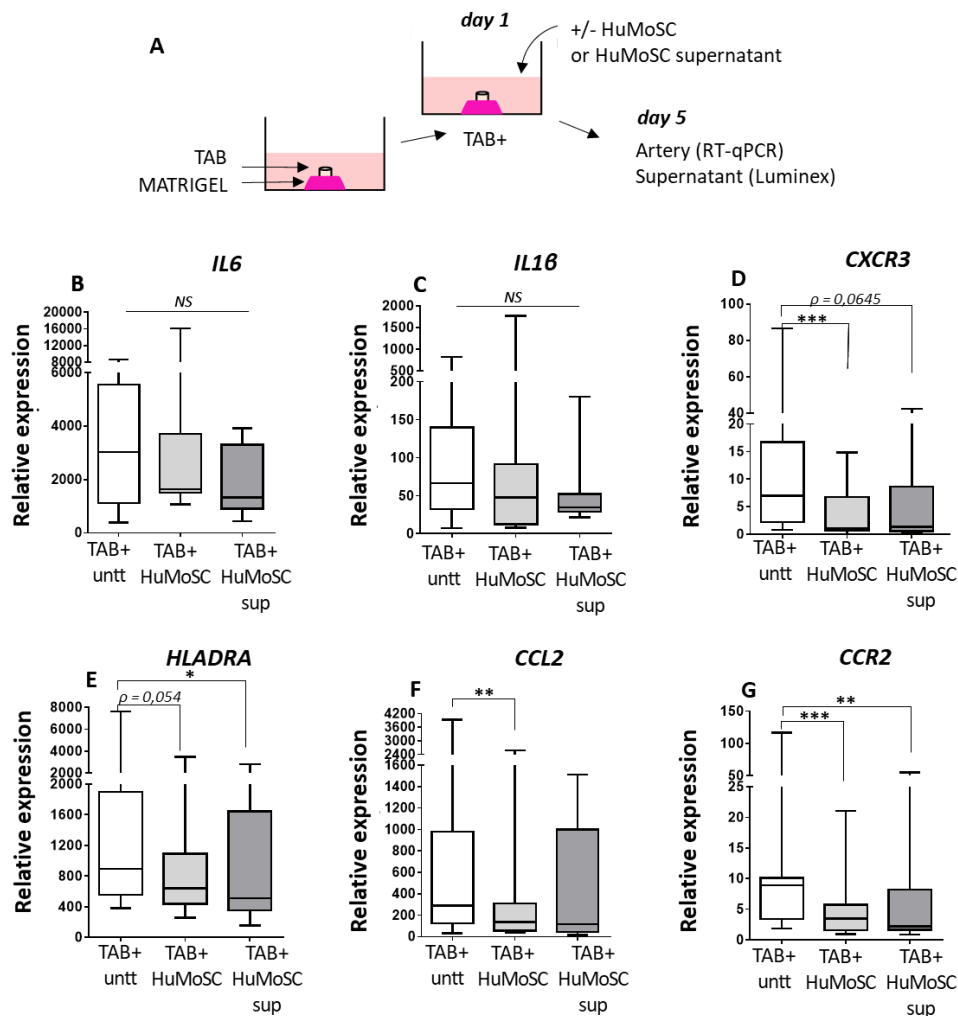


Figure 1: Effect of HuMoSC on vascular inflammation. **A:** representative method for culture of temporal arteries: sections of 1 mm of fresh TAB with lesions of GCA (TAB+) were embedded in MATRIGEL. At day 1, HuMoSC (250.10³ cells/mL) or 25% of HuMoSC supernatant was added. Each condition was performed in duplicate. After 5 days of culture, arterial sections were collected to measure mRNA by RT-PCR and the supernatant was used to measure proteins. **B-G:** mRNA expression of genes implicated in vascular inflammation.

Experimental conditions: untreated TAB+ (n=12), TAB+ treated with HuMoSC (n=11) or of HuMoSC supernatant (n=10). Whisker boxes show the median (horizontal bar), the IQR (limits of the box) and extreme values (error bars). P is the result of Wilcoxon tests. Significant results are shown (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$) otherwise non-significant.

HuMoSC reduce markers of vascular inflammation

Figure 1 depicts the analysis of the effect of HuMoSC or their supernatant in a model of *ex vivo* cultures of temporal arteries (**Figure 1A**). The mRNA expression of genes of the main markers of vascular inflammation in cultured arteries are reported in **Figure 1B-1G**: pro-inflammatory cytokines (*IL1B*, and *IL6*), markers pro-inflammatory monocytes (*CCL2* and *CCR2*), markers of Th1 cells (*CXCR3*) and markers of activated T cells (*HLADRA*). In the presence of HuMoSC, we observed a significant decrease in the level of expression of genes of *CXCR3*, *CCL2*, *CCR2* and a tendency for a decrease in *HLADRA* ($P=0.054$). Supernatant of HuMoSC had a relatively similar effect with a trend to be less powerful than HuMoSC cells.

We also generated HuMoSC from circulating monocytes of three untreated GCA patients. HuMoSC preserved their anti-inflammatory functions as demonstrated by their ability to inhibit, in a dose-dependent manner, Th1 and Th17 polarizations as well as T-cell proliferation (**Figure S1**).

HuMoSC reduce markers of arterial remodeling

Proteins that compose the extracellular matrix were also assessed in the model of *ex vivo* cultured arteries. The effect of HuMoSC or their supernatant was similar even if the latter was less powerful: dramatic decrease in the mRNA and protein levels of alpha-1 chain of collagen-1 (**Figure 2A, 2C**), significant decrease in the mRNA level of *COL3A1* (**Figure 2B**) and tendency to a decrease in the mRNA and protein levels of fibronectin (**Figure 2D, 2E**).

Angiogenesis was assessed by measuring the mRNA level of *VEGFA* and the concentration of VEGF in the supernatant of *ex vivo* cultures of arteries. By contrast with supernatant of HuMoSC, HuMoSC cells had no impact on the mRNA level of *VEGFA* (**Figure 2F**). However, both cells and supernatant of HuMoSC induce a dramatic decrease in the secretion of VEGF (**Figure 2G**) thus suggesting an anti-angiogenic effect of HuMoSC.

Taken together, these results suggest an ability of HuMoSC to inhibit vascular remodelling making us to investigate this therapeutic potential in a single cell model using cultures of VSMC as these cells are the main actor of vascular remodelling in GCA [5,9,22]. To stay in a single model and draw accurate conclusions, further experiments were performed in the presence of supernatant of HuMoSC rather than HuMoSC cells.

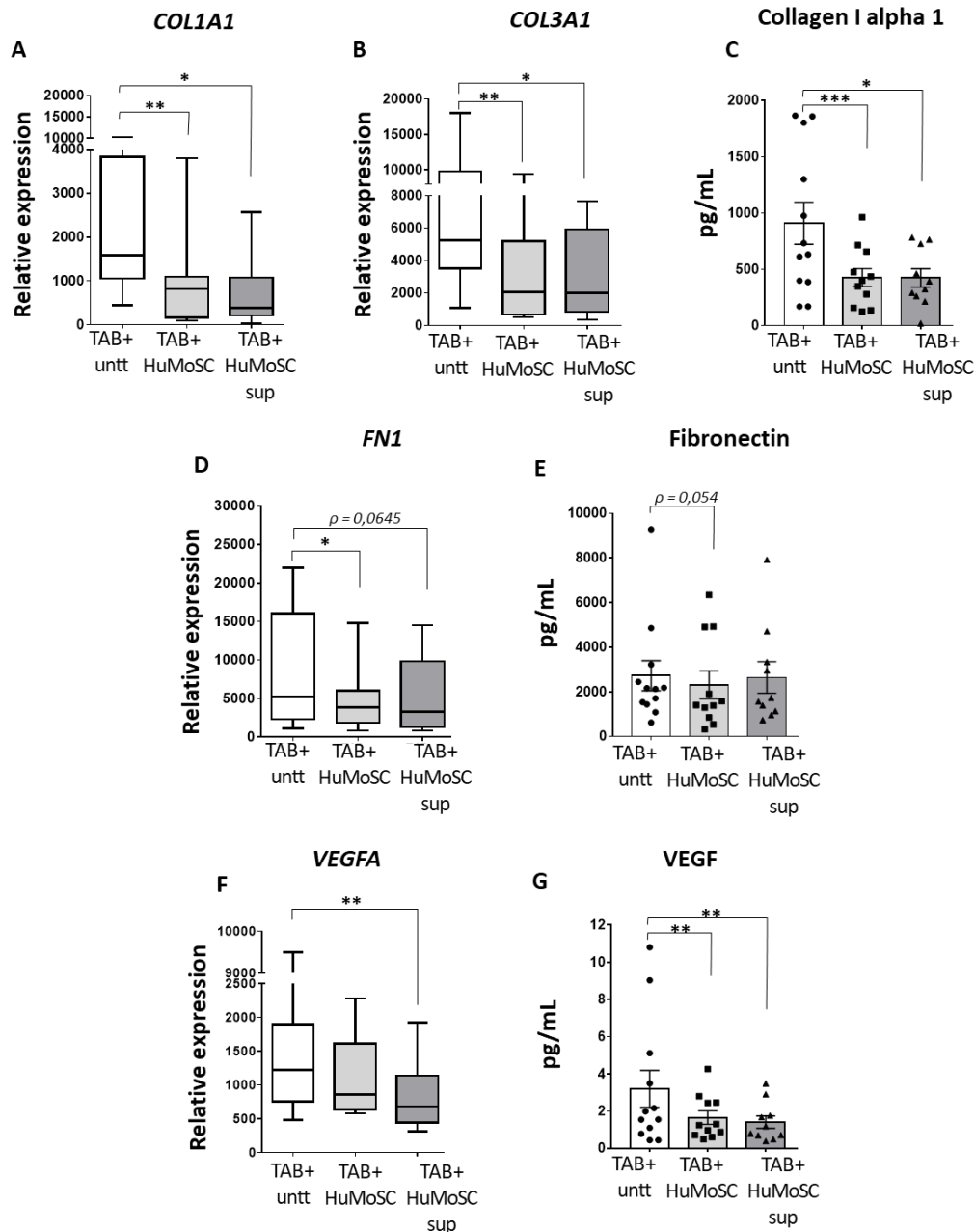


Figure 2: Effect of HuMoSC on vascular remodelling. Sections of fresh temporal arteries affected by GCA (TAB+) were embedded in MATRIGEL. At day 1, HuMoSC (250.10³ cells/mL) or 25% of HuMoSC supernatant was added. Each condition was performed in duplicate. After 5 days of culture, arterial sections were collected to measure mRNA by RT-PCR and the supernatant was used to measure proteins. **A-E:** effect of HuMoSC on the production of matrix proteins: mRNA expression in TAB+ (A, B, D) and protein level in the supernatant (C, E). **F, G:** effect of HuMoSC on angiogenesis: mRNA expression of *VEGFA* in TAB+ (F) and concentration of VEGF in the supernatant of culture (G).

Experimental conditions: untreated TAB+ (n=12), TAB+ treated with HuMoSC (n=11) or of HuMoSC supernatant (n=10). Whisker boxes show the median (horizontal bar), the IQR (limits of the box) and extreme values (error bars). *P* is the result of Wilcoxon tests. Significant results are shown (**P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001) otherwise non-significant.

HuMoSC decrease the migration and proliferation of VSMC

PDGF plays an important role in the activation of vascular remodelling related to VSMC proliferation and migration during GCA [6]. We therefore used this factor to stimulate VSMC migration and proliferation. In the absence of PDGF, VSMC migrated and proliferated very little so that no significant effect of HuMoSC supernatant was observed (**figure S2**).

By contrast, a dose dependant inhibition of the migration of VSMC was observed in the presence of supernatant of HuMoSC after having previously activated VSMC with PDGF-AB. Even after 48h of culture, a treatment with supernatant of HuMoSC remained the scratch still opened (**Figure 3A**).

After 4 days of culture, the supernatant of HuMoSC induced a dose dependant inhibition of the proliferation of VSMC, previously activated with PDGF-AB, whereas it was less strong in the presence of a treatment with dexamethasone (**Figure 3B**).

Taken together, these results suggest that HuMoSC have an anti-vascular remodelling effect through their ability to interfere with the PDGF pathway.

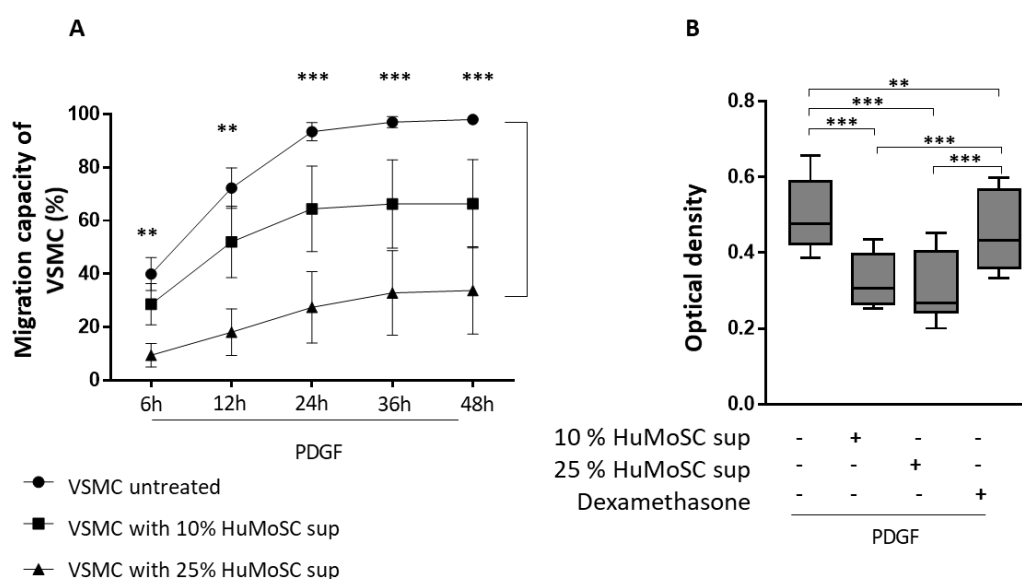


Figure 3: Effect of HuMoSC on migration and proliferation of VSMC. **A:** Study of the migration of VSMC in the presence of PDGF-AB (20 ng/mL). Scratch assays were used to measure VSMC migration capacity. Time-lapse video microscopy recorded images during 48h. HuMoSC supernatant treatment was used at 10% or 25% in VSMC cultures. Data are presented as mean percentage of wound healing $\pm$ SEM (n=3 independent experiments). **B:** Proliferation of VSMC was measured by optical density after treatment with crystal violet after 7 days of culture. VSMC were cultured with PDGF (20 ng/ml), dexamethasone (0,5 μ g/ml) and/or 10% or 25% of supernatant of HuMoSC. Whisker boxes show the median (horizontal bar), the IQR (limits of the box) and extreme values (error bars). Results show triplicates from 4 independent experiments. *P* is the result of Mann Whitney test (A) or Wilcoxon tests (C). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

HuMoSC decreased PDGF receptors

Given these data, we evaluated the activity of HuMoSCs in the PDGF pathway. In the model of *ex vivo* cultures of temporal arteries, we observed a mild decrease in the level of expression of *PDGFA* in the presence of HuMoSC supernatant (**Figure 4A**), that was not confirmed at a protein level (**Figure 4C**). Additionally, HuMoSC decreased more importantly the mRNA expression of *PDGFB* (**Figure 4B**) but paradoxically, PDGF-BB concentration increased in the presence of HuMoSC or their supernatant (**Figure 4D**). Taken together, these results therefore do not support a major effect of HuMoSC or their supernatant on PDGF-AB production.

PDGF are expressed as dimers (AA, AB, and BB) that bind to their receptors which are also composed of two chains: PDGF-R $\alpha\alpha$ and PDGF-R $\alpha\beta$ bind all types of PDGF dimers whereas PDGFR- $\beta\beta$ only links PDGF-BB. Then, it activates several intracellular pathways inducing the phosphorylation of Akt and Erk and ultimately the activation of the mTOR pathway resulting in cellular proliferation [23]. The study of *ex vivo* cultures of TAB revealed that treatment with HuMoSC, and to a lesser extent supernatant of HuMoSC, resulted in a decrease in the level of expression of both chains of the receptors of PDGF (**Figure 4E- 4F**).

Further experiments revealed that HuMoSC or their supernatant had no effect on the phosphorylation of Erk1, Erk2 and Akt (Thr 308 and Ser 473) (**Figure 4G**).

HuMoSC mainly act on VSMC through the inhibition of mTOR activity

mTOR acts by activating the p70 ribosomal S6 kinases: S6K1 and S6K2. S6K1 phosphorylates the S6 protein on the 40S ribosomal subunit and leading to cellular proliferation. Therefore, we evaluated mTOR activity by measuring the mean fluorescence intensity of phospho-S6 Ribosomal protein in cultured arteries. We observed that PDGF induced an activation of the mTOR pathway in the media and the neo intima (**Figure 5A**), and that was strongly decreased in the presence of HuMoSC or supernatant of HuMoSC (**Figure 5B**). Interestingly, this effect seemed stronger in the neo-intima (**Figure 5C**). By contrast, mTOR was poorly activated in the adventitia (**Figure S3**).

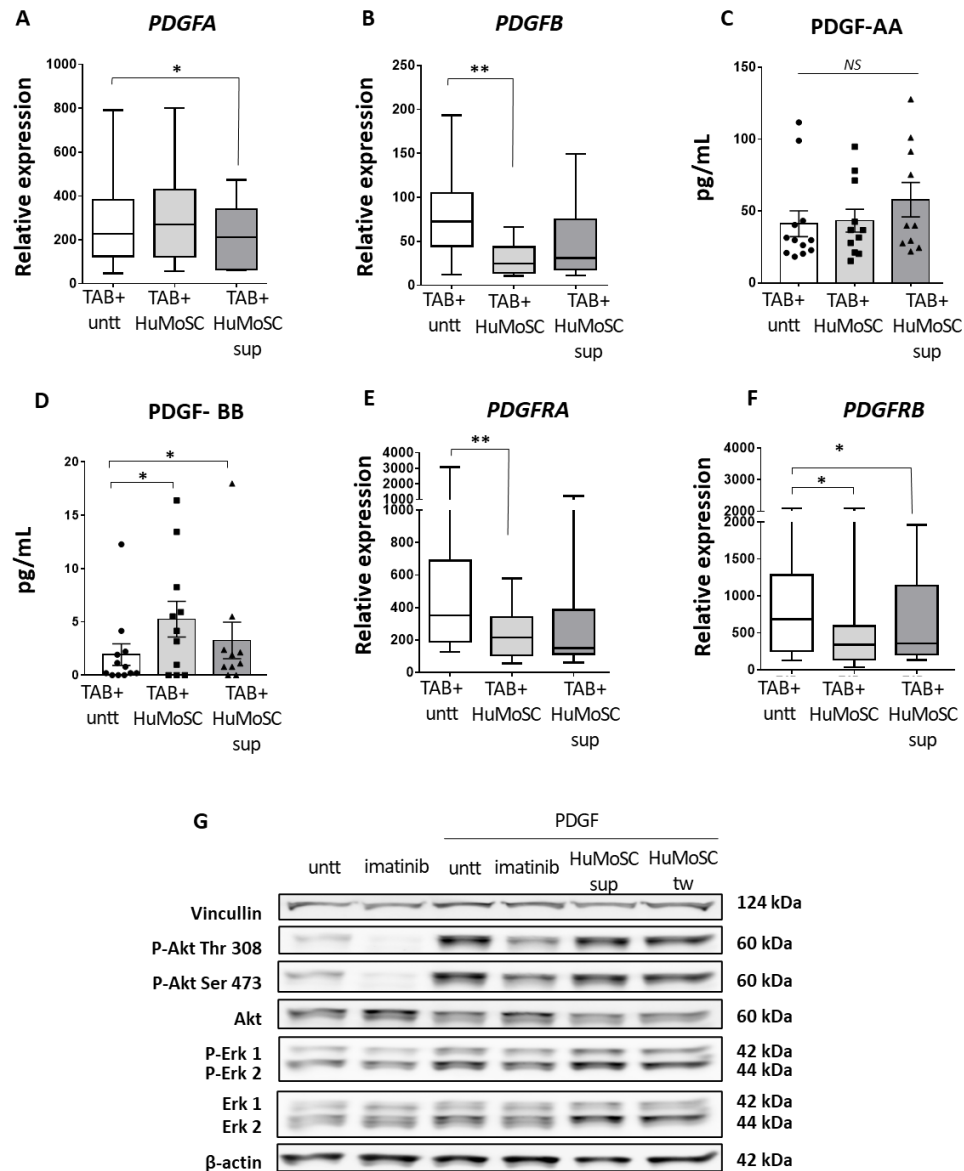


Figure 4: Effect of HuMoSC in the PDGF pathway. A-D: effect of HuMoSC on the mRNA expression and production of PDGF after 5 days of *ex vivo* cultures of temporal arteries affected by GCA (TAB+, n=12) cultivated with or without HuMoSC ($250 \cdot 10^3/\text{mL}$) (n=11) or supernatant of HuMoSC (25%) (n=12). mRNA expression in TAB+ (A, B) and protein level in the supernatant of culture (C, D). E-F: mRNA expression of PDGFR (E) and PDGFRB (F) after 5 days of *ex vivo* cultures of temporal arteries affected by GCA (TAB+, n=12) cultivated with or without HuMoSC ($250 \cdot 10^3/\text{mL}$) (n=11) or supernatant of HuMoSC (25%) (n=12). G: study of the phosphorylation of Akt and Erk by western blot. VSMC were pre-treated with imatinib ($1 \mu\text{M}$, positive control for inhibition of phosphorylation), HuMoSC supernatant (25%) or HuMoSC ($250 \cdot 10^3/\text{mL}$ separated by a transwell [tw]) during 1 hour and then cultivated alone or in the presence of PDGF-AB (20 ng/ml) for 30 minutes. VSMC were collected in $125 \mu\text{L}$ of RIPA buffer before performing western blots. β -actin and vinculin were stained as standards (representative result of 2 independent experiments).

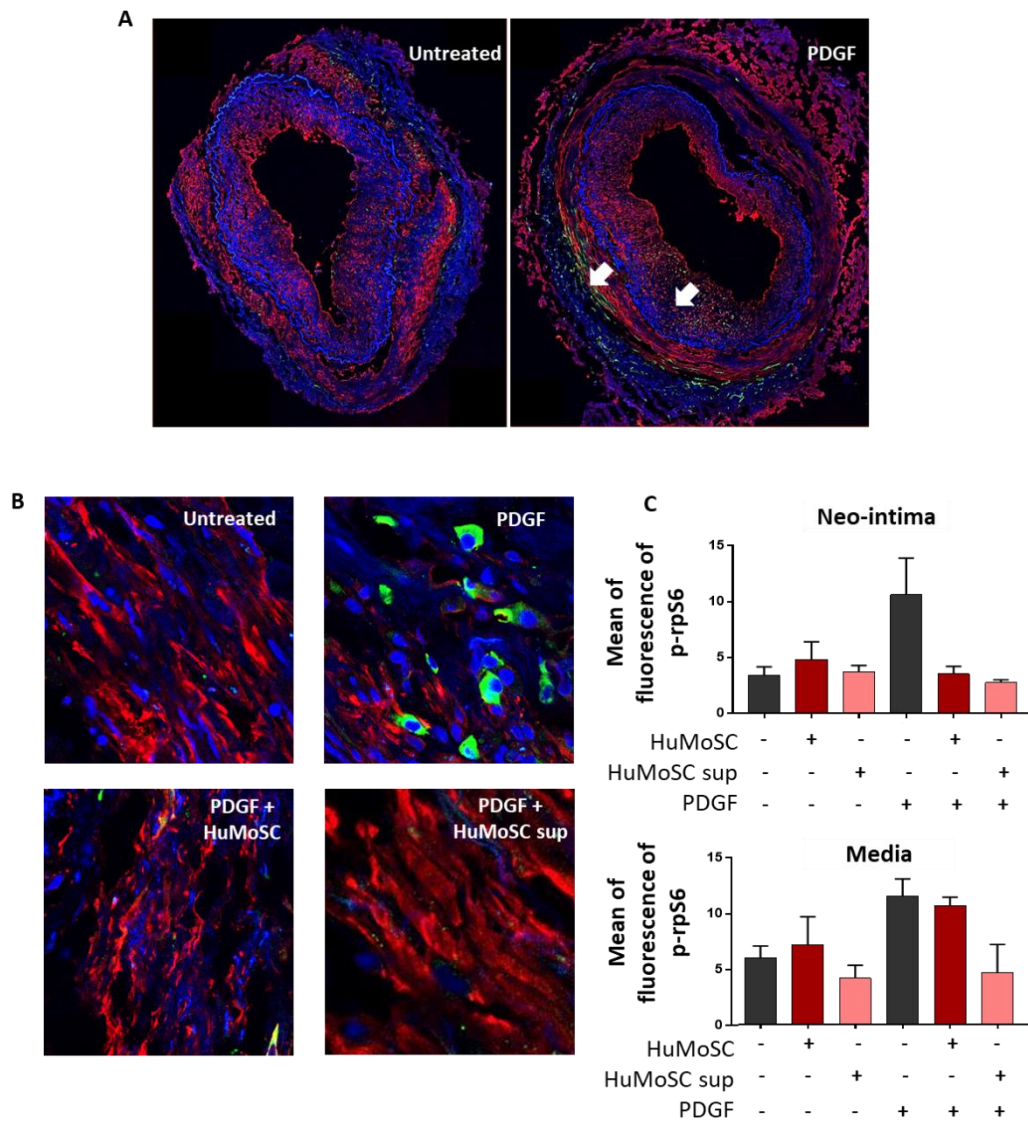


Figure 5: Effect of HuMoSC in the mTOR pathway. A-B: Confocal microscopy analysis of temporal arteries affected by GCA cultivated during 5 days alone or in the presence of PDGF (20 ng/mL), HuMoSC (250.10³/mL) or supernatant of HuMoSC (25%). Pictures show staining of α -SMA (red), p-rpS6 (green) and nuclei (DAPI, blue). p-rpS6, whose expression is shown by the white arrows, is a metabolite of mTOR. Thus, the intensity of the green staining reflects the activation of the mTOR complex. Pictures show the entire artery (A) and a zoom on the media (magnification x 40) (B). C: Mean $\pm$ SEM fluorescence intensity of p-rpS6 staining normalized to background noise was calculated in the neo-intima and the media of each temporal artery using ImageJ fiji software (untreated TAB+ [n=5], HuMoSC [n=3], supernatant of HuMoSC [n=3], PDGF [n=4], PDGF + HuMoSC [n=2], PDGF + supernatant of HuMoSC [n=2]).

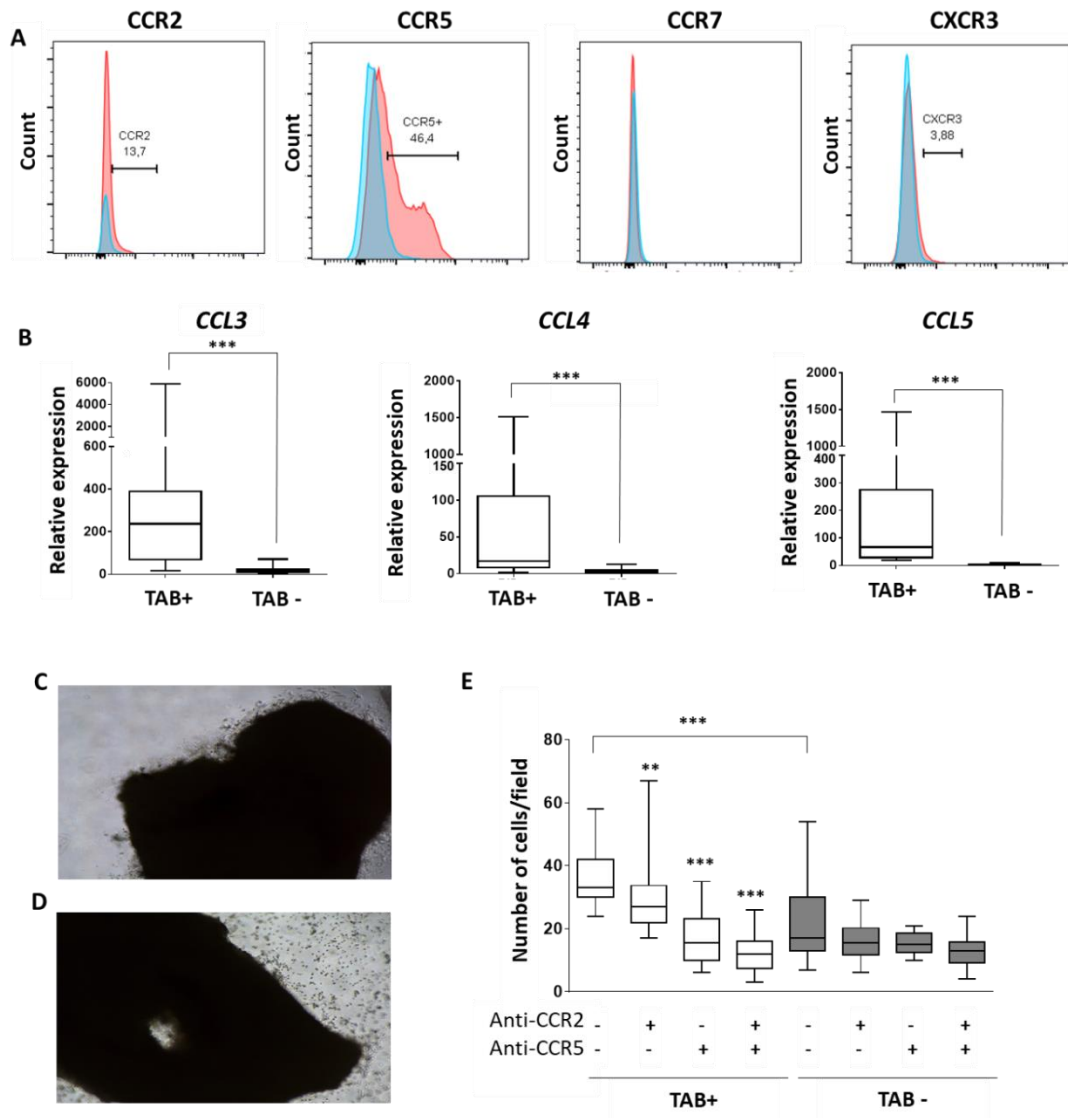


Figure 6: Recruitment of HuMoSC in GCA arteries implicates an interaction between CCR5 and its ligands. **A:** representative flow cytometry analysis of HuMoSC. Blue histogram is the isotype control and red histograms are staining of HuMoSC after CD14 gating (representative of 10 independent experiments). **B:** mRNA expressions of *CCL3*, *CCL4* and *CCL5* in positive TAB (n=12) and negative TAB (n=9) after 5 days of *ex vivo* culture in MATRIGEL®. **C, D:** Picture of a representative positive TAB after 4 hours of culture in MATRIGEL with (C) or without (D) HuMoSC. **E:** Migration assay in Boyden chamber. The lower chamber was filled with supernatants of negative or positive TABs cultivated in MATRIGEL during 5 days. A total of $30 \cdot 10^3$ HuMoSC were added in the upper chamber with or without antagonist of CCR2 (calbiochem, 100 nM) and/or CCR5 (maraviroc, 1 μ M). After 4.5 hours, the number of cells per field in the polycarbonate chamber was stained HuMoSC were counted. Each condition was performed in quadruplet and 2 fields were analysed per condition. The experiment was repeated 3 times independently. For statistical analyses, each condition was compared with the condition in which there was no treatment with antagonists of CCR2 and CCR5, except otherwise specified.

Statistics: Whisker box show median (horizontal bar), IQR (limits of the box) and extreme values (error bars). P is the result of Mann Whitney test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

HuMoSC migrate to the arterial wall through an interaction between CCR5 and its ligands

We then explored how HuMoSCs might be recruited to GCA lesions to support the therapeutic potential of these cells or their supernatant. Flow cytometry analysis of HuMoSC showed that they predominantly expressed CCR5 and to a lesser extent CCR2, very few CXCR3 and no CCR7 (**Figure 6A**). In addition, mRNA levels of chemokines that links CCR5 (i.e. CCL3, CCL4 and CCL5) were strongly expressed in GCA-TAB but not in healthy TAB (**Figure 6B**), which was in favor of an implication of an interaction between CCR5 and its ligands in the recruitment of HuMoSC within the arterial wall. Indeed, when TAB were cultured *ex vivo* in MATRIGEL, HuMoSC rapidly came into contact with arteries (**Figure 6C, 6D**).

We therefore performed Boyden chamber migration assays in the presence of CCR2 and/or CCR5 antagonists, which showed that HuMoSC migrated more toward the lower chamber when it contained supernatant from GCA-TAB, whereas they hardly migrated toward supernatant from healthy TAB ($P<0.001$). Migration decreased significantly in the presence of a CCR2 antagonist ($P=0.005$) and even more importantly in case of blockade of CCR5 ($P<0.001$), suggesting that HuMoSC are able to be recruited to the arterial wall through an interaction between CCR5 and its ligands, and to a lesser extent between CCR2 and its ligands, that are all produced within arteries affected by GCA (**Figure 6E**).

DISCUSSION

Recent advances in the understanding of the pathogenesis of GCA have led to the identification of new therapeutic targets, such as IL-6, IL-17, GM-CSF or JAK/STAT signaling proteins [24]. This has led to the development of new treatments with proven [12,13,25,26] or suspected [27-30] efficacy in GCA. However, most of these treatments appear to be suspensive or not effective in all patients. For example, 15-26% of patients experience GCA relapses during treatment with tocilizumab and about half relapse within 6 months of stopping it [13,31,32]. Moreover, most of these treatments act on vascular inflammation but very little on vascular remodeling, which is the cause of the most severe complications of GCA and thus highlights that there are still unmet needs in GCA [33].

The use of immunosuppressive cells, such as mesenchymal stem cells (MSCs), has already been proposed in systemic sclerosis. MSCs are characterized by immunosuppressive, antifibrotic and proangiogenic capabilities and may be a promising alternative option for the treatment of systemic sclerosis [34]. Our team has developed an experimental method to synthesize HuMoSC, which have strong immunosuppressive properties. Previous work showed that, *in vitro*, HuMoSC suppress T-cell proliferation and activation and are also able to expand Treg [35]. Furthermore, we demonstrated that

the immunosuppressive functions of HuMoSCs are preserved even in an inflammatory environment or in the presence of immunosuppressive treatments, which is an advantage for the treatment of autoimmune diseases [36].

The *ex vivo* culture model of temporal arteries in MATRIGEL that we used in this study is a model that mainly allows to study the mechanisms of vascular remodeling rather than vascular inflammation [3]. Despite the limitations of this model, our results suggested that HuMoSCs or their supernatant decreased the expression of genes involved in the recruitment of monocytes (*CCL2*) and T cells (*CXCR3*) to the arterial wall. The decrease in *CCR2* expression also suggests that arterial monocytes may change their phenotype to a less proinflammatory one [37].

In addition to these data suggesting an effect of HuMoSCs on vascular inflammation, our results were even clearer with respect to their effect on vascular remodeling since HuMoSCs or their supernatant decreased the expression of genes and/or the production of most extracellular matrix proteins (collagen 1, collagen 3, fibronectin) and mediators involved in neoangiogenesis (VEGF). These data suggesting an anti-remodeling effect of HuMoSCs were reinforced by *in vitro* experiments that clearly showed that HuMoSC supernatant inhibits VSMC migration and proliferation when stimulated by PDGF, as is the case during GCA [6].

The study of the mechanisms involved in this anti-vascular remodeling effect of HuMoSC suggested that this effect was not related to a modulation of PDGF production and probably not of its receptors because the expression level of PDGFRA and PDGFRB mRNA varied little in absolute value (even if the difference was statistically significant) and especially because there was no significant effect of HuMoSC on the phosphorylation of Erk and AKT, which are implicated in the intracellular signaling of PDGF [23]. Our results are more in favor of a direct effect of HuMoSC via the inhibition of the mTOR complex, which is consistent with previous data that showed that mTORC1 pathway has a central role in driving T cell inflammation and vascular lesions in large-vessel vasculitis [38,39].

Our results also provide new insights into the mechanisms of action of HuMoSC by showing that they are able to migrate to the site of the inflammatory response via an interaction between CCR5 and its ligands. This proof-of-concept study highlights the therapeutic potential of these cells in GCA.

Despite this, it seems difficult to anticipate this treatment being used in the near future during GCA, given the ongoing sensitivity of this disease to glucocorticoids and the development of new treatments targeting IL-6, IL-17, GM-CSF or JAK [40]. However, this underlines that therapies inhibiting mTOR should be tested in GCA. Moreover, our results suggest that HuMoSC or their supernatant, the latter being easier to transfer to human therapeutics, could be promising in diseases in which fibrotic

remodeling process plays a major role and for which fewer effective treatments are available, such as systemic sclerosis.

CONCLUSION

In our GCA model, HuMoSCs triggered a decrease in markers of inflammation and especially vascular remodeling. This mechanism depends, at least partially, on an inhibition of the mTOR complex. This suggests that these cells, or directly the inhibition of mTOR, have a potential interest in the treatment of GCA and could represent an alternative therapeutic strategy to reduce the doses of immunosuppressive drugs and the use of glucocorticoids. Our work also opens new perspectives for the treatment of diseases involving tissue remodeling such as fibrosis, for example systemic sclerosis.

REFERENCES

- [1] Hunder GG. Epidemiology of giant-cell arteritis. *Cleve Clin J Med* 2002;69 Suppl 2:SII79-82.
- [2] Baldursson O, Steinsson K, Bjornsson J, Lie JT. Giant cell arteritis in Iceland. An epidemiologic and histopathologic analysis. *Arthritis Rheum* 1994;37:1007-12.
- [3] Corbera-Bellalta M, Garcia-Martinez A, Lozano E, Planas-Rigol E, Tavera-Bahillo I, Alba MA, et al. Changes in biomarkers after therapeutic intervention in temporal arteries cultured in Matrigel: a new model for preclinical studies in giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2014;73:616-23.
- [4] Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Terrades-Garcia N, Alba MA, Prieto-Gonzalez S, et al. Blocking interferon gamma reduces expression of chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 and decreases macrophage infiltration in ex vivo cultured arteries from patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1177-86.
- [5] Samson M, Corbera-Bellalta M, Audia S, Planas-Rigol E, Martin L, Cid MC, et al. Recent advances in our understanding of giant cell arteritis pathogenesis. *Autoimmun Rev* 2017;16:833-44.
- [6] Lozano E, Segarra M, Garcia-Martinez A, Hernandez-Rodriguez J, Cid MC. Imatinib mesylate inhibits in vitro and ex vivo biological responses related to vascular occlusion in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1581-8.
- [7] Planas-Rigol E, Terrades-Garcia N, Corbera-Bellalta M, Lozano E, Alba MA, Segarra M, et al. Endothelin-1 promotes vascular smooth muscle cell migration across the artery wall: a mechanism contributing to vascular remodelling and intimal hyperplasia in giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1624-34.
- [8] Regent A, Ly KH, Groh M, Khifer C, Lofek S, Clary G, et al. Molecular analysis of vascular smooth muscle cells from patients with giant cell arteritis: Targeting endothelin-1 receptor to control proliferation. *Autoimmun Rev* 2017;16:398-406.
- [9] Ly KH, Regent A, Tamby MC, Mouthon L. Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev* 2010;9:635-45.
- [10] Lozano E, Segarra M, Corbera-Bellalta M, Garcia-Martinez A, Espigol-Frigole G, Pla-Campo A, et al. Increased expression of the endothelin system in arterial lesions from patients with giant-cell arteritis:

association between elevated plasma endothelin levels and the development of ischaemic events. *Ann Rheum Dis* 2010;69:434-42.

[11] Proven A, Gabriel SE, Orces C, O'Fallon WM, Hunder GG. Glucocorticoid therapy in giant cell arteritis: duration and adverse outcomes. *Arthritis Rheum* 2003;49:703-8.

[12] Mahr AD, Jover JA, Spiera RF, Hernandez-Garcia C, Fernandez-Gutierrez B, Lavalley MP, et al. Adjunctive methotrexate for treatment of giant cell arteritis: an individual patient data meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2789-97.

[13] Stone JH, Tuckwell K, Dimonaco S, Klearman M, Aringer M, Blockmans D, et al. Trial of Tocilizumab in Giant-Cell Arteritis. *N Engl J Med* 2017;377:317-28.

[14] Samson M, Espígol-Frigolé G, Terrades-García N, Prieto-González S, Corbera-Bellalta M, Alba-Rovira R, et al. Biological treatments in giant cell arteritis & Takayasu arteritis. *Eur J Intern Med* 2018;50:12-9.

[15] Janikashvili N, Trad M, Gautheron A, Samson M, Lamarthee B, Bonnefoy F, et al. Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8⁺ T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1614-24 e4.

[16] Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1286-94.

[17] Samson M, Audia S, Fraszczak J, Trad M, Ornetti P, Lakomy D, et al. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3788-98.

[18] Samson M, Audia S, Martin L, Janikashvili N, Bonnotte B. Pathogenesis of giant cell arteritis: new insight into the implication of CD161⁺ T cells. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31:S65-73.

[19] Wagner AD, Wittkop U, Thalmann J, Willmen T, Godecke V, Hodam J, et al. Glucocorticoid Effects on Tissue Residing Immune Cells in Giant Cell Arteritis: Importance of GM-CSF. *Front Med (Lausanne)* 2021;8:709404.

[20] Jiemy WF, van Sleen Y, van der Geest KS, Ten Berge HA, Abdulahad WH, Sandovici M, et al. Distinct macrophage phenotypes skewed by local granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) are associated with tissue destruction and intimal hyperplasia in giant cell arteritis. *Clin Transl Immunology* 2020;9:e1164.

[21] Corbera-Bellalta M, Alba-Rovira R, Muralidharan S, Espigol-Frigole G, Rios-Garces R, Marco-Hernandez J, et al. Blocking GM-CSF receptor alpha with mavrilimumab reduces infiltrating cells, pro-inflammatory markers and neoangiogenesis in ex vivo cultured arteries from patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2022.

[22] Sammel AM, Hsiao E, Schembri G, Nguyen K, Brewer J, Schrieber L, et al. Diagnostic Accuracy of PET/CT Scan of the Head, Neck and Chest for Giant Cell Arteritis: The Double-Blinded Giant Cell Arteritis and PET Scan (GAPS) Study. *Arthritis Rheumatol* 2019.

[23] Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene* 2017;614:1-7.

[24] Greigert H, Genet C, Ramon A, Bonnotte B, Samson M. New Insights into the Pathogenesis of Giant Cell Arteritis: Mechanisms Involved in Maintaining Vascular Inflammation. *J Clin Med* 2022;11.

[25] Villiger PM, Adler S, Kuchen S, Wermelinger F, Dan D, Fiege V, et al. Tocilizumab for induction and maintenance of remission in giant cell arteritis: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2016;387:1921-7.

- [26] Jover JA, Hernandez-Garcia C, Morado IC, Vargas E, Banares A, Fernandez-Gutierrez B. Combined treatment of giant-cell arteritis with methotrexate and prednisone. a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2001;134:106-14.
- [27] Langford CA, Cuthbertson D, Ytterberg SR, Khalidi N, Monach PA, Carette S, et al. A randomized, double-blind trial of abatacept (CTLA4-IG) for the treatment of giant cell arteritis. *Arthritis Rheumatol* 2017.
- [28] Venhoff N, Schmidt WA, Lamprecht P, Tony HP, App C, Sieder C, et al. Efficacy and safety of secukinumab in patients with giant cell arteritis: study protocol for a randomized, parallel group, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *Trials* 2021;22:543.
- [29] Cid MC, Unizony SH, Blockmans D, Brouwer E, Dagna L, Dasgupta B, et al. Efficacy and safety of mavrilimumab in giant cell arteritis: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2022.
- [30] Koster MJ, Crowson CS, Giblon RE, Jaquith JM, Duarte-Garcia A, Matteson EL, et al. Baricitinib for relapsing giant cell arteritis: a prospective open-label 52-week pilot study. *Ann Rheum Dis* 2022.
- [31] Stone JH HJ, Aringer M, Blockmans D, Brouwer E, Cid MC, Dasgupta B, Rech J, Salvarani C, Spiera R, Unizony SH, Bao M. Long-term effect of tocilizumab in patients with giant cell arteritis: open-label extension phase of the Giant Cell Arteritis Actemra (GiACTA) trial. *The Lancet Rheumatology* 2021;3:e328-e36.
- [32] Adler S, Reichenbach S, Gloor A, Yerly D, Cullmann JL, Villiger PM. Risk of relapse after discontinuation of tocilizumab therapy in giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2019;58:1639-43.
- [33] Pugh D, Karabayas M, Basu N, Cid MC, Goel R, Goodyear CS, et al. Large-vessel vasculitis. *Nat Rev Dis Primers* 2022;7:93.
- [34] Zhuang X, Hu X, Zhang S, Li X, Yuan X, Wu Y. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy as a New Approach for the Treatment of Systemic Sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2022.
- [35] Janikashvili N, Trad M, Gautheron A, Samson M, Lamarthée B, Bonnefoy F, et al. Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8+ T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1614-24.e4.
- [36] Janikashvili N, Gerard C, Thebault M, Brazdova A, Boibessot C, Cladiere C, et al. Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell-based treatment in graft-versus-host disease prevention while preserving graft-versus-leukemia effect. *Oncoimmunology* 2021;10:1880046.
- [37] van Sleen Y, Wang Q, van der Geest KSM, Westra J, Abdulahad WH, Heeringa P, et al. Involvement of Monocyte Subsets in the Immunopathology of Giant Cell Arteritis. *Sci Rep* 2017;7:6553.
- [38] Hadjadj J, Canaud G, Mirault T, Samson M, Bruneval P, Régent A, et al. mTOR pathway is activated in endothelial cells from patients with Takayasu arteritis and is modulated by serum immunoglobulin G. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57:1011-20.
- [39] Maciejewski-Duval A, Comarmond C, Leroyer A, Zaidan M, Le Joncour A, Desbois AC, et al. mTOR pathway activation in large vessel vasculitis. *J Autoimmun* 2018;94:99-109.
- [40] Regent A, Mouthon L. Treatment of Giant Cell Arteritis (GCA). *J Clin Med* 2022;11.

SUPPLEMENTARY METHODS

Ex vivo suppressive assays of HuMoSC generated from GCA patients (figure S1)

For proliferation assays, cell trace violet cell proliferation kit (Invitrogen) was used, following manufacturer instructions. Briefly, lymphocytes were obtained by Ficoll and then Percoll gradient centrifugations before being frozen (complete medium + DMSO 10%) during the generation of HuMoSC. T cells were then thawed, labeled with cell trace violet, activated with anti-CD3/CD28 microbeads (Invitrogen) and cultured with or without HuMoSC. After 4 days of culture, cells were activated with 0.1 µg/mL of phorbol 12-myristate 23-acetate (PMA) and 1 µg/mL of ionomycin (Sigma-Aldrich) in the presence of Brefeldin A (BD Golgi Plug; BD Bioscience). After 4 hours, cells were harvested and stained with anti-CD3 BV510 and anti-CD4 PE-Cy7. After fixation and permeabilization, intracellular staining with anti-IFN-γ APC and anti-IL-17 PE was performed. Cell trace incorporation and cytokine production were analyzed by flow cytometry (BD Biosciences FACS Canto II). The proliferation index and the percentages of Th1 (CD4⁺IFN-γ⁺) and Th17 (CD4⁺IL-17⁺) cells were measured with ModFIT LT 3.3 software and with FlowJo® v10 software respectively.

SUPPLEMENTARY TABLES

Sup Table 1. Main characteristics of positive TAB GCA patients at diagnosis (n=12).

Age (years), median [range]	84 [83-92]
Sex ratio (M/F)	7/5
Clinical data at diagnosis, n (%)	
<i>Cranial symptoms</i>	
Headache	10 (83)
Jaw claudication	5 (42)
Vision loss	5 (42)
Permanent *	3 (25)
Transient	2 (17)
Diplopia	3 (25)
Temporal artery abnormality	7 (58)
<i>Systemic symptoms</i>	
Fever	0 (0)
Weight loss	7 (58)
<i>Polymyalgia rheumatica</i>	4 (33)
Positive temporal artery biopsy, n (%)	12 (100)
GC started at the time of TAB, n (%)	8 (67)
Median (IQR) delay (days) of GC treatment before TAB	2 (0.25-4.75)
Laboratory findings at diagnosis, median (IQR)	
ESR (mm/hr)	80 (46-112)
CRP (mg/L)	26 (21-133)
Haemoglobin (g/dL)	11.7 (10.2-13.4)
Platelet count (G/L)	389 (271-465)

CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; GC: glucocorticoids

*all permanent vision losses were related to acute ischemic anterior neuropathy

Sup Table 2: List of TaqMan probes.

	Gene	Probe reference
<i>Chemokines</i>		
CCL2	<i>CCL2</i>	Hs00234140_m1
CCL3	<i>CCL3</i>	Hs00234142_m1
CCL4	<i>CCL4</i>	Hs99999148_m1
CCL5	<i>CCL5</i>	Hs00174575_m1
<i>Chemokine receptors</i>		
CCR2	<i>CCR2</i>	Hs01560352_m1
CXCR3	<i>CXCR3</i>	Hs00171041_m1
<i>Cell activation</i>		
HLA-DR chain α	<i>HLADRA</i>	Hs00219575_m1
<i>Cytokines</i>		
IL-1 β	<i>IL1B</i>	Hs01555413_m1
IL-6	<i>IL6</i>	Hs00985639_m1
<i>Growth factors</i>		
PDGF-A	<i>PDGFA</i>	Hs00234994_m1
PDGF-B	<i>PDGFB</i>	Hs00234042_m1
VEGF	<i>VEGFA</i>	Hs00900055_m1
<i>Receptors of growth factors</i>		
PDGF-RA	<i>PDGFRA</i>	Hs00998018_m1
PDGF-RB	<i>PDGFRB</i>	Hs01019589_m1
<i>Matrix proteins</i>		
Collagen I A1	<i>COL1A1</i>	Hs00164004_m1
Collagen III A1	<i>COL3A1</i>	Hs00164103_m1
Fibronectine	<i>FN1</i>	Hs01549976_m1
<i>Others</i>		
β -glucuronidase	<i>GUSB</i>	Hs99999908_m1

Sup Table 3: List of antibodies for flow cytometry, confocal microscopy and western blot

Antibodies	Source	Application
Anti-human CCR7-PE	eBioscience	Flow cytometry
Anti-human CXCR3-PECy7	eBioscience	Flow cytometry
Anti-human CCR5-APC	BD bioscience	Flow cytometry
Anti-human CCR2-Alexa Fluor 488	R&D systems	Flow cytometry
Anti-human CD14-APC	eBioscience	Flow cytometry
Anti-human CD33-FITC	eBioscience	Flow cytometry
Anti-human CD3-BV510	biolegend	Flow cytometry
Anti-human CD4-PECy7	eBioscience	Flow cytometry
Anti-human IL-17-PE	eBioscience	Flow cytometry
Anti-human IFN- γ -APC	eBioscience	Flow cytometry
Rabbit anti-human α SMA	Abcam	Immunofluorescence and western blot
Mouse anti-human α SMA	Abcam	Immunofluorescence and western blot
Donkey anti mouse A555 (red)	Life technologies	Immunofluorescence
Donkey anti goat A555 (red)	Life technologies	Immunofluorescence
Donkey anti mouse A647 (far red)	Life technologies	Immunofluorescence
Donkey anti rabbit A488 (green)	Life technologies	Immunofluorescence
Rabbit anti-human phospho-S6 ribosomal protein (Ser 235/236)	Cell signaling	Immunofluorescence
Rabbit anti-vincullin	Abcam	Western blot
Mouse anti- β -actin	Sigma Aldrich	Western blot
Rabbit anti-phospho AKT (Thr 308)	Cell signaling	Western blot
Rabbit anti-phospho AKT (Ser 473)	Cell signaling	Western blot
Rabbit anti-AKT	Cell signaling	Western blot
Rabbit anti-phospho p44/p42 MAPK (Erk1/2)	Cell signaling	Western blot
Rabbit anti-total MAPK (Erk1/2)	Cell signaling	Western blot

SUPPLEMENTARY FIGURES

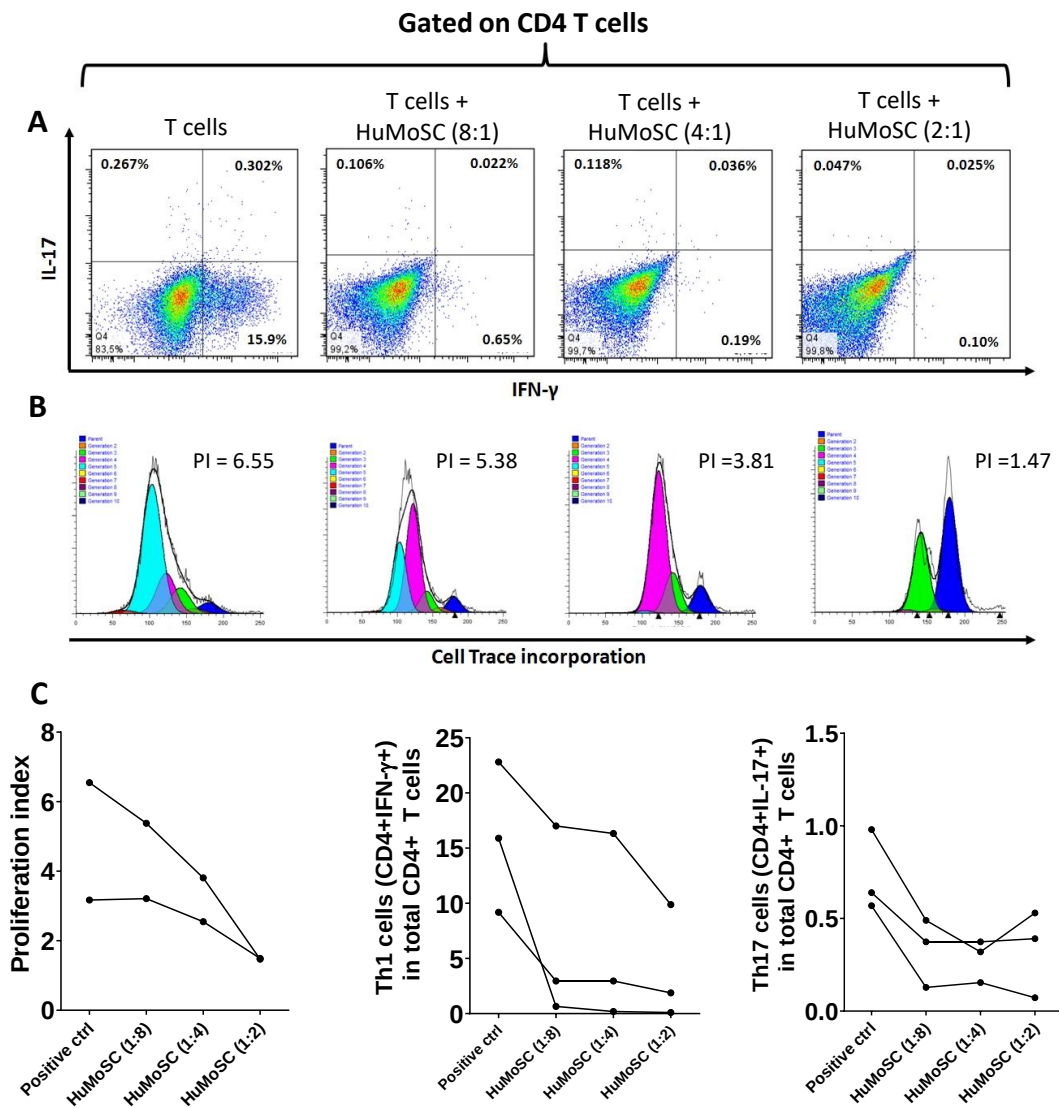


Figure S1: HuMoSC generated from GCA patients inhibit autologous T-cell proliferation and polarization of T cells towards Th1 and Th17 cells. HuMoSC were generated from circulating monocytes of 3 independent untreated GCA patients and then cultivated with autologous T cells (ratio 8:1, 4:1 and 2:1). **A, B:** After 5 days of culture, polarization (A) and proliferation (B) of CD4 T cells were analyzed by flow cytometry. Proliferation index (Cell Trace Incorporation) was calculated with ModFit software. **C:** results of the 3 independent experiments for proliferation index (n=2), percentage of Th1 and Th17 cells in total CD4 T cells (n=3).

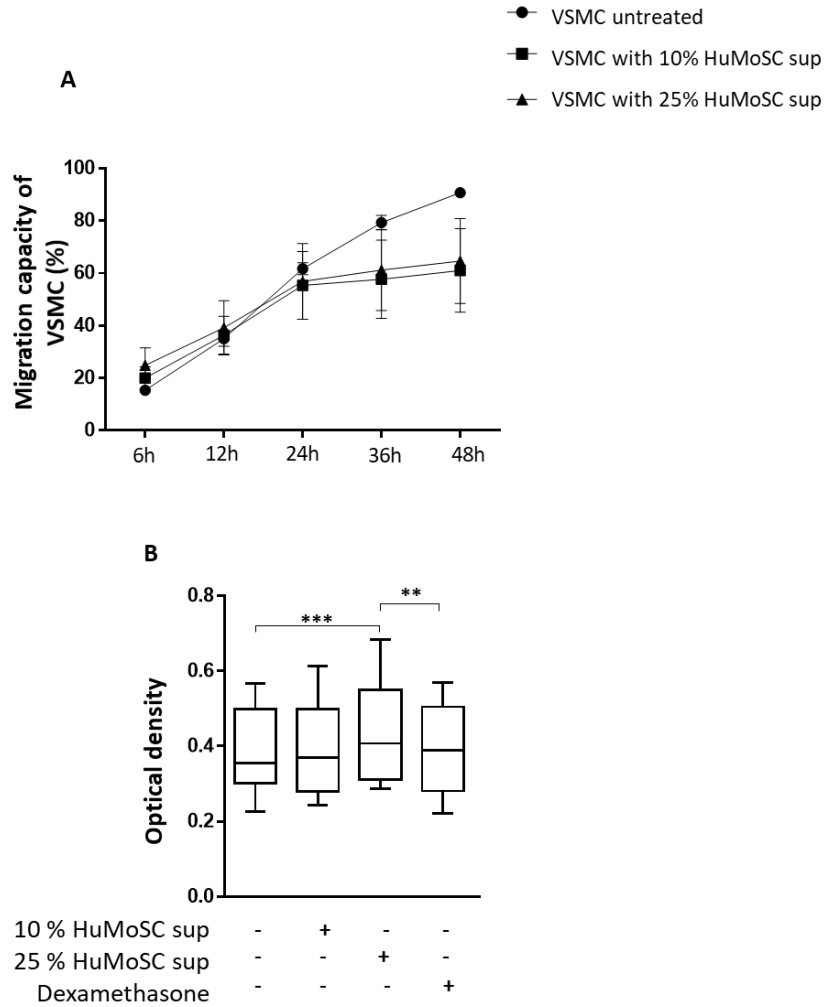


Figure S2: Effect of HuMoSC on migration and proliferation of VSMC. **A:** Study of the migration of VSMC in the absence of PDGF-AB. Scratch assays were used to measure VSMC migration capacity. Time-lapse video microscopy recorded images during 48h. HuMoSC supernatant treatment was used at 10% or 25% in VSMC cultures. Data are presented as mean percentage of wound healing $\pm$ SEM ($n=3$ independent experiments). **B:** Proliferation of VSMC was measured by optical density after treatment with crystal violet after 7 days of culture. VSMC were cultured without PDGF but with dexamethasone (0,5 $\mu\text{g/ml}$) and/or 10% or 25% of supernatant of HuMoSC. Whisker boxes show the median (horizontal bar), the IQR (limits of the box) and extreme values (error bars). Results show triplicates from 4 independent experiments.

P is the result of Mann Whitney test (A) or Wilcoxon tests (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

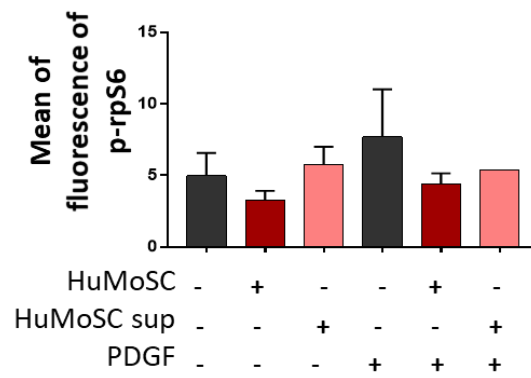


Figure S3: mTOR activity in Adventitia. Confocal microscopy analysis of temporal arteries affected by GCA cultivated during 5 days alone or in the presence of PDGF (20 ng/mL), HuMoSC (250.10³/mL) or supernatant of HuMoSC (25%). Mean $\pm$ SEM fluorescence intensity of p-rpS6 staining normalized to background noise was calculated in the adventitia of each temporal artery using ImageJ fiji software (untreated TAB+ [n=5], HuMoSC [n=3], supernatant of HuMoSC [n=3], PDGF [n=4], PDGF + HuMoSC [n=2], PDGF + supernatant of HuMoSC [n=2]).

Etude de l'intérêt thérapeutique des HuMoSC pour le traitement de la sclérodermie systémique

Les précédents travaux menés au sein de notre équipe avaient déjà montré que les HuMoSC et leur surnageant avaient une forte activité immunosuppressive (153,154). L'étude menée au cours de l'ACG a également mis en évidence un effet anti-remodelage au niveau vasculaire et en particulier, une capacité à inhiber la prolifération et la migration des CML et des myofibroblastes ainsi que leurs capacités à produire des protéines matricielles, suggérant donc un effet anti-fibrosant des HuMoSC. Forts de ces résultats, nous avons souhaité évaluer leur intérêt dans d'autres pathologies impliquant un remodelage tissulaire et de la fibrose. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à la SSc.

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé un modèle *in vitro* basé sur la culture de fibroblastes activés en présence de TGF- β , afin de reproduire l'état d'activation des fibroblastes au sein des lésions de fibrose cutanée (436). Ces fibroblastes activés étaient ensuite cultivés seuls ou en présence de surnageant de HuMoSC. Des tests *in vivo* ont également été réalisés dans un modèle murin de fibrose basé sur l'injection d'HOCl (366).

Les résultats obtenus et présentés ci-dessous, sont encore préliminaires et nécessitent donc d'être confirmés.

Isolement et caractérisation des fibroblastes humains

Introduction

Les fibroblastes jouent un rôle majeur dans le soutien structurel des tissus et sont les principaux acteurs impliqués dans le processus de cicatrisation / fibrose. Les fibroblastes dermiques représentent un ensemble de cellules phénotypiquement et fonctionnellement très hétérogène. Généralement, ils sont classés en deux groupes : les fibroblastes papillaires et les fibroblastes réticulaires. Bien qu'il n'existe pas de marqueur spécifique permettant une identification formelle de ces différents sous-types, certains marqueurs ont été associés aux fibroblastes tels que THY-1/CD90, FAP, DPPIV/CD26 et FAT/CD36 (437).

Le tissu fibrotique est caractérisé par une transition des fibroblastes vers un phénotype de myofibroblastes. Bien que proche, ces cellules sont différentes, notamment sur le plan morphologique. Le fibroblaste présente une surface lisse et régulière avec un noyau imposant. Il prend le plus souvent une forme étoilée, fusiforme, avec de longs prolongements cytoplasmiques. Le myofibroblaste est plus

gros, présente une membrane ondulée (438) et est caractérisé par la présence des fibres de stress α -SMA, lui permettant de se contracter (346). Ils expriment également fortement la vimentine, une protéine composant les filaments intermédiaires. Dans la grande majorité des cas, les myofibroblastes sont en revanche dépourvus de la chaîne lourde de la myosine, la n-caldesmon, la smootheline et la desmine (346). En comparaison aux fibroblastes, l'expression des gènes *Fn1-EDA*, *COL1A1* et *COL1A2* est également augmentée dans les myofibroblastes (439).

Dans le cadre de ce projet, nous avons isolé et cultivé des fibroblastes humains à partir de fragments de biopsies cutanées (440). Dans un premier temps, il a été nécessaire de confirmer le phénotype de ces cellules. En effet, les fibroblastes sont des cellules particulièrement sensibles à leur environnement, et en particulier aux *stimuli* mécaniques qui peuvent déclencher le processus de différenciation en myofibroblastes. Il a par exemple été montré que la culture *in vitro* de fibroblastes cardiaques primaires sur support mou participait à prolonger leur quiescence contrairement aux cellules cultivées sur support dur (439). La culture 2D sur plastique est néanmoins possible mais implique de vérifier le phénotype des cellules afin d'éviter toute dérive avant de pouvoir mettre en place un modèle de fibrose *in vitro*. Dans notre étude, l'expression de la glycoprotéine CD90 a été considérée comme un marqueur fibroblastique (fibroblastes réticulaires) déterminant et α -SMA a été utilisé comme le principal marqueur de transition phénotypique des fibroblastes en myofibroblastes. Actuellement, il n'existe pas de véritable lignée de myofibroblastes. C'est pourquoi nous avons comparé les fibroblastes extraits des biopsies cutanées aux cellules cultivées à partir d'artères temporales saines, qui correspondent phénotypiquement à des myofibroblastes (α -SMA⁺Desmin⁺MHC11^{low}CD90⁺, travail soumis).

Matériel & Méthode

Culture cellulaire

Les fibroblastes dermiques sains ont été extraits de biopsies cutanées obtenues auprès du service de chirurgie maxillo-faciale du CHU de Dijon, après consentement de patients (numéro de collection des fibroblastes : DC-2021-4731). Après une dissociation mécanique séparant le derme de l'épiderme, le derme a été découpé en morceaux d'environ 2 mm³ et a été cultivé dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine, Amphotéricine B). Après plusieurs semaines, les fibroblastes ont proliféré et migré hors de l'explant.

Les myofibroblastes ont été isolés à partir de BAT de donneurs sains cultivés dans du MATRIGEL et du RPMI complet, comme mentionné dans l'article 2 présenté plus tôt. Des travaux antérieurs ont confirmé le phénotype myofibroblastique (α -SMA⁺CD90⁺) de ces cellules.

Immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées sur une lame *Lab-Tek II* (thermofisher). Après 24h, les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde (4%), incubées avec des anticorps primaires anti α -SMA (ab7817, abcam, 1/200e) et anti-CD90 (AF2067, Biotechne, 1/20e) et incubées toute la nuit à 4°C. Les anticorps secondaires ont été ajoutés après lavage, pendant 1h à température ambiante. Ils étaient conjugués avec les fluorochromes suivants : Alexa Fluor 555 (ab150110, abcam, 1/300^e) et Alexa Fluor 488 (A11015, Invitrogen, 1/300^e). Le DAPI a été utilisé pour la coloration des noyaux. L'acquisition a été réalisée à l'aide d'un microscope Olympus DP71 et le logiciel Image J a été utilisé pour les analyses. Les résultats ont été exprimés en intensité de fluorescence moyenne.

Cytométrie en flux

Les cellules ont été marquées à la membrane avec un anticorps anti CD90-BV510 (328126, Biolegend) pendant 30 minutes, à 4°C, dans du tampon phosphate salin (PBS) contenant 2% d'albumine de sérum bovin (BSA). Les données ont été acquises à l'aide d'un cytomètre en flux Attune NxT et ont été analysées avec le logiciel FlowJo. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'expression.

Quantification α -SMA

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque de culture 6 puits pendant 96h. Les cellules ont ensuite été reprises dans du tampon de lyse et l' α -SMA a été quantifiée à l'aide du kit SimpleStep ELISA[®] (Abcam) conformément aux instructions du fabricant. L'acquisition s'est faite avec le spectrophotomètre (PerkinElmer) et la densité optique a été mesurée à 450 nm.

Analyses statistiques

Dans ce chapitre portant sur la SSc et les HuMoSC, toutes les données quantitatives ont été exprimées en moyenne $\pm$ SEM. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7. Les tests statistiques utilisés étaient des tests non paramétriques de Mann-Whitney ou de Wilcoxon ou des tests de Student appariés. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Dans notre étude, les cellules extraites des biopsies de peau présentaient comme attendu une morphologie typique de fibroblastes (figure 31A). A l'inverse, les myofibroblastes issus des BAT présentaient un cytoplasme plus large en microscopie confocale (figure 31B).

Les cellules extraites des biopsies cutanées exprimaient fortement CD90 (figures 31D et 31F), suggérant leur nature fibroblastique.

L'expression d' α -SMA par les cellules de peau était également plus faible que celle des myofibroblastes (figure 31C). Ce résultat a été confirmé par la quantification d' α -SMA dans les lysats cellulaires, qui était significativement plus faible dans les extraits de peau (figure 31E).

Globalement, ces résultats valident notre méthode de culture des fibroblastes issus de biopsies de peau. Les fibroblastes ainsi obtenus ont donc été utilisés dans les expériences suivantes.

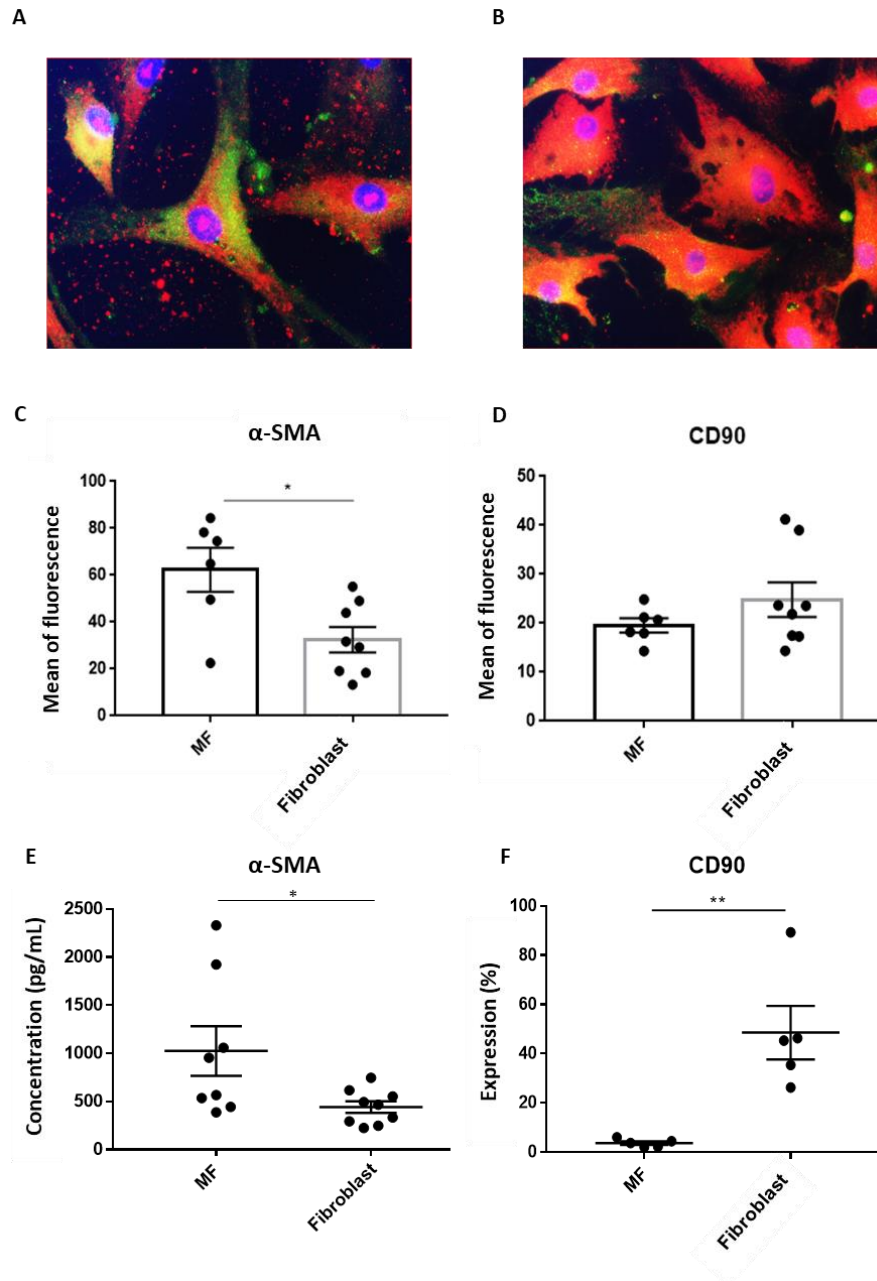


Figure 31 : Caractérisation des fibroblastes extraits des biopsies de peau humaine

A-B : Comparaison morphologique entre les fibroblastes issus des biopsies de peau (A) et les myofibroblastes issus des artères temporales (B) et évaluation par immunofluorescence de l'expression de CD90 (vert) et α -SMA (rouge). **C-D** : Analyse de la moyenne de fluorescence des marqueurs α -SMA (C) et CD90 (D) pour n=8 fibroblastes et n=6 myofibroblastes (MF). **E** : Quantification par ELISA d' α -SMA dans les lysats cellulaires pour n=9 fibroblastes et n=8 MF. **F** : Pourcentage d'expression de CD90 mesuré par cytométrie en flux, n = 5 pour chaque groupe.

Les graphiques présentent la moyenne $\pm$ erreur standard à la moyenne (SEM). Un test de Mann Whitney a été réalisé et les résultats étaient considérés comme significatifs si *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Modèle de fibrose *in vitro* et effet du surnageant de HuMoSC

Introduction

Le TGF- β est un des principaux facteurs impliqués dans la fibrose (441). Afin de générer un modèle *in vitro* reproduisant l'état d'activation des fibroblastes proche de celui observé au cours de la fibrose, les fibroblastes cutanés ont été cultivés en présence de TGF- β (436,440). Une étude a en effet justifié la pertinence de ce modèle en montrant les similarités morphologiques et moléculaires entre des fibroblastes traités avec du TGF- β et des fibroblastes issus de patients sclérodermiques (83). Les auteurs ont notamment observé une augmentation de l'expression d' α -SMA et du collagène ainsi qu'une augmentation de la prolifération des fibroblastes traités par TGF- β , comme rapporté au cours de la SSc.

Dans ce modèle *in vitro*, nous avons d'abord vérifié que le TGF- β induisait bien une différenciation phénotypique des fibroblastes en myofibroblastes, par l'induction de l'expression d' α -SMA et de facteurs pro-fibrosants (ET-1, CTGF) ainsi que la sécrétion de protéines matricielles (collagène, fibronectine). L'effet du surnageant de HuMoSC a ensuite été évalué dans ce modèle en mesurant, par RT-PCR, l'expression de marqueurs de fibrose en présence de TGF- β .

Les FGF régulent aussi de nombreux processus cellulaires. Parmi ces facteurs, nous nous sommes intéressés au FGF-2. Bien que produit par les fibroblastes, différents types cellulaires, dont les mastocytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales, sont également capables de sécréter ce facteur. Le FGF-2 régule la réponse des fibroblastes aux lésions en contrôlant leur migration et leur prolifération (442). Une étude a montré que l'induction de la prolifération de fibroblastes par le TGF- β , impliquait le FGF-2 (443). En effet, la stimulation de fibroblastes rénaux humains avec du FGF-2 augmentait la capacité proliférative des cellules *in vitro*. De plus, une étude sur trente patients atteints de SSc a rapporté une augmentation de l'expression de FGF-2 au niveau cutané (444). Ces résultats nous ont amené à utiliser le FGF-2 dans nos cultures de fibroblastes afin d'induire une plus forte prolifération cellulaire. L'effet du surnageant de HuMoSC sur la prolifération cellulaire induite par le FGF-2 *in vitro*, a également été évalué.

Matériel & Méthode

Immunofluorescence et quantification α -SMA

Les protocoles sont les mêmes que ceux cités dans la partie précédente, excepté que les fibroblastes sains ont été cultivés en présence de 10 ng/mL de TGF- β 1 (Miltenyi) dans le milieu de culture.

RT-PCR

Les fibroblastes sains ou pré-traités avec du TGF- β 1 (10 ng/mL) pendant 24h ont été cultivés pendant 24h supplémentaires avec du TGF- β 1 (10 ng/mL) et en présence ou non de 25% de surnageant HuMoSC (250 μ L). L'ARNm total a ensuite été extrait des cellules par TRIzol. L'ADNc a été obtenu par transcription inverse (ThermoFisher Scientific, Applied Bioscience). La PCR quantitative a été réalisée avec des sondes TaqMan spécifiques (ThermoFisher Scientific). La détection de la fluorescence a été réalisée en temps réel à l'aide d'un thermocycleur BioRad CFX96 et les résultats ont été analysés avec le logiciel CFX Manager. La β -glucuronidase (GUSB) endogène a été utilisée pour la normalisation de l'expression des gènes. Les amorces utilisées sont listées ci-après : *COL1A1* (chaîne α 1 du collagène I), *COL3A1* (chaîne α 1 du collagène III), *FN1* (fibronectine), *EDN1* (endothéline-1) et *CTGF*.

Suivi de la prolifération cellulaire

Les fibroblastes ont été marqués avec du CellTrace Violet (Fisher). La prolifération a été induite avec du TGF- β 1 (10 ng/mL) et du FGF-2 (10 ng/mL, Miltenyi), en présence ou non de surnageant de HuMoSC à 25% (250 μ L). Les cellules ont été incubées dans du DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau foetal et 1% d'antibiotiques, pendant 5 jours à 37°C. La prolifération des cellules a ensuite été mesurée par cytométrie en flux (Attune NxT) et les données ont été analysées avec le logiciel ModFit.

Résultats

Analyses des marqueurs de transition phénotypique

De manière surprenante, nos premiers résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une variation de l'expression d' α -SMA, en présence de TGF- β . En effet, la fluorescence moyenne d' α -SMA mesurée à partir des images de microscopie confocale, ne variait pas entre les conditions avec ou sans TGF- β (figure 32A). Dans les lysats de fibroblastes traités par TGF- β , l'expression d' α -SMA avait tendance à augmenter mais sans atteindre le seuil de significativité ($P=0.1$) (figure 32C).

En revanche, la fluorescence moyenne de CD90 à la surface des fibroblastes traités par TGF- β était diminuée (figure 32B). Cette diminution était associée à l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique avec une augmentation de l'expression des gènes des protéines de l'ECM : *COL1A1*, *COL3A1* et *FN1* (figure 33A-D). L'augmentation du rapport collagène 1 / collagène 3 (figure 33C) est associée à une rigidification des structures intracellulaires, typiques du processus de fibrose (445). Les

analyses protéiques du collagène 1 (figure 33E) et de la fibronectine (figure 33F) ont confirmé une surproduction des protéines de l'ECM en présence de TGF- β .

De même, l'expression des facteurs pro-fibrotiques ET-1 et CTGF était augmentée dans les fibroblastes traités avec du TGF- β , suggérant un processus de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (figure 34).

Globalement, ces résultats concordent avec ceux de la littérature (446), puisque, en dehors de l' α -SMA dont les résultats non significatifs peuvent être expliqués par les faibles effectifs, nos résultats étaient en faveur d'une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes sous l'effet du TGF- β . Nous avons donc conservé ce modèle pour tester l'effet du surnageant de HuMoSC.

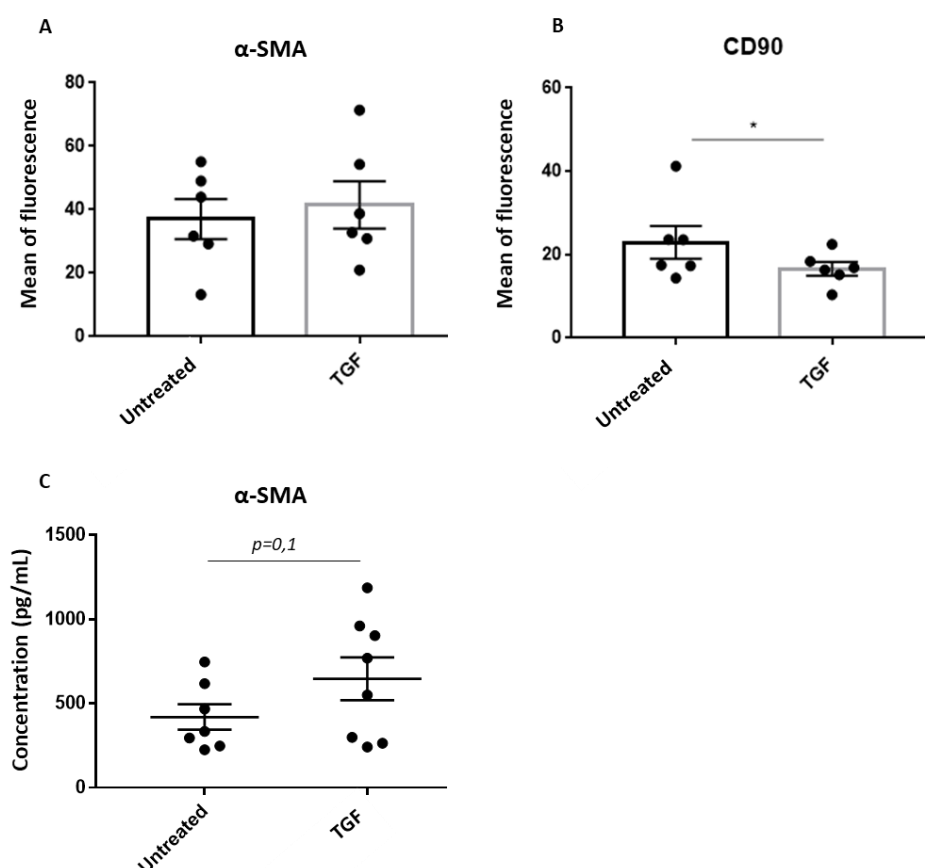


Figure 32 : Transition phénotypique des fibroblastes

A-B : Analyse de la moyenne de fluorescence des marqueurs α -SMA (A) et CD90 (B) à partir des images de microscopie confocale. Les fibroblastes ont été traités avec ou sans TGF- β 1 (10 ng/mL) pendant 24h (n = 6 pour chaque groupe). **C :** Quantification par ELISA d' α -SMA dans les lysats cellulaires pour n = 7 fibroblastes et n = 8 fibroblastes traités par TGF- β 1.

Les graphiques présentent la moyenne $\pm$ SEM. La comparaison statistique des groupes a été faite par le test de Wilcoxon, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

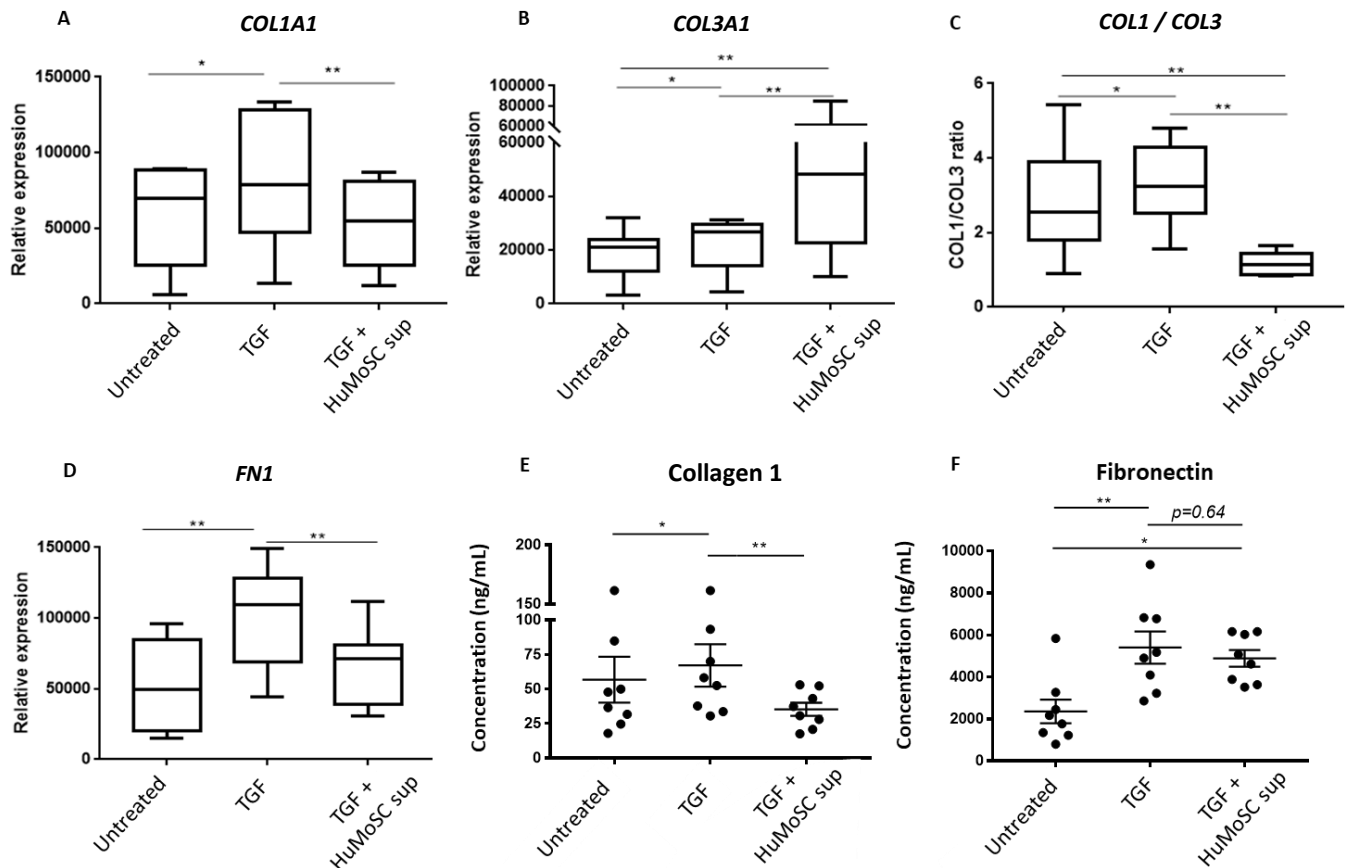


Figure 33 : Effet du surnageant de HuMoSC sur l'expression des protéines de la MEC

Evaluation de l'expression des ARNm et des protéines de l'ECM avec ou sans surnageant de HuMoSC. La PCR a été réalisée sur les cellules après 24h et le dosage protéique a été réalisé dans les surnageants de culture après 72h. **A-D** : Expression relative de l'ARNm des protéines de la MEC. Conditions expérimentales : fibroblastes non traités (n = 8), traitement avec du TGF- β 1 à 10 ng/mL (n = 8), traitement avec du TGF- β 1 et du surnageant de HuMoSC (n = 10). La boîte à moustaches représente la médiane (barre horizontale), l'IQR et les valeurs extrêmes (barres d'erreur). **E-F** : Dosage des protéines de la MEC, exprimé en ng/mL, n=8 répliques par condition. Les graphiques présentent la moyenne $\pm$ SEM

La comparaison statistique des groupes a été faite par le test de Wilcoxon, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. COL1A1 et COL1A3 = gènes codants pour la chaîne α 1 du collagène I et III ; FN1 = gène codant pour la fibronectine-1

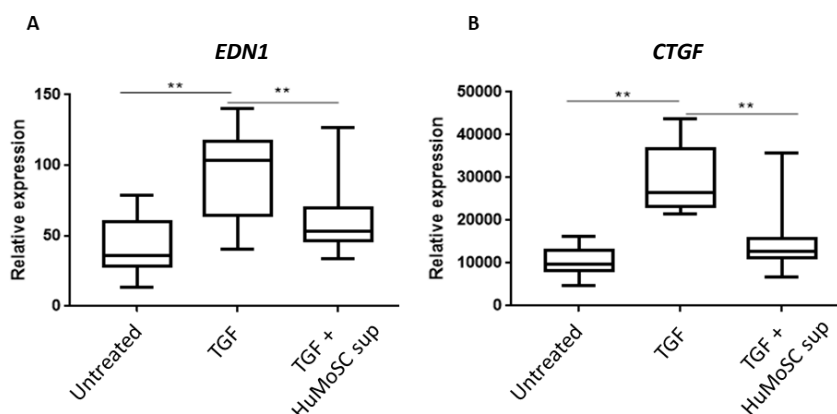


Figure 34 : Effet du surnageant de HuMoSC sur l'expression des facteurs pro-fibrosants

A-B : Expression relative de l'ARNm de l'endothéline-1 (EDN1) (A) et du *connective tissue growth factor* (CTGF) (B). La PCR a été réalisée après 24h de culture cellulaire.

Conditions expérimentales : fibroblastes non traités (n = 8), traitement par TGF- β 1 à 10 ng/mL (n = 8), traitement avec du TGF- β 1 et 25% de surnageant de HuMoSC (n = 10). La boîte à moustaches montre la médiane (barre horizontale), l'IQR et les valeurs extrêmes (barres d'erreur). La comparaison statistique des groupes a été faite par le test de Wilcoxon, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Le surnageant de HuMoSC diminue l'expression des protéines de l'ECM et des facteurs pro-fibrosants

Le surnageant de HuMoSC a été ajouté au TGF- β afin d'évaluer son rôle sur la transition phénotypique des fibroblastes.

Au niveau des transcrits, *COL1A1* et *FN1* étaient significativement diminués en présence de surnageant de HuMoSC (figure 33A et 33D). L'ARNm du collagène 3 était augmenté dans ces mêmes conditions (figure 33B), mais le rapport collagène 1 / collagène 3 était, quant à lui, fortement diminué (figure 33C). La concentration en collagène 1 concordait avec les résultats de la PCR, puisque nous observons une diminution dans les fibroblastes traités par TGF- β (figure 33E). Le surnageant de HuMoSC n'entraînait pas une diminution de la sécrétion de fibronectine (P=0,64) (figure 33F).

De manière similaire aux résultats obtenus pour les protéines de la MEC, l'expression des facteurs pro-fibrosants (*EDN1*, *CTGF*) était réduite en présence de surnageant de HuMoSC (figure 34).

Ces résultats mettent en avant le potentiel thérapeutique des HuMoSC dans l'inhibition de la fibrogénèse.

Contrôle de l'activité des fibroblastes préalablement stimulés par TGF- β

L'effet du surnageant de HuMoSC a également été évalué sur des fibroblastes pré-traités au TGF- β pendant 24h. Ensuite, nous ajoutons le surnageant de HuMoSC (250 μ L) et du TGF- β (10 ng/mL) pendant 24h supplémentaires.

L'analyse des résultats est très délicate car les expériences n'ont été reproduites que quatre fois, si bien qu'aucun résultat statistiquement significatif n'a pu être obtenu.

L'expression de l'ARNm du collagène 1 et de la fibronectine tendait à diminuer après l'ajout du surnageant de HuMoSC dans les cultures de fibroblastes (figure 35A et 35D). Le rapport collagène1/collagène 3 tendait également à diminuer en présence du surnageant de HuMoSC (figure 35C). Concernant l'expression de l'ARNm des facteurs pro-fibrosants (*CTGF*, *EDN1*), les tendances observées étaient moins évidentes. Si la transcription du *CTGF* semblait réduite avec le surnageant de HuMoSC (figure 35E), il n'y avait pas d'effet sur l'expression du gène de l'endothéline-1 (*EDN1*) une fois les fibroblastes activés par le TGF- β (figure 35F).

Bien que ces données soient préliminaires, ces résultats suggèrent que le surnageant de HuMoSC pourrait inhiber l'action du TGF- β et ainsi entraîner une régression de la fibrose *in vivo*, favorisant un retour à l'homéostasie tissulaire.

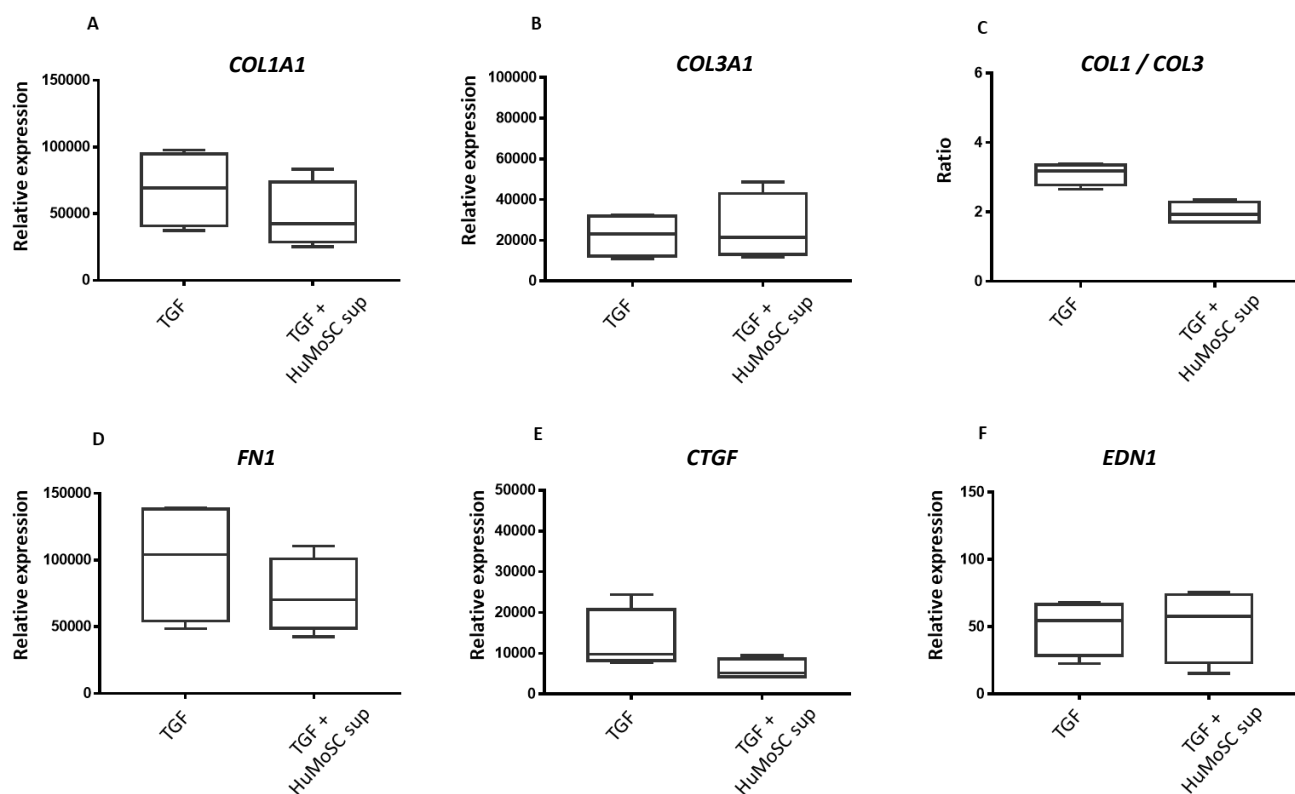


Figure 35 : Impact du surnageant de HuMoSC sur des fibroblastes pré-activés

Prétraitement des fibroblastes avec 10 ng/mL de TGF-β1 pendant 24h, avant un nouveau traitement par TGF-β1 (10 ng/mL) avec ou sans 25% de surnageant de HuMoSC (250 µL), pendant 24h supplémentaires. **A-D** : Expression relative de l'ARNm des protéines de la MEC. **E-F** : Expression relative de l'ARNm des facteurs pro-fibrosants. Conditions expérimentales : n = 4 pour chaque condition. La boîte à moustaches représente la médiane (barre horizontale), l'IQR et les valeurs extrêmes (barres d'erreur). La comparaison statistique des groupes a été faite par le test de Wilcoxon, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Diminution de la prolifération des fibroblastes en présence de surnageant de HuMoSC

Une activation des fibroblastes avec du TGF-β et du FGF-2 a été nécessaire pour induire une plus forte prolifération cellulaire qu'avec du TGF-β seul. Après 5 jours de culture avec du surnageant de HuMoSC, la prolifération des fibroblastes a été diminuée d'un facteur 2 (figure 36).

Ces résultats montrent que le surnageant de HuMoSC est capable d'inhiber la vitesse de prolifération des fibroblastes activés.

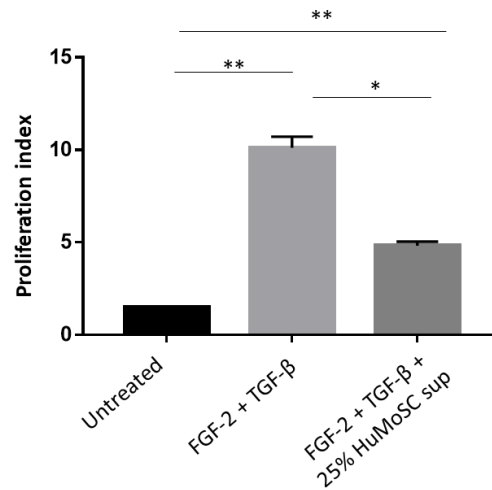


Figure 36 : Effet du surnageant de HuMoSC sur la prolifération des fibroblastes

La prolifération des fibroblastes a été mesurée par cytométrie en flux après 5 jours de culture. Les cellules ont été cultivées avec ou sans TGF-β1 (10 ng/mL) et FGF-2 (10 ng/mL), et avec ou sans 25 % de surnageant de HuMoSC.

Pour chaque condition, n=3. Les histogrammes présentent la moyenne ± SEM. La comparaison statistique des groupes a été faite par le test de Student apparié, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Modèle de fibrose induite *in vivo*

Introduction

Actuellement, la SSc est une maladie qui a été observée seulement chez l'homme. Des modèles murins mimant certains symptômes de la maladie ont néanmoins été développés. Bien que ces modèles *in vivo* permettent d'évaluer l'impact de traitements dans un système dynamique et complexe, ils ne permettent pas de reproduire la physiopathologie complète de la maladie. Parmi les modèles disponibles, il existe des modèles génétiques (*TSK 1* ou *2*), transgéniques (surexpression des gènes *Fos-related antigen-2* ou *TßRI* par exemple et inhibition de gènes comme *Fli-1*) et des modèles induits (injection de bléomycine, modèle de GVHD) (447).

Le modèle HOCl, choisi dans cette étude, fait partie de cette dernière catégorie de modèle. Il repose sur des injections intradermiques quotidiennes d'HOCl, à des souris femelles Balb/c. L'HOCl est un composé instable, générant des radicaux hydroxyles qui appartiennent aux ROS, dont l'implication dans la fibrogénèse a déjà été expliquée dans ce manuscrit. Contrairement à de nombreux modèles, celui-ci entraîne une atteinte systémique avec le développement d'une fibrose à la fois cutanée et pulmonaire, une atteinte vasculaire au niveau rénal ainsi que la production d'auto-Ac (366). Par ailleurs, il s'agit d'un modèle relativement bien caractérisé, présentant un coût raisonnable et rapide à mettre en place.

Matériel & Méthode

Préparation de l'HOCl

L'HOCl a été obtenu en ajoutant de l'hypochlorite de sodium (NaClO) (2,6 %) à une solution de phosphate de monopotassium (KH₂PO₄) (100 mM, pH : 7,2), selon un rapport de 1:60. L'absorbance de la solution HOCl a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop (ND1000 Labtech) à 292 nm et la densité optique était comprise entre 0,7 et 0,9. La solution KH₂PO₄ a été préparée à J0 et remplacée fréquemment. Les solutions de NaClO et de KH₂PO₄ ont été stockées à 4°C et dans l'obscurité.

Modèle animal

Ce projet a été approuvé par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale n°105 (APAFIS#34493-2021123010411869 v2) et le ministère français de l'Enseignement supérieur de la Recherche et de l'Innovation. Des souris BALB/cJrj femelles âgées de six semaines ont été fournies par *Janvier Labs* et hébergées au centre de zootechnie de Dijon.

Pour induire la fibrose, une quantité de 200 μ L de HOCl, quotidiennement préparée, a été injectée en bas du dos des souris, en sous cutané, avec une aiguille 30G (figure 37). Les poils ont été préalablement tondus et la peau nettoyée. Les injections ont eu lieu 5 jours par semaine pendant 6 semaines. Les injections étaient réalisées sur deux sites distincts mais proches (droite / gauche), en alternance.

A partir de J21, une quantité de 200 μ L de surnageant de HuMoSC a été injectée en sous cutané dans le milieu du dos des souris. Les injections ont été réalisées trois fois par semaine. Les souris témoins ont reçu du sérum physiologique dans les mêmes conditions.

Les animaux ont été sacrifiés à J42. Des biopsies cutanées (punch de 5 mm) ont été prélevées à la fois au niveau des sites d'injection de l'HOCl et également au niveau du site d'injection du traitement (sérum physiologique ou surnageant de HuMoSC). Les échantillons ont été stockés à -80°C dans du TRIzol avant RT-PCR ou fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 48h pour des colorations/marquages histologiques.

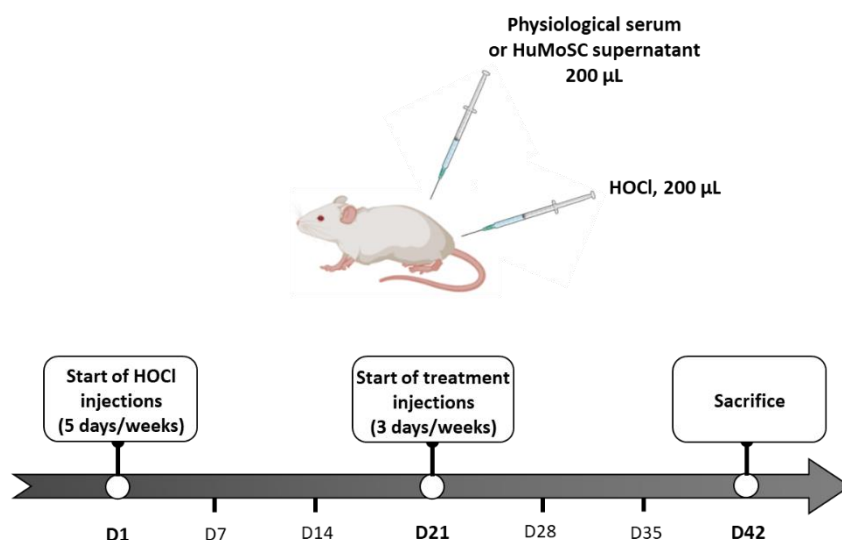


Figure 37 : Schéma expérimental du modèle HOCl *in vivo*

Mesure de l'épaisseur de la peau

L'épaisseur de la peau a été évaluée à l'aide d'un pied à coulisse micrométrique avant l'induction de la fibrose (J1) puis chaque semaine en aveugle par un expérimentateur.

RT-PCR

Ce protocole a été détaillé précédemment. Les amorces utilisées ici étaient : *COL1A1* (chaîne α 1 du collagène I), *FN1* (fibronectine) et *TGF β 1* (ThermoFisher).

Coloration histologique

L'inclusion en paraffine et la coupe des échantillons ont été confiées à la plateforme de microscopie CellimaP (Faculté de Médecine, Dijon). Les échantillons ont été déshydratés dans des bains d'alcools gradués, clarifiés dans du xylène et inclus dans de la paraffine. Des coupes transversales d'une épaisseur de 5 µm ont été réalisées. Le service d'anatomopathologie (CHU, Dijon) a coloré les coupes au Trichrome de Masson. L'analyse des lames a été réalisée en aveugle par un expert.

Résultats

Etude de la non-toxicité du surnageant de HuMoSC *in vivo*

Le poids des souris a été suivi toutes les semaines (figure 38A). La prise de poids continue et linéaire des souris suggérait que le modèle HOCl mis en place n'avait pas d'effet indésirable grave sur l'état général des animaux. De plus, la prise de poids des souris n'a pas été modifiée suite aux injections de surnageant de HuMoSC commencées à partir du 21^{ème} jour.

Aucune différence en termes de structure et d'épaisseur du derme n'a été observée après coloration au Trichrome de Masson des biopsies de peau réalisées dans la zone d'injection du sérum physiologique (figure 38B) ou du surnageant de HuMoSC (figure 38C). La préservation de l'intégrité des tissus suggère une absence de toxicité de la part du surnageant de HuMoSC.

L'expression relative du collagène et de la fibronectine a été déterminée par RT-PCR dans ces mêmes biopsies de peau (figures 38D et 38E). L'expression du collagène était comparable dans les deux groupes de souris (figure 38D). Concernant la fibronectine, son expression semblait augmentée en présence de surnageant de HuMoSC (figure 38E). Le taux d'expression moyen de fibronectine apparaissait trois fois plus important chez une souris traitée par surnageant de HuMoSC par rapport à une souris ayant reçu du sérum physiologique. Ce résultat ne semble donc pas confirmer les résultats obtenus *in vitro* mais l'analyse est limitée par le très faible nombre de souris analysées.

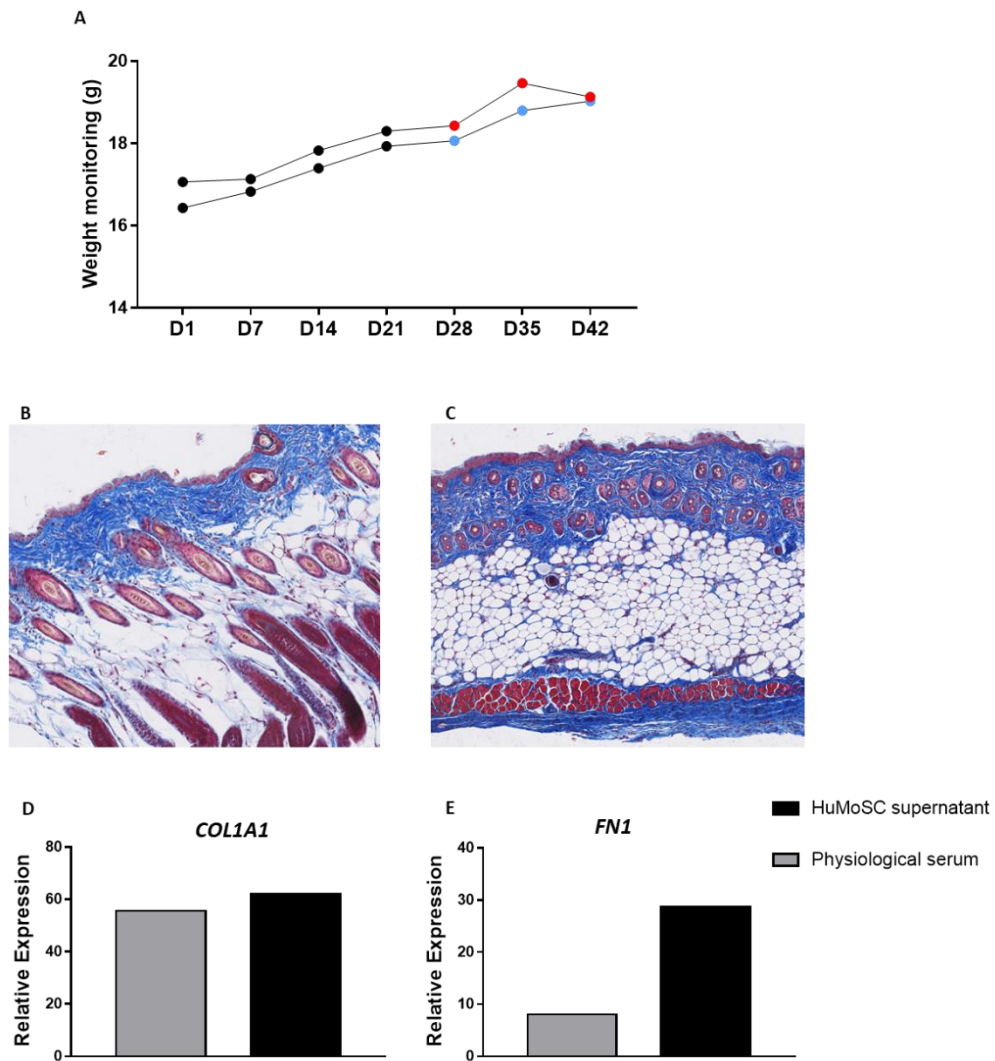


Figure 38 : Test de l'innocuité du surnageant de HuMoSC injecté

A : Suivi du poids des souris sur la durée du modèle HOCl. Jusqu'à J21, toutes les souris ont reçu de l'HOCl seul (points noirs). Après J21, les points colorés correspondent aux deux groupes de souris : celles traitées avec sérum physiologique (bleu) et les celles traitées avec surnageant de HuMoSC (rouge). Pour chaque mesure : n=3. **B-C** : Biopsies de peau à J42 dans les zones d'injection du sérum physiologique (B) et du surnageant de HuMoSC (C). Coloration au Trichrome de Masson. **D-E** : Expression relative de l'ARNm des protéines de l'ECM (*COL1A1*, *FN1*) dans la peau des souris. Les graphiques présentent la moyenne $\pm$ SEM, n=1 par groupe.

Efficacité du surnageant de HuMoSC sur la fibrose

L'épaisseur de la peau des souris a été mesurée au cours de l'étude afin de suivre l'évolution de la fibrose (figure 39A). L'épaisseur de la peau, au niveau des sites d'injection de l'HOCl, a significativement augmenté entre le 1^{er} jour et le 21^{ème} jour. L'introduction des injections de surnageant de HuMoSC ou de sérum physiologique coïncide avec l'infléchissement de la courbe de l'épaississement de la peau, qui s'est poursuivie jusqu'au dernier jour du modèle.

Au moment du sacrifice, une biopsie de peau a été réalisée dans les zones d'injection de l'HOCl chez toutes les souris (n=6), puis une coloration au Trichrome de Masson a été réalisée (figure 39B). Dans le groupe traité avec du sérum physiologique (haut), deux individus sur trois présentaient une fibrose caractérisée par un dépôt excessif de collagène (bleu) ainsi qu'une désorganisation et un épaississement du derme au dépend du tissu hypodermique. Les résultats obtenus dans le groupe de souris traitées avec du surnageant de HuMoSC (bas) étaient identiques au groupe traité par sérum physiologique, avec deux individus sur trois présentant une fibrose. Ces résultats pourraient invalider le modèle de fibrose mis en place. Cependant plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces observations. Elles seront développées dans la discussion.

Les ARNm du collagène, de la fibronectine et du TGF- β ont été quantifiés par RT-PCR dans les biopsies de peau (figures 39C-39E). Aucune différence d'expression n'était observable pour le collagène entre les deux groupes de souris (figure 39C). En revanche, l'expression de la fibronectine tend à augmenter avec les injections de surnageant de HuMoSC (figure 39D). Cette tendance concorde avec les observations faites précédemment où le taux d'expression de fibronectine semblait élevé dans les biopsies de peau réalisées dans les zones d'injection du surnageant de HuMoSC (figure 39E). L'expression du TGF- β relevée dans les biopsies de peau reste très faible, indépendamment du groupe de souris considéré (figure 39E). Ces résultats ne montrent pas d'effet bénéfique du surnageant de HuMoSC sur la fibrose induite par injection d'HOCl.

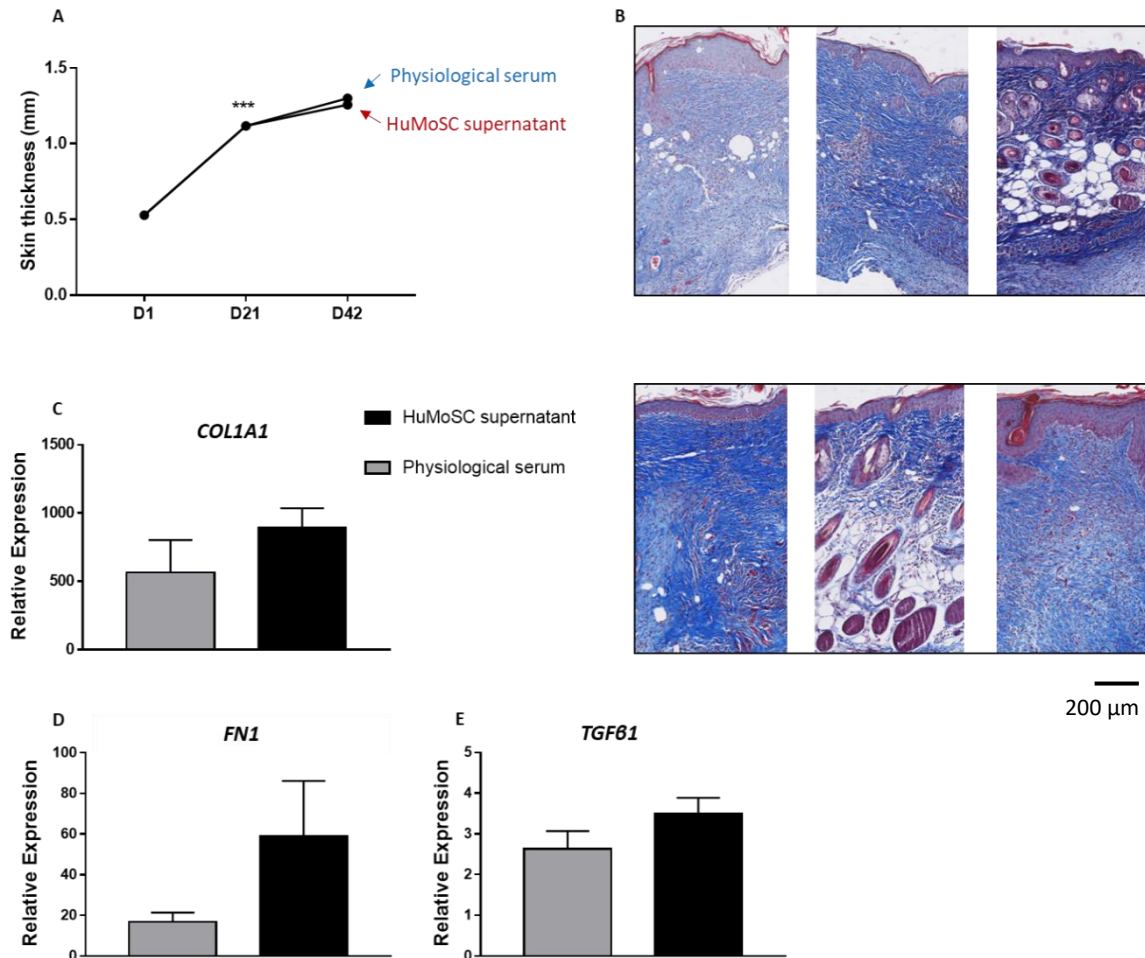


Figure 39 : Développement d'une fibrose cutanée et évaluation des propriétés anti-fibrosantes du surnageant de HuMoSC *in vivo*

A : Evolution de l'épaisseur de la peau des six souris avant et après traitement (J21) avec sérum physiologique (n=3) ou surnageant de HuMoSC (n=3). La comparaison statistique des groupes a été faite par le test de Student apparié, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. **B** : Coloration au Trichrome de Masson de coupes de peau à J42 chez des souris traitées par sérum physiologique (haut) et des souris traitées par surnageant de HuMoSC (bas) (n=3 par groupe). **C-E** : Expression relative de l'ARNm des protéines de l'ECM (*COL1A1*, *FN1*) et du *TGFβ1* dans la peau des souris. Les graphiques présentent la moyenne ± SEM, n=3 par groupe.

Mécanismes d'action des HuMoSC

Depuis le dépôt de brevet des HuMoSC en 2014, les travaux de l'équipe ont montré leur intérêt thérapeutique pour le traitement de pathologies comme la GVHD (153,154). Cependant, peu de données sont disponibles sur les modes d'action des HuMoSC. Certains mécanismes ont été élucidés sur le fonctionnement des cellules en elles-mêmes (cf chapitre I de ce manuscrit) mais, aucune investigation n'avait été menée concernant le mécanisme d'action du surnageant. Une meilleure compréhension de celui-ci permettrait d'ouvrir la voie à de nouveaux axes de recherche et d'envisager plus facilement un passage en clinique.

Au cours de l'étude s'intéressant à l'effet des HuMoSC pour le traitement de l'ACG, nos résultats ont montré que les HuMoSC et leur surnageant inhibait le complexe mTOR.

Dans cette partie, nous avons continué d'explorer plusieurs hypothèses. Tout d'abord, nous avons étudié l'influence de différentes variables intervenant au cours du processus de production des HuMoSC et leurs impacts sur les propriétés suppressives du surnageant.

Ensuite, nous avons tenté d'identifier les acteurs potentiellement responsables de la fonction suppressive du surnageant en explorant le rôle des VE et de certaines protéines.

Enfin, nous avons cherché à répondre à une problématique de conservation du surnageant dans l'optique d'un passage en clinique.

Paramètres impactant potentiellement le processus de production des HuMoSC

Introduction

Il existe une variabilité intrinsèque au niveau des concentrés leuco-plaquettaire utilisés dans le cadre de la génération des HuMoSC. Cette variabilité peut être en partie imputée aux différences intrinsèques des donneurs volontaires (génétiques et environnementales) mais aussi au protocole et à la durée du stockage des concentrés avant leur livraison au laboratoire. En effet, la quantité de monocytes isolés et mis en culture à J0 est très variable d'un concentré à l'autre. Les monocytes isolés lors du processus peuvent également être contaminés par d'autres types cellulaires persistants comme les lymphocytes ou les globules rouges, non éliminés par l'étape du Percoll. Par ailleurs, des cellules peuvent mourir durant le protocole et leur influence sur les monocytes cultivés n'a jamais été étudiée jusque-là.

A J7, le tri magnétique basé sur des billes anti-CD33 ne permet pas d'obtenir une population myéloïde pure. En effet, une petite fraction de lymphocytes exprime également ce marqueur (448). De plus, la quantité de globules rouges présente à J0 a également été identifiée dans la fraction CD33+ après tri, suggérant une fixation aspécifique. Le tri ne garantit pas non plus la sélection de cellules uniquement vivantes car des cellules mortes sont systématiquement retrouvées dans la fraction CD33+.

Nous avons cherché à savoir si chacune de ces variables pouvait influencer la capacité immunosuppressive des HuMoSC.

Matériel & Méthode

Nous avons suivi la génération de surnageant de HuMoSC à partir de huit concentrés leuco-plaquettaires. En cytométrie en flux, nous nous sommes focalisés sur l'étude de quatre facteurs, à savoir le pourcentage de monocytes purs et celui des cellules contaminantes que sont les lymphocytes et les globules rouges. L'impact potentiel du taux de cellules mortes a également été évalué. Ces variables ont été étudiées à J0 après Percoll et à J7 après tri. Elles ont ensuite été opposées aux résultats du test fonctionnel du surnageant de HuMoSC, et plus précisément, au pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT. Un test de corrélation de Spearman a été effectué. Les *r* et *P*-valeurs ont été représentés dans le corrélogramme ci-dessous. L'analyse a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 7 et sa représentation à l'aide du logiciel R (version 4.1.1) et le package ggplot2 (version 3.3.6).

Résultats

Notre étude n'a pas révélé l'existence d'une corrélation significative entre la contamination potentielle par des cellules indésirables et les résultats des tests fonctionnels des surnageants de HuMoSC (figure 40). Ainsi, le pourcentage de monocytes, lymphocytes, globules rouges et cellules vivantes ne semble pas avoir d'influence sur les propriétés suppressives des HuMoSC. Par conséquent, notre méthode de génération des HuMoSC est robuste et semble être peu impactée par les potentiels contaminants.

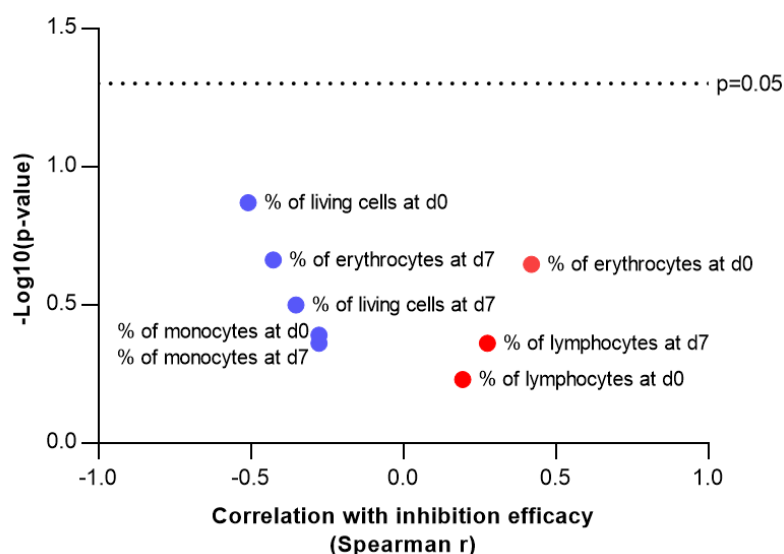


Figure 40 : Variables pouvant influencer les propriétés suppressives du surnageant de HuMoSC

Corrélation entre les variables « pourcentage de monocytes », « pourcentage de lymphocytes », « pourcentage de globules rouges », « pourcentage de cellules vivantes » et le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT de huit surnageants de HuMoSC issus de huit concentrés leuco-plaquettaire différents. La mesure des variables a été réalisée à J0 après Percoll et J7 après tri. Le test statistique utilisé était celui de Spearman. Les écarts sont considérés comme significatifs si $*P < 0,05$.

Rôle des VE

Introduction

Précédemment, nous avons discuté des fonctions immunosuppressives supportées par les VE, en particulier celles relarguées par les MDSC, et des propriétés anti-fibrosantes des VE issues des CSM (cf chapitre I de ce manuscrit). Ainsi, nous nous sommes intéressés aux VE produites par les HuMoSC, en émettant l'hypothèse que ces particules pourraient jouer un rôle dans l'activité suppressive du surnageant de HuMoSC.

Matériel & Méthode

Isolement des VE

Le surnageant de HuMoSC a été préparé selon le protocole décrit précédemment. Après l'étape du Percoll, des monocytes ont également été mis en culture dans du sérum physiologique pendant 24h afin de récupérer leur surnageant et d'isoler leur VE. Pour isoler les VE à partir des surnageants de culture de HuMoSC ou de monocytes, une série de centrifugations a été effectuée afin d'éliminer les

cellules et les débris. Une ultracentrifugation (UC) à 100 000 G pendant 70 min a ensuite été réalisée pour sédimenter les VE (Beckman, rotor Ti 50.4). Toutes les étapes ont été réalisées à 4°C. Après UC, le surnageant a été collecté et les VE ont été reprises dans du sérum physiologique préalablement filtré à 0,1 µM.

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

La concentration et la taille des particules ont été estimées par Nanosight NS300 dont le fonctionnement repose sur l'analyse de la trajectoire des VE dans une solution statique (mouvement brownien). Tous les échantillons ont été dilués dans du sérum physiologique (préalablement filtré à 0,1 µM) avant utilisation. La concentration idéale des échantillons était obtenue lorsque 20 à 140 particules par image étaient détectées. Le niveau de la caméra et le seuil de détection ont été ajustés jusqu'à ce que toutes les particules soient distinctement visibles. La température était fixée à 22°C. Pour chaque mesure, cinq vidéos d'une minute ont été enregistrées. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel intégré du NanoSight.

Microscopie électronique à transmission (MET)

La morphologie des VE issues des HuMoSC a été observée par coloration négative. Cette technique a été réalisée par la plateforme de microscopie DIImaCell (INRAE, Dijon). Brièvement, les échantillons (20 µL) ont été déposés sur des grilles pré-coatées et incubés pendant 10 à 20 min, à 4°C. Les grilles ont ensuite été colorées en utilisant 2% d'UranylLess (pH 7) dans de l'eau pendant 5 min et lavées avec de l'eau distillée filtrée pendant 5 min également. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (HITACHI HT7800) réglé à 100 kV et équipé de caméras AMT (AMT, Woburn, USA).

Test fonctionnel

Des PBMC ont été marquées au CellTrace Violet (Fisher) et la stimulation des LT a été réalisée par des billes CD3 / CD28 (Invitrogen). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 5 jours, volume à volume avec du sérum physiologique (contrôle), du surnageant de culture des HuMoSC « originel », du surnageant de culture de HuMoSC dépourvu de VE après UC ou de VE purifiées et diluées dans du sérum physiologique. La concentration des VE purifiées a été calculée pour être équivalente à la quantité de VE présentes dans le surnageant de HuMoSC originel. La prolifération des cellules a été mesurée par cytométrie en flux (Attune NxT) et les données ont été analysées avec le logiciel ModFit.

Résultats

Caractérisation

Nous avons caractérisé les VE par NTA (figure 41A). Après UC, la concentration des VE a été analysée dans le surnageant et le culot. En moyenne, $2,17 \times 10^9$ particules/mL ont été mesurées dans la fraction VE contre $1,90 \times 10^7$ particules/mL dans le surnageant. Ainsi, la méthode d'isolement mise en place a permis d'obtenir un rendement de 99%. Les VE présentaient une taille moyenne de 182 nm, ce qui correspondait aux données de la littérature (449). Les images de MET ont permis d'apprécier la forme ronde typique des VE (figure 41B).

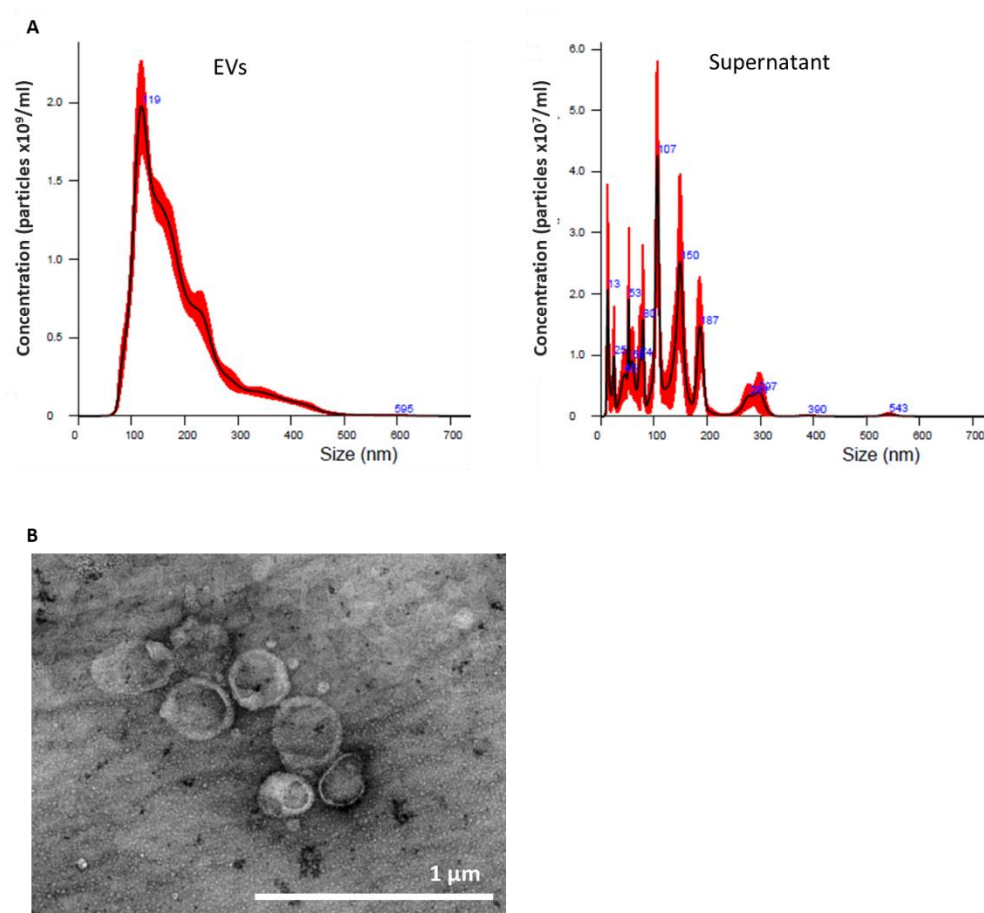


Figure 41 : Isolement et caractérisation des VE issues des HuMoSC

A : Concentration et taille des VE obtenues dans la fraction sédimentée « VE » (gauche) et le surnageant (droite) après UC. Paramètres déterminés par NTA. **B** : VE fraîches observées au MET.

Fonctions

De manière intéressante, la quantité de VE estimée par NTA était presque 14 fois plus importante dans le surnageant de HuMoSC, comparé au surnageant de monocytes (figure 42A).

Fort de ces premiers résultats, nous avons évalué la capacité immunosuppressive des VE de HuMoSC purifiées. Pour cela, la prolifération des LT a été évaluée par cytométrie. Nous avons observé que les

VE étaient capables de bloquer la prolifération des LT. L'effet suppresseur des VE de HuMoSC était dépendant de leur concentration (figure 42B).

Nous avons donc cherché à déterminer le rôle des VE dans les propriétés suppressives du surnageant de HuMoSC. Le surnageant originel de HuMoSC inhibait à 97% la prolifération des LT, comme attendu (figure 42C). Malgré la très faible concentration en VE résiduelles, le surnageant de HuMoSC après UC conservait ses propriétés suppressives. En revanche, le pourcentage d'inhibition des LT avoisinait les 25% avec les VE purifiées et diluées à la même concentration que celle dans le surnageant de HuMoSC original.

Ces résultats suggèrent que l'effet immunosuppresseur du surnageant de HuMoSC reposerait en majorité sur des facteurs solubles.

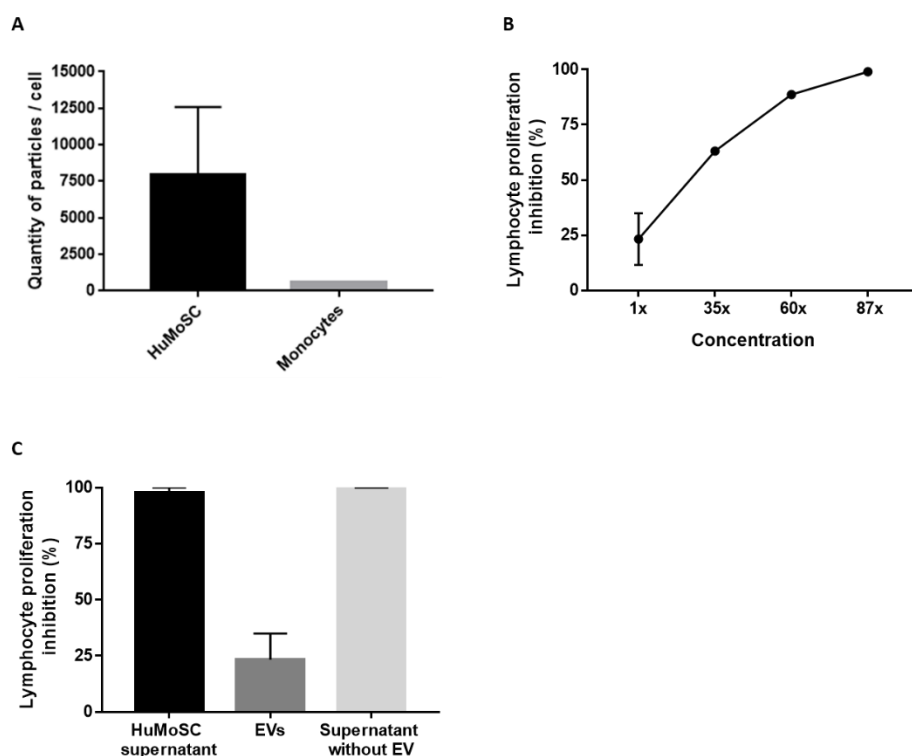


Figure 42 : Evaluation du potentiel suppresseur des VE

A : Comparaison de la quantité de VE produites par les HuMoSC (n=3) par rapport aux monocytes (n=1), évaluée par NTA. **B** : Inhibition de la prolifération des LT par les VE. Les PBMC ont été incubées avec une quantité croissante de particules, jusqu' à 87 fois la dose retrouvée dans le surnageant de HuMoSC originel. Pour chaque condition n=1, sauf pour la dose 1x où n=2. **C** : Inhibition de la prolifération des LT induite par le surnageant de HuMoSC originel (n=3), les VE de HuMoSC purifiées (n=2) et le surnageant de HuMoSC après UC dépourvu de VE (n=3). Les conditions « surnageant de HuMoSC » et « VE » comptaient une quantité équivalente de VE.

Identification et rôles des facteurs solubles

Introduction

Nous avons précédemment montré que les VE ne pouvaient pas, en tout cas à elles seules, être à l'origine de l'effet suppresseur du surnageant de HuMoSC. Au vu des résultats précédents, et en particulier de la conservation des propriétés du surnageant dépourvues de VE après UC, nous avons envisagé que le potentiel suppresseur pouvait davantage provenir de facteurs solubles présents dans le surnageant. Nous avons donc cherché à identifier puis à quantifier ces facteurs, et plus précisément les protéines, avant d'évaluer leur rôle.

Matériel & Méthode

Extraction de l'ARN

Les monocytes ont été isolés magnétiquement à partir de 8 volontaires sains (EFS Bourgogne Franche-Comté) à l'aide de microbilles CD14 et par Automacs (Miltenyi Biotec). Pour 4 échantillons, la moitié des monocytes isolés a directement été utilisée pour l'extraction de l'ARN et l'autre moitié a été utilisée pour la génération de HuMoSC, comme décrit précédemment, avant l'isolement de l'ARN. L'ARN a été isolé à l'aide du mini kit RNeasy (Qiagen). La concentration de l'ARN a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) puis stocké à -80°C.

Analyse transcriptomique

L'analyse des puces à ADN (MicroArray) a été réalisée par la plateforme GENOM'IC (Institut Cochin, Paris). Après réception des échantillons d'ARN, la validation de la qualité de l'ARN a été réalisée avec le Bioanalyzer 2100 (en utilisant le kit de puces Agilent RNA6000 nano). Cent nanogrammes d'ARN ont été rétrotranscrits à l'aide du kit GeneChip® WT Plus (Affymetrix). En bref, l'ADNc double brin obtenu a été utilisé pour la transcription *in vitro* avec l'ARN polymérase T7 (toutes ces étapes ont été incluses dans le kit de synthèse et d'amplification d'ADNc WT d'Affymetrix). Après purification selon le protocole Affymetrix, 5,5 ug d'ADN sens cibles ont été fragmentés et marqués à la biotine. Après contrôle de la fragmentation à l'aide du Bioanalyzer 2100, l'ADNc a ensuite été hybridé sur puce (GeneChip® Human Gene 2.0 ST, Affymetrix) à 45°C pendant 17 heures.

Après une nuit d'hybridation, les puces ont été lavées à l'aide de la station fluidique FS450 suivant des protocoles établis (Affymetrix) et scannées à l'aide du scanner GCS3000 7G. Les images numérisées ont ensuite été analysées pour obtenir des données brutes (fichiers cel) et des mesures pour les contrôles de qualité. Enfin, la correction et la normalisation des données ont été réalisées par la méthode Robust Multichip Average (RMA) à l'aide du logiciel Expression Console d'Affymetrix. La

matrice normalisée a été analysée à l'aide du pipeline du logiciel BIOMEX (Taverna et al, Nucleic Acids Res, 2020, PMID 32392297) et l'expression des gènes (Fold Change) entre les monocytes et les HuMoSC a été transformée en log.

Analyse protéomique

La composition protéique du surnageant de HuMoSC a été comparée au surnageant de monocyte produit comme décrit précédemment. Les échantillons ont été congelés à -20°C et transférés à la Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO). Les échantillons ont été concentrés sur filtre de masse de 3 kDa puis migrés sur un gel. Les bandes de gel ont ensuite été digérées et des analyses LC-MS/MS ont été réalisées sur les protéines digérées (400 ng de peptides) à l'aide du système NanoLC-Ultra (nano2DUltra, Eksigent, Les Ulis, France) connecté à un spectromètre de masse Q-Exactive (Thermo Electron, Waltham, MA, États-Unis). L'identification des peptides et des protéines a été réalisée avec le logiciel X!Tandem (version Alanine 2017.2.01), en utilisant le génome humain (uniprotKb_H_sapiens_181105) et une base de données personnelle. L'inférence protéique a été réalisée à l'aide du pipeline X!Tandem avec les paramètres suivants : au moins deux peptides par protéine, e-valeur du peptide <0,01, e-valeur de la protéine <10⁻⁵. Le taux de faux positifs (FDR) a été estimé à 0,57 % pour les peptides et 0 % pour les protéines. Les protéines représentées par au moins deux peptides reproductibles et cohérents ont été quantifiées en additionnant leurs intensités, afin de mesurer leur abondance relative. L'abondance des protéines (*Fold Change*) entre les monocytes et les HuMoSC a été transformée en log. Seules les protéines exemptes de contamination par l'albumine sérique bovine ont été prises en compte pour l'analyse.

Intégration transcriptome/sécrétome

La base de données UniProtKB (uniprot.org) a été utilisée pour déterminer la correspondance entre les gènes mesurés en transcriptomique et les protéines mesurées en protéomique ainsi que la localisation subcellulaire de chaque protéine. Seuls les gènes codant des protéines désignées comme secrétées dans UniProtKB étaient considérés par la suite. Les données de transcriptomique et de protéomique ont été appariées suivant cette correspondance et les *Fold Change* ont été comparés entre les monocytes et les HuMoSC en termes d'expression génique et d'abondance relative des protéines.

Quantification protéique

Les concentrations absolues de chitinase-3-like-1, glycoprotéine NMB (GPNMB) et IL-1RA ont été mesurées dans le surnageant de HuMoSC par Luminex® (R&D Systems, Bio-Techne), conformément aux instructions du fabricant. Les données ont été acquises et analysées sur un système Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, France). Les concentrations de calréticuline et de cathepsine L ont été mesurées dans le

surnageant de HuMoSC par ELISA (EH63RB, invitrogen et BMS257, invitrogen, respectivement). Les instructions du fabricant ont été scrupuleusement suivies. Les données ont été acquises sur spectrophotomètre (TECAN SPARK).

Test fonctionnel

Des PBMC ont été marqués au CellTrace Violet (Fisher) et la stimulation des LT a été réalisée par des billes CD3 / CD28 (Invitrogen). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 5 jours avec 50% de sérum physiologique (contrôle), de surnageant de HuMoSC, ou des protéines d'intérêt testées individuellement ou ensemble : cathepsine L à 11.7 ng/mL, GPNMB à 2.7 ng/mL, IL-1RA à 9.1 ng/mL, chitinase-3-like-1 à 5.04 ng/mL et calréticuline à 1.3 ng/mL. La prolifération des cellules a été mesurée par cytométrie en flux (Attune NxT) et les données ont été analysées avec le logiciel ModFit.

Analyse statistique

Le graphique FC-FC a été réalisé en utilisant RStudio (v2022.02.3) et ggplot2 package (v3.3.6). Les données quantitatives ont été exprimées en moyenne $\pm$ SEM. Les données ont été analysées sur le logiciel GraphPad Prism 7. Le test statistique utilisé était un test non paramétrique de Wilcoxon. Les valeurs de $P < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier les protéines sécrétées par les HuMoSC. Pour cela, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur les HuMoSC et les monocytes et une analyse protéomique sur le surnageant ces deux types cellulaires. L'ensemble des résultats de transcriptomique et de protéomique ont été intégrés (figure 43A). L'intégration entre l'expression génique et l'abondance protéique relative a permis de mettre en évidence cinq candidats surexprimés par les HuMoSC par rapport aux monocytes et dont les protéines correspondantes étaient augmentées dans les surnageants de HuMoSC comparé à ceux des monocytes. Il s'agit des couples gènes/protéines : *CTSL*/Cathepsine L, *GPNMB*/GPNMB, *IL1RN*/IL-1RA, *CHI3L1*/chitinase-3-like-1 et *CALR*/calréticuline.

La quantification absolue de ces cinq candidats a ensuite été réalisée par Luminex et ELISA dans le surnageant de HuMoSC (figure 43B). La calréticuline présente dans le surnageant de HuMoSC ne dépassait pas la limite de détection du kit ELISA. La valeur du seuil de détection a donc été renseignée.

Dans un dernier temps, nous avons évalué le rôle de ces cinq candidats dans le potentiel suppresseur du surnageant de HuMoSC (figure 43C). Pour cela, les protéines ont été mises en présence de PBMC, selon leur concentration absolue précédemment déterminée, et la prolifération lymphocytaire a été

mesurée par cytométrie en flux. De manière intéressante, en présence de chaque protéine individuellement, la stimulation des LT restait très forte, dépassant même la stimulation induite par les billes CD3/CD28 seules. En revanche, le pool de ces cinq protéines diminuait systématiquement la prolifération lymphocytaire T comparée aux protéines individuelles, sans toutefois atteindre la diminution induite par le surnageant de HuMoSC.

Ces résultats suggèrent que ces protéines surexprimées et sécrétées par les HuMoSC, jouent un rôle dans les fonctions suppressives du surnageant de HuMoSC mais uniquement sous forme d'un pool et pas individuellement.

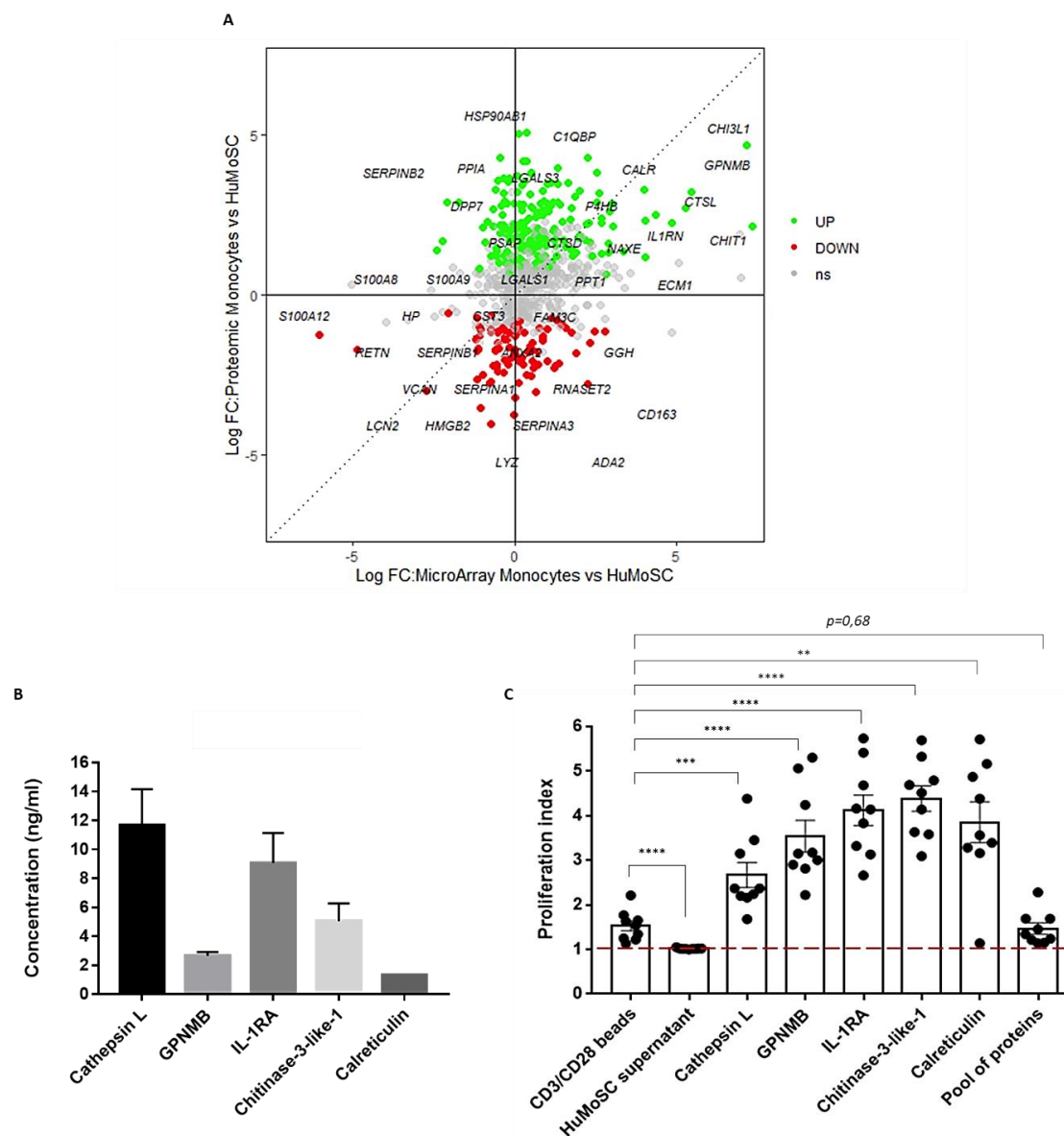


Figure 43 : Identification et rôle des facteurs solubles dans le surnageant de HuMoSC

A : Graphique *Fold Change-Fold Change* comparant les résultats de l'analyse protéomique entre les monocytes et les HuMoSC (axe des ordonnées) et les résultats de l'analyse transcriptomique entre ces deux mêmes groupes (axe des abscisses). Les gènes les plus exprimés dans les HuMoSC apparaissent en vert, alors que les gènes davantage exprimés dans les monocytes apparaissent en rouge. Les protéines davantage mesurées dans le surnageant des HuMoSC apparaissent en haut du graphique, tandis que les protéines davantage abondantes dans les surnageants de monocytes apparaissent en bas.

B : Quantification absolue des cinq protéines principales identifiées dans le surnageant de HuMoSC. Conditions expérimentales : cathepsine L (n=23), GPNMB (n=3), IL-1RA (n=3), chitinase-3-like-1 (n=27) et calréticuline (n=27). Les concentrations de la chitinase-3-like-1, de l'IL-1RA et de GPNMB ont été évaluées par Luminex tandis que les concentrations de calréticuline et de cathepsine L ont été évaluées par ELISA.

C : Index de prolifération des LT, étudié par cytométrie en flux, après 5 jours de culture. Les PBMC ont été stimulées avec des billes CD3/CD28. Les cinq protéines d'intérêt ont été testées individuellement ou ensemble sur les PBMC stimulées et leur effet a été comparé à celui induit par le surnageant de HuMoSC. Pour chaque condition, n=9. Le trait rouge correspond à l'index de prolifération des LT non stimulés et fixé à 1. La comparaison statistique des groupes a été faite par le test de Wilcoxon, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Abréviations : CTSL = gène cathepsine L, GPNMB = gène glycoprotéine NMB, IL1RN = gène IL-1RA, CHI3L1 = gène chitinase-3-like-1 et CALR = gène calréticuline.

Conservation du surnageant

Dans un contexte clinique, la cryopréservation des produits permet un accès rapide au traitement. Nous avons donc évalué si le surnageant de HuMoSC conservait ses fonctions suppressives après congélation. La durée de stockage du surnageant a été évaluée après 6 mois de conservation à -20°C.

Le test fonctionnel réalisé sur surnageant frais révélait une capacité d'inhibition de la prolifération lymphocytaire de 95,4% (figure 44). Ce pourcentage était équivalent après 6 mois de stockage à -20°C, suggérant qu'une longue congélation n'altérerait pas la qualité du surnageant de HuMoSC puisque ses propriétés suppressives étaient conservées.

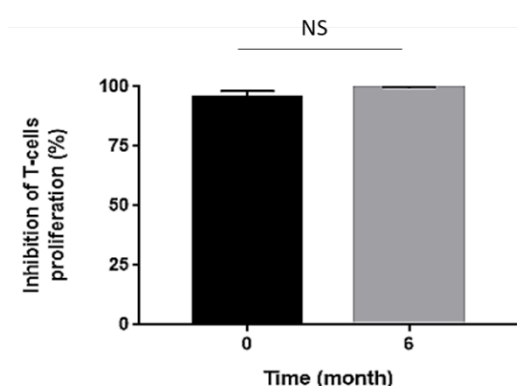


Figure 44 : Evaluation des propriétés suppressives du surnageant de HuMoSC conservé 6 mois à -20°C

Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT évalué par cytométrie en flux. Conditions expérimentales : n=17 surnageants testés initialement et n= 10 après 6 mois de conservation à -20°C.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'est intéressé aux thérapies cellulaires d'origine myéloïde dans le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes, et en particulier aux HuMoSC, que notre équipe a développées et brevetées en 2014 (153).

Des travaux antérieurs avaient mis en évidence les propriétés immunosuppressives de ces cellules et de leur surnageant. Nos récents travaux ont montré que l'activité des HuMoSC et de leur surnageant ne se limitait pas au contrôle de l'inflammation mais qu'ils pouvaient également agir sur le remodelage tissulaire, notamment dans le contexte de l'ACG. Ces résultats nous ont finalement conduits à étudier l'effet du surnageant des HuMoSC dans un contexte de fibrose, comme dans la SSc. Bien que préliminaires, ces données encourageantes sur la diminution de la fibrose renforcent le potentiel thérapeutique des HuMoSC et ouvrent de nouvelles perspectives expérimentales et peut être thérapeutiques.

Sur un plan plus fondamental, nos travaux ont montré la robustesse de notre protocole de génération des HuMoSC et ont permis d'étayer nos connaissances sur les mécanismes d'action du surnageant de HuMoSC et son potentiel de conservation en vue de son utilisation en clinique.

Intérêt des HuMoSC dans l'inflammation et le remodelage tissulaire

Nos résultats ont montré que les HuMoSC, ou leur surnageant, exerçaient une activité anti-inflammatoire en diminuant à la fois la polarisation Th1 et Th17 *in vitro* et également en diminuant l'expression des gènes impliqués dans le recrutement et l'activation des cellules immunitaires au niveau vasculaire.

Dans notre modèle d'artère temporale cultivée *ex vivo*, nous avons également montré que les HuMoSC et leur surnageant diminuaient l'expression des protéines matricielles, en particulier du collagène et de la fibronectine, et des médiateurs impliqués dans le remodelage vasculaire comme le VEGF (196). Le surnageant contrôlait également la migration et la prolifération des CML en culture.

Ces résultats nous ont conduit à étudier l'effet du surnageant de HuMoSC sur la fibrose comme celle décrite dans la SSc et pour laquelle il n'existe actuellement pas de traitement efficace. Dans un modèle basé sur une activation *in vitro* de fibroblastes dermiques par du TGF- β , nous avons montré que le surnageant de HuMoSC diminuait l'expression des protéines matricielles (collagène, fibronectine) et des médiateurs impliqués dans l'induction et le maintien de la fibrose (ET-1, CTGF). Sur un modèle de fibrose déjà installée, le surnageant de HuMoSC présentait des résultats encourageants avec une diminution des marqueurs fibrotiques, suggérant qu'il serait capable de faire régresser la fibrose après son installation. La prolifération des fibroblastes/myofibroblastes était également diminuée en

présence du surnageant. Il semblerait intéressant d'identifier les mécanismes anti-fibrosants des HuMoSC, et en particulier d'étudier l'effet du surnageant sur la voie du TGF- β . Comme décrit précédemment, le TGF- β agit sur une multitude de voies de signalisation mais l'engagement de la voie T β R-smad2/3 est la principale dans la fibrose (380).

In vivo, les résultats obtenus sont préliminaires et ne nous permettent pas de conclure sur l'innocuité et le rôle anti-fibrosant du surnageant de HuMoSC dans le modèle HOCl.

Il n'y avait pas de corrélation entre les expressions relatives de collagène et de fibronectine, et la fibrose observée dans les biopsies cutanées (tableau 3). En effet, les deux souris sans fibrose apparente présentaient des valeurs intermédiaires en termes d'expression des ARNm du collagène par rapport aux autres souris de leur groupe respectif. Dans le groupe traité par sérum physiologique, la souris sans fibrose apparente présentait également une expression intermédiaire d'ARNm de fibronectine par rapport aux deux autres souris de ce même groupe. Ces observations nous amènent à penser que l'ensemble des six souris de l'expérimentation présentait une fibrose mais que les biopsies ont été réalisées trop à distance de la zone d'injection d'HOCl pour deux d'entre elles. Une nouvelle étude est indispensable pour répondre à la question de l'effet du surnageant de HuMoSC sur un modèle de fibrose induite par HOCl.

	Score fibrose	COL1A1	FN1
Groupe sérum physiologique	+	1012,6	25,7
	+	207,1	10,2
	-	482,3	14,5
Groupe surnageant HuMoSC	+	1085,3	48,6
	-	978,1	18,6
	+	619	110,2

Tableau 3 : Corrélation entre la fibrose cutanée et l'expression relative des protéines matricielles

Le tableau fait apparaître le détail des six souris, n=3 par groupe. La fibrose a été observée sur des biopsies de peau réalisées au niveau des sites d'injection de l'HOCl et colorées au Trichrome de Masson. Les expressions relatives du collagène et de la fibronectine ont été déterminées sur ces mêmes biopsies, par RT-PCR.

Nos résultats montraient également une tendance à l'augmentation de l'expression de la fibronectine en présence de surnageant. Dans le cas où cette tendance serait confirmée, cela représenterait un frein à l'utilisation du surnageant de HuMoSC dans le traitement de la fibrose. Cependant un manque

de puissance statistique ne nous permet pas de conclure sur ce point précis. Ce résultat doit être vérifié sur un nombre d'individus plus important.

Une nouvelle étude est envisagée afin de renforcer nos premiers résultats. En plus d'augmenter le nombre d'individus par groupe, nous allons ajouter deux groupes contrôles. Le premier avec des injections de surnageant de HuMoSC seul (sans injection d'HOCl) et le second avec des injections d'HOCl seul (sans traitement). La posologie du surnageant de HuMoSC pourrait également être révisée avec une injection plus précoce afin de vérifier son rôle dans la fibrogénèse.

Dans cette nouvelle étude, d'autres analyses seront réalisées, comme un dosage du collagène dans le tissu cutané et un marquage des myofibroblastes (α -SMA+). Le modèle HOCl étant également responsable d'une fibrose pulmonaire, nous pourrions étudier l'effet anti-fibrosant du surnageant à l'échelle systémique. Enfin, le potentiel immunosuppresseur du surnageant de HuMoSC a été évalué uniquement dans un modèle de GVHD *in vivo*. Dans notre prochaine expérimentation, le rôle du surnageant de HuMoSC dans la résolution de l'inflammation induite par l'HOCl pourra faire l'objet d'une étude complémentaire.

Dans le modèle HOCl, la fibrose induite ne dépend pas directement du TGF- β . Dans l'étude d'Alexandre T. J. Maria, comme dans notre étude, les injections d'HOCl entraînaient une faible production de TGF- β (297). A l'inverse, dans notre modèle de culture de fibroblastes *ex vivo*, la fibrose reposait uniquement sur cet acteur moléculaire. Nous avons supposé que le surnageant de HuMoSC inhibait la fibrose *via* la voie du TGF- β , ce qui expliquerait qu'il n'ait pas d'effet sur le modèle *in vivo* utilisé. Nous pourrions envisager d'utiliser un autre modèle comme celui du T β RII Δ k, dans lequel T β R est surexprimé.

Mécanismes d'action du surnageant

Dans ce travail de thèse, nos résultats ont montré que les HuMoSC ou leur surnageant étaient capables de diminuer l'activité de mTOR. Cette enzyme de la famille des sérine/thréonine kinases est un acteur clé dans la régulation des processus physiologiques cellulaires comme la croissance et la prolifération. Il comprend deux complexes multiprotéiques, le complexe mTOR 1 (mTORC1) et le complexe mTOR 2 (mTORC2) (450). L'activation de mTOR est impliquée dans de nombreuses maladies incluant les pathologies inflammatoires et fibrosantes (435). Ainsi, les fibroblastes dermiques de patients atteints de SSc présentent une hyperactivité de la signalisation PI3K/Akt et mTOR (451).

En conséquence, une étude a rapporté que la rapamycine (inhibiteur mTOR) prévenait la fibrose dans deux modèles murins de sclérose, l'une induite par la bléomycine, l'autre par une mutation génétique

(TSK) (452). En particulier, l'inhibition de mTOR diminuait la prolifération des fibroblastes/myofibroblastes, le taux de collagène, de TGF- β , d'IL-4, d'IL-6 et d'IL-17 et limitait l'infiltration de cellules immunitaires dans la peau et les poumons des souris. *In vitro* et *in vivo*, Liang *et al.* ont montré qu'une double inhibition de PI3K/Akt et mTOR était nécessaire pour atténuer la fibrose dermique dans un modèle de fibrose pré-établie. L'inhibition de mTOR seule était insuffisante (451).

Un essai clinique de phase I/II a été mené afin de déterminer l'innocuité de la rapamycine chez les patients atteints d'une forme diffuse de SSc. Ses effets ont été analysés sur dix-sept patients, après quarante-huit semaines de traitement et ont été comparés à un autre groupe de patients traités par MTX. Aucun effet indésirable grave n'avait été observé. De plus, le score clinique des patients n'a pas été modifié par rapport au début de l'étude, peu importe le groupe étudié (453).

Une nouvelle étude de phase II sur soixante-douze patients était prévue, mais son état d'avancement actuel est inconnu (NCT03365869).

Après avoir identifié mTOR comme une cible du surnageant de HuMoSC, nous avons étudié les acteurs par lesquels agissaient le surnageant. Les propriétés suppressives du surnageant suggèrent l'implication de mécanismes indépendants de tout contact cellulaire.

Nos résultats ont montré que les HuMoSC sécrétaient une quantité plus importante de VE en comparaison aux monocytes. Ces VE étaient responsables, au moins en partie, des propriétés immunosuppressives du surnageant de HuMoSC. Néanmoins, leur effet sur la prolifération lymphocytaire était modéré. Les VE issues des HuMoSC ne ciblent peut-être pas les LT ou bien agissent sur d'autres voies de signalisation que celle conduisant à la prolifération. Dans cette étude, seul l'effet des VE sur la prolifération des LT a été étudié. Or, les capacités du surnageant de HuMoSC ne se restreignent pas uniquement à cela. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de ces VE sur la polarisation des LT et l'induction de lymphocytes Treg par exemple ou dans un autre contexte comme celui de la fibrose (83).

Dans une étude *in vitro* utilisant des fibroblastes dermiques humains stimulés avec du TGF- β 1, les auteurs ont montré qu'un traitement par IL-10 diminuait les niveaux d'expression des protéines matricielles collagène 1 et 3 ainsi que d' α -SMA. A l'inverse, l'IL-10 induisait une augmentation des niveaux d'expression de MMP1 et MMP8 (454). L'IL-10 inhibait également la production et l'activation du TGF- β dans les poumons de souris traitées avec de la bléomycine, atténuant ainsi la fibrose pulmonaire (455). Les premiers travaux de l'équipe ont mis en évidence la production d'IL-10 par les HuMoSC (153), suggérant que cette interleukine pourrait être impliquée dans les propriétés anti-fibrosantes des HuMoSC.

L'analyse comparant les profils transcriptomiques des HuMoSC et des monocytes a mis en lumière l'activation de voies impliquées dans le métabolisme (glycolyse), la voie du complément, la coagulation, la dégradation enzymatique (lysosome), la phagocytose et le cycle cellulaire. Nous nous sommes concentrés sur les acteurs moléculaires dont les gènes étaient surexprimés chez les HuMoSC par rapport aux monocytes et dont les protéines étaient également plus sécrétées par les HuMoSC comparément aux monocytes. La considération de ces deux paramètres nous a permis d'identifier cinq protéines candidates potentiellement impliquées dans les fonctions suppressives du surnageant de HuMoSC : la GPNMB, l'IL-1RA, la cathepsine L, la chitinase-3-like-1 et la calréticuline.

La GPNMB est une protéine transmembranaire exprimée à la surface de plusieurs types cellulaires comme les DC, les macrophages ou encore les MDSC. La protéine ADAM10 intervient dans le clivage de la forme membranaire pour permettre à la protéine GPNMB d'exister également sous une forme soluble (GPNMBs). La GPNMB est impliquée dans une grande diversité de mécanismes physiologiques comme l'adhérence, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (456). Une équipe a montré que la GPNMB était davantage exprimée par les macrophages anti-inflammatoire M2, plutôt que par les macrophages M1. Dans cette étude, la GPNMBs contrôlait les propriétés prolifératives et migratoires des CSM en se liant à leur récepteur CD44 (457).

La GPNMBs module également l'activité des acteurs impliqués dans l'immunité. Elle agit par l'intermédiaire de syndécan-4 exprimé entre autres à la surface des CPA et des cellules endothéliales. Il a notamment été montré que la GPNMBs diminuait les fonctions des LT, et en particulier leur recrutement sur les sites inflammatoires dans un modèle murin de dermatite (458).

Une expression aberrante de la GPNMB a été décrite dans de nombreuses pathologies, telles que des maladies neurodégénératives, des cancers ou encore des maladies auto-immunes. Une étude a montré que la GPNMBs diminuait de manière significative les marqueurs de fibrose dans les fibroblastes de patients atteints de SSc diffuse, y compris l'expression de COL1 et α -SMA. La prolifération et la capacité contractile des cellules étaient également diminuées. L'effet anti-fibrosant de la GPNMBs était associé au CD44 exprimé à la surface des fibroblastes (459).

L'IL-1RA est un antagoniste du récepteur à l'IL-1. Il rentre en compétition avec la liaison de l'IL-1 α et de l'IL-1 β à leur récepteur, afin de bloquer la signalisation intracellulaire conduisant ainsi à l'activation de facteurs pro-inflammatoires (460). L'IL1-RA (anakinra) est utilisé en thérapeutique humaine pour le traitement de certaines maladies auto-inflammatoires. L'IL-1RA était utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde mais l'est davantage aujourd'hui dans les maladies auto-inflammatoires associées à une hyperactivité de l'inflammasome conduisant à une surproduction d'IL-1 β , comme la maladie de Still, les cryopyrinopathies, la goutte. Récemment, une étude a montré que les M-MDSC inhibaient *in vitro* l'activation des LT *via* la sécrétion d'IL-1RA. En particulier, les auteurs ont observé

que l'IL-1RA produit par les M-MDSC, diminuait la prolifération des LT et leur production d'IFN- γ . Les e-MDSC, n'ayant pas d'effet immunosuppresseur, ne produisaient pas d'IL-1RA. De manière intéressante, la quantité d'IL1-RA dans les surnageants de culture des M-MDSC était similaire à celle mesurée dans les surnageants de HuMoSC : 6,5 ng/mL environ et 9,1 ng/mL, respectivement (461).

L'IL-1RA présente également un potentiel anti-fibrosant. Dans un modèle de fibrose induite par l'injection de bléomycine, les souris IL-1RA-KO étaient plus gravement affectées par une fibrose cutanée et pulmonaire, par rapport aux souris de type sauvage (462).

La cathepsine L est une enzyme lysosomale qui participe à de nombreux processus physiologiques, comme le remodelage de l'ECM. Cette caractéristique pourrait expliquer la diminution de l'expression de l'ARNm de la cathepsine L dans la peau des souris traitées par bléomycine. De même, chez les patients atteints de SSc, les taux sériques de cathepsine L sont inversement corrélés à la sclérose cutanée (463).

Dans un contexte inflammatoire, une augmentation de l'expression de la cathepsine L est fréquemment retrouvée. Une étude a montré qu'elle inhibait la prolifération des LT ovins et qu'elle diminuait également l'expression de CD4 à la surface des LT ovins et humains (464), suggérant un effet anti-inflammatoire. Cependant, des travaux récents ont rapporté un autre effet de la cathepsine L. Dans un modèle murin de lésions rénales aiguës, la cathepsine L jouait un rôle pro-inflammatoire en activant les macrophages M1 (465).

La chitinase-3-like-1 est une glycoprotéine qui contribuerait au développement et à la progression de la fibrose (466). Zhou *et al.* ont montré que cette protéine entraînait la prolifération des fibroblastes. De plus, l'ajout de chitinase-3-like-1 induisait une différenciation des fibroblastes caractérisée par l'expression d' α -SMA (467). Cette protéine favoriserait également l'inflammation. La dermatite atopique est une affection cutanée inflammatoire chronique caractérisée par une réponse immunitaire de type Th2. Dans un modèle murin de dermatite atopique, la chitinase-3-like-1 augmentait le taux de cytokines Th2 (468).

La calréticuline est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique, principalement connue pour son rôle dans l'homéostasie du calcium. Son rôle dans la fibrose est mal connu. Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, l'expression de la calréticuline était augmentée (469). Une autre étude a montré que la mutation du gène *CALR* codant la calréticuline était à l'origine de maladie comme la myélofibrose primaire (470).

Il serait intéressant de bloquer spécifiquement l'expression de ces protéines afin d'observer leurs effets dans le surnageant de HuMoSC et de comparer nos résultats à ceux déjà obtenus. A ce jour, il

n'existe pas d'Ac bloquant pour l'ensemble des cinq protéines identifiées. Nous envisageons d'autres approches comme le Crispr/Cas9.

Par ailleurs, dans un contexte donné, des interactions spécifiques entre ces protéines peuvent conduire à la modification de leurs propriétés individuelles. *In vivo*, une équipe a montré que la galectine-3 entraînait une augmentation du nombre de cellules épithéliales en apoptose et une forte fibrose, caractérisée par une prolifération intense des fibroblastes et la présence de macrophage M2 ainsi que de myofibroblastes. Cette étude a montré *in vitro* que la galectine-3 interagissait avec la chitinase-3-like-1. La liaison de la chitinase-3-like-1 sur son récepteur IL-13Ra2 et son corécepteur TMEM219 inhibait l'apoptose des cellules épithéliales. Par sa liaison à IL-13Ra2 seule, la galectine-3 abrogeait la signalisation anti-apoptotique induite par la chitinase-3-like-1 et favorisait la fibrose tissulaire *via* l'engagement de la voie Wnt (471).

Nous devons également envisager que les protéines ciblées ne soient pas les seules candidates responsables des effets inhibiteurs du surnageant de HuMoSC. L'analyse transcriptomique a été réalisée sur des HuMoSC cultivées dans du RPMI complet, tandis que l'analyse protéomique a été réalisée à partir de surnageants de cellules cultivées dans du sérum physiologique. Cette évolution dans notre protocole s'explique par une volonté d'adaptation de notre méthode pour un passage en clinique. Cela n'a pas modifié les propriétés suppressives du surnageant de HuMoSC (données non montrées). Néanmoins, il a été montré que le changement de milieu de culture modifiait l'expression de certains gènes et le sécrétome des cellules (472). Il serait donc intéressant d'approfondir les analyses de la protéomique afin d'identifier de nouvelles protéines potentiellement impliquées dans les fonctions suppressives du surnageant de HuMoSC. La figure ci-après présente les principales protéines différenciellement sécrétées par les HuMoSC, par rapport aux monocytes (figure 45). Nous nous sommes intéressés aux protéines les plus sécrétées par les HuMoSC. Parmi elles, nous avons identifié les galectines.

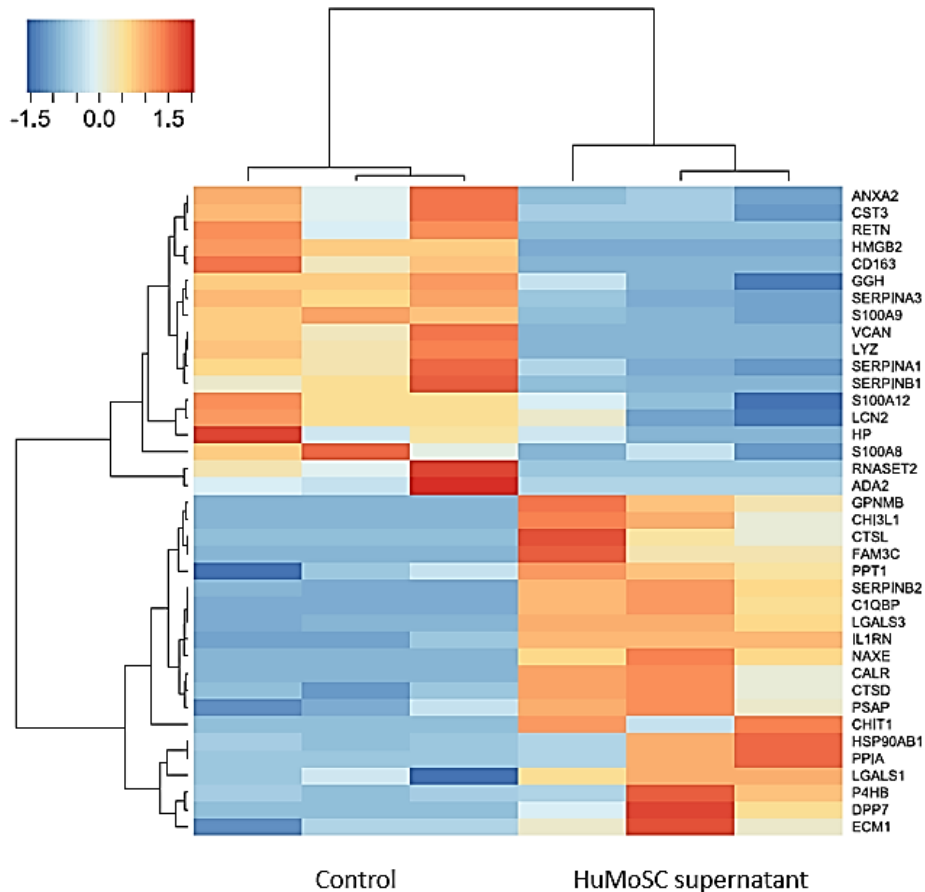


Figure 45 : Analyse protéomique de la composition du surnageant de HuMoSC par rapport à celui des monocytes

Représentation des résultats sous la forme d'une *heatmap* montrant des protéines sécrétées de manière différentielle entre les deux groupes. Les surnageants ont été produits soit par des monocytes, soit par des HuMoSC dérivées de ces monocytes, issus de trois volontaires sains.

Les galectines représentent une famille de protéines de liaison aux β -galactosides. Leur rôle immunosuppresseur a déjà été décrit dans la littérature. Les galectines sont notamment impliquées dans la fonction suppressive des MSC. En effet, la galectine-1 et la galectine-3 sont exprimées et sécrétées par les MSC. L'inhibition de l'expression des gènes de ces deux protéines levait l'effet suppresseur des MSC sur la prolifération lymphocytaire (473). Dans un modèle murin de GVHD, l'administration de galectine-1 augmentait la survie des animaux de 3 % à 68 % (474).

Bien que les galectines peuvent en partie expliquer les fonctions suppressives des HuMoSC, elles n'expliquent pas leurs propriétés anti-remodelage. L'expression de la galectine-1 et galectine-3 est globalement diminuée dans les lésions des patients atteints de SSc par rapport à des sujets sains (475). Le TGF- β pourrait être une cause de cette diminution (476). En revanche, les concentrations les plus

élevées en galectine-1 et galectine-3 chez les patients étaient positivement corrélées avec une forme sévère de SSc (475).

D'autres voies doivent être encore explorées pour essayer de mieux comprendre les mécanismes anti-inflammatoires du surnageant de HuMoSC. En effet, certains éléments lipidiques peuvent également jouer un rôle immunosuppresseur. Dans un modèle de souris déficientes pour les *high-density lipoproteins* (HDL) (*Apoa1^{tmc1Unc}*), la GVHD induite était moins sévère grâce à l'administration de HDL. Notamment, la perfusion de HDL avait atténué l'infiltration immunitaire au niveau hépatique ainsi que l'inflammation systémique (477).

Les miR sont également impliqués dans les fonctions suppressives des cellules, particulièrement pour les CSM (243,478). Ce sont des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes. Ils peuvent circuler soit par l'intermédiaire des VE, soit associés à d'autres facteurs comme la protéine argonaute 2, les HDL ou la protéine nucléophosmine 1 (NPM1) (479,480). Notre analyse protéomique a d'ailleurs mis en évidence une quantité significative de NPM1 dans le surnageant de HuMoSC, par rapport au surnageant de monocyte.

Evolution vers une utilisation en clinique

Le passage en clinique nécessite la standardisation de la méthode de production, en respectant les bonnes pratiques de fabrication (BPF) des médicaments expérimentaux à usage humain, décrites par la commission européenne. Actuellement, les cytokines IL-6 et GM-CSF utilisées ont déjà le grade BPF. En revanche, les billes magnétiques CD33+ n'ont pas encore ce grade. Le sérum physiologique, dans lequel sont incubées les HuMoSC avant récupération du surnageant, est un soluté largement utilisé en clinique et ne présente pas de contre-indication. En ce qui concerne le milieu de culture des HuMoSC lors de leur génération, le X-VIVO 15 (Lonza), celui-ci ne contient pas de produit animal comme le sérum de veau fœtal.

Les premières études sur les HuMoSC ont porté uniquement sur les capacités suppressives intrinsèques de ces cellules. Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à développer une approche thérapeutique alternative à l'utilisation des HuMoSC en tant que produit cellulaire. L'intérêt du surnageant de culture est finalement relativement récent, avec la mise en évidence des mêmes propriétés suppressives que celles observées en présence des cellules. Cliniquement, le recours au surnageant offre de nombreux avantages. D'abord, le développement de tumeurs potentiellement

malignes est un risque inhérent aux thérapies cellulaires et ne peut pas être écarté dans le cas de l'utilisation des HuMoSC.

Par ailleurs, le surnageant présenterait un risque immunologique moins important. En effet, la molécule HLA-DR est fortement exprimée à la surface des HuMoSC, ce qui nécessiterait un appariement entre donneurs et receveurs. Le surnageant permettrait de nous affranchir des contraintes liées à la recherche d'un donneur compatible. Nous pourrions également envisager de développer une médecine personnalisée dans laquelle une greffe autologue de HuMoSC serait réalisée, mais, en raison du faible rendement pour la production de HuMoSC, cette alternative demanderait un prélèvement sanguin trop important chez un patient déjà affaibli.

La mise en place d'une banque de surnageant de HuMoSC, généré à partir de différents donneurs, permettrait de répondre rapidement à un besoin clinique avec un produit « prêt à l'emploi ». En raison de la forte mortalité des monocytes à la décongélation (autour de 60%), les cellules sont congelées avant tri CD33+ afin d'obtenir un nombre correct de HuMoSC. L'utilisation des cellules en clinique nécessiterait donc du temps, un trieur et du personnel technique formé. De plus, les cellules ne pourraient pas répondre à un besoin urgent car, aujourd'hui, il est encore difficile de prévoir le rendement du tri.

Enfin, la pertinence du surnageant de HuMoSC en clinique repose également sur sa longue conservation, qui est au moins égale à six mois, sans que ses propriétés ne soient altérées. Lors de cette étude, le produit a été stocké dans un congélateur à -20°C. Les cellules sont quant à elles stockées à -80°C afin de préserver l'intégrité de leur structure, or ce type de congélateur est moins répandu et pourrait donc restreindre l'utilisation des HuMoSC.

Bien que présentant de nombreux avantages, le surnageant de HuMoSC reste néanmoins un outil thérapeutique complexe, pour lequel l'ensemble des mécanismes d'action ainsi que les cibles ne sont pas encore clairement identifiés. D'autres travaux seront nécessaires afin d'outre passer les limites rencontrées aujourd'hui pour envisager une mise sur le marché du médicament.

La principale limite rencontrée aujourd'hui est la faible fraction de HuMoSC générée avec notre protocole. Afin de pallier cela, nous avons émis l'hypothèse qu'un tri CD14+, à la place d'un tri CD33+, permettrait d'obtenir un plus grand nombre de cellules et donc de générer une quantité de surnageant bien plus importante. Les cellules CD14+ récoltées ont été appelées CD14+ HuMoSC. Ce protocole alternatif présentait de nombreux avantages. D'abord, il a permis d'obtenir en moyenne cinq fois plus de cellules qu'après un tri CD33+. De plus, le surnageant de ces cellules présentait des propriétés similaires à celui des HuMoSC originelles. En effet, *in vitro* il inhibait de façon similaire l'activation et la prolifération des LT effecteurs CD4+ et CD8+. *In vivo*, le surnageant de CD14+ HuMoSC apparaissait comme un outil thérapeutique intéressant dans la prévention de la GVHD (156). Enfin, l'existence de

billes magnétiques CD14+ de grade BPF facilitait son passage en clinique. Cependant, le surnageant CD14+ HuMoSC possédait des propriétés suppressives très variables (figure 46), le rendant difficile à utiliser en routine. La production de surnageants issus des CD14+ HuMoSC n'est donc pas encore maîtrisée et nécessite encore des mises au point pour obtenir un produit stable et efficace. C'est pourquoi, seul le surnageant CD33+ HuMoSC a été utilisé dans cette étude.

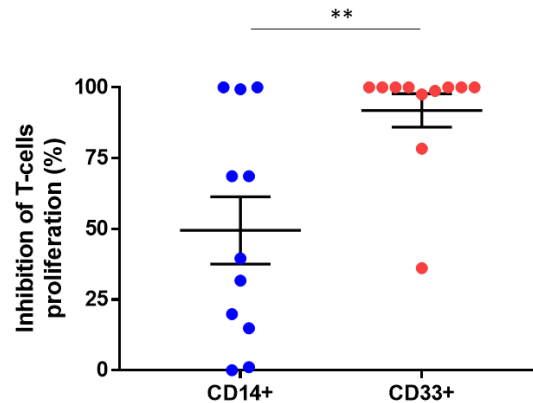


Figure 46 : Comparaison des fonctions suppressives du surnageant CD14+ HuMoSC et CD33+ HuMoSC

La prolifération des LT, préalablement marqués au CellTrace, a été étudiée par cytométrie en flux après cinq jours de culture avec du surnageant de HuMoSC. Les HuMoSC étaient issues d'un tri CD14 ou CD33.

Pour chaque condition, n=11. La moyenne $\pm$ SEM est représentée sur le graphique. La comparaison statistique des groupes a été faite par le test de Mann Whitney, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Les raisons de cette instabilité ne sont pas encore élucidées. Une des hypothèses émises repose sur une activation potentielle des cellules lors du tri CD14. Le récepteur CD14 est en effet une protéine de la membrane plasmique, principalement retrouvée à la surface des cellules de la lignée myéloïde. Il se lie à un large spectre de molécules, y compris les PAMP, les DAMP, l'acide lipotéichoïque, l'ADN et les phospholipides. Le CD14 est principalement décrit pour son rôle dans l'immunité innée. Après avoir reconnu le LPS bactérien extracellulaire, le CD14 s'associe au TLR4 et ce complexe initie deux voies de signalisation distinctes, l'une impliquant MyD88 et l'autre impliquant la voie endosomale. Ces deux voies conduisent à l'activation de gènes pro-inflammatoires (481). Bien que les instructions du fabricant ne soutiennent pas cette hypothèse, aucune donnée ne nous permet aujourd'hui de l'écarter définitivement.

Une autre hypothèse serait un niveau de sécrétion plus faible de facteurs immunosuppresseurs dans le surnageant CD14+ HuMoSC par rapport à celui des CD33+ HuMoSC. Les analyses doivent être poursuivies dans ce sens.

CONCLUSION

Ce projet de recherche translationnelle s'articulait autour de deux axes principaux :

- Evaluer l'intérêt thérapeutique des HuMoSC ou de leur surnageant sur le remodelage tissulaire et la fibrogénèse, à travers deux modèles distincts reprenant les principales caractéristiques de l'ACG et de la SSc
- Comprendre le fonctionnement du surnageant de HuMoSC

Nos travaux ont montré que les HuMoSC étaient capables de contrôler l'inflammation et surtout de diminuer le remodelage tissulaire. Ce mécanisme dépendrait, au moins en partie, d'une inhibition du complexe mTOR. Cette avancée permet d'une part, d'envisager les HuMoSC comme une alternative thérapeutique pour réduire les doses et la durée de la corticothérapie chez les patients atteints d'ACG et d'autre part, de répondre à l'absence de traitement anti-fibrosant efficace dans la SSc.

Bien que certains points restent à améliorer pour son utilisation en clinique, notre méthode de génération du surnageant de HuMoSC apparaît robuste et sa congélation à long terme n'altère pas ses propriétés biologiques. D'autres études seront nécessaires pour appréhender complètement la complexité des mécanismes de fonctionnement du surnageant de HuMoSC.

Néanmoins, ce travail de thèse a permis de mettre en lumière le rôle de certains acteurs dans l'activité immunosuppressive et anti-fibrosante du surnageant de HuMoSC, comme les VE ou les protéines GPNMBs et IL-1RA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Till JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* févr 1961;14:213-22.
2. Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* nov 1990;87(22):8736-40.
3. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* nov 2000;6(11):1229-34.
4. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 déc 2001;98(25):14541-6.
5. Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell.* 1 janv 2020;11(1):34-44.
6. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 12 déc 2008;135(6):1118-29.
7. Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Månsson R, Sigvardsson M, et al. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood.* 1 avr 2005;105(7):2717-23.
8. Busch K, Klapproth K, Barile M, Flossdorf M, Holland-Letz T, Schlenner SM, et al. Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. *Nature.* 26 févr 2015;518(7540):542-6.
9. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* nov 1994;1(8):661-73.
10. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene.* mai 2002;21(21):3295-313.
11. Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, et al. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell.* 8 janv 2010;6(1):48-58.
12. Pietras EM, Reynaud D, Kang YA, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, et al. Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. *Cell Stem Cell.* 2 juill 2015;17(1):35-46.
13. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature.* 10 avr 2014;508(7495):269-73.
14. Bhatia S, Robison LL, Francisco L, Carter A, Liu Y, Grant M, et al. Late mortality in survivors of autologous hematopoietic-cell transplantation: report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood.* 1 juin 2005;105(11):4215-22.
15. Lee JY, Hong SH. Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *Int J Stem Cells.* 31 déc 2019;13(1):1-12.
16. Müskens KF, Lindemans CA, Belderbos ME. Hematopoietic Dysfunction during Graft-Versus-Host Disease: A Self-Destructive Process? *Cells.* 10 août 2021;10(8):2051.

17. Gaziev J, Sodani P, Polchi P, Andreani M, Lucarelli G. Bone Marrow Transplantation in Adults with Thalassemia: Treatment and Long-Term Follow-Up. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054(1):196-205.
18. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JEJ, Ribeil JA, Hongeng S, et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *N Engl J Med.* 19 avr 2018;378(16):1479-93.
19. Biffi A, Montini E, Loricoli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science.* 23 août 2013;341(6148):1233158.
20. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med.* 21 janv 2021;384(3):252-60.
21. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 25 août 2006;126(4):663-76.
22. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 30 nov 2007;131(5):861-72.
23. Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, et al. Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nat Commun.* 6 juill 2020;11:3369.
24. Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, et al. Isolation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitors by Cell Sorting for Successful Transplantation. *Stem Cell Rep.* 6 mars 2014;2(3):337-50.
25. Takahashi J. iPSC cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial. *Regen Ther.* 15 sept 2020;13:18-22.
26. Schweitzer JS, Song B, Herrington TM, Park TY, Lee N, Ko S, et al. Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease. *N Engl J Med.* 14 mai 2020;382(20):1926-32.
27. Xian Y, Xie Y, Song B, Ou Z, Ouyang S, Xie Y, et al. The safety and effectiveness of genetically corrected iPSCs derived from β -thalassaemia patients in nonmyeloablative β -thalassaemic mice. *Stem Cell Res Ther.* 16 juill 2020;11(1):288.
28. Rattananon P, Anurathapan U, Bhukhai K, Hongeng S. The Future of Gene Therapy for Transfusion-Dependent Beta-Thalassemia: The Power of the Lentiviral Vector for Genetically Modified Hematopoietic Stem Cells. *Front Pharmacol* 2021. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2021.730873>
29. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* mars 2009;9(3):162-74.
30. Yaseen MM, Abuharfeil NM, Darmani H, Daoud A. Recent advances in myeloid-derived suppressor cell biology. *Front Med.* avr 2021;15(2):232-51.
31. Marini O, Spina C, Mimiola E, Cassaro A, Malerba G, Todeschini G, et al. Identification of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in the peripheral blood of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients. *Oncotarget.* 10 mai 2016;7(19):27676-88.
32. Haverkamp JM, Crist SA, Elzey BD, Cimen C, Ratliff TL. In vivo suppressive function of myeloid-derived suppressor cells is limited to the inflammatory site. *Eur J Immunol.* mars 2011;41(3):749-59.
33. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol.* févr 2018;19(2):108-19.

34. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 6 juill 2016;7(1):12150.
35. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 29 sept 2008;205(10):2235-49.
36. Sangaletti S, Talarico G, Chiodoni C, Cappetti B, Botti L, Portararo P, et al. SPARC Is a New Myeloid-Derived Suppressor Cell Marker Licensing Suppressive Activities. *Front Immunol.* 20 juin 2019;10:1369.
37. Gunaydin G, Kesikli SA, Guc D. Cancer associated fibroblasts have phenotypic and functional characteristics similar to the fibrocytes that represent a novel MDSC subset. *Oncoimmunology.* sept 2015;4(9):e1034918.
38. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol.* déc 2015;98(6):913-22.
39. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 août 2010;185(4):2273-84.
40. Yan D, Yang Q, Shi M, Zhong L, Wu C, Meng T, et al. Polyunsaturated fatty acids promote the expansion of myeloid-derived suppressor cells by activating the JAK/STAT3 pathway. *Eur J Immunol.* nov 2013;43(11):2943-55.
41. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mai 2009;182(9):5693-701.
42. Mattei F, Schiavoni G, Sestili P, Spadaro F, Fragale A, Sistigu A, et al. IRF-8 Controls Melanoma Progression by Regulating the Cross Talk between Cancer and Immune Cells within the Tumor Microenvironment. *Neoplasia N Y N.* déc 2012;14(12):1223-35.
43. Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, et al. Tumor-Induced Tolerance and Immune Suppression Depend on the C/EBP β Transcription Factor. *Immunity.* 25 juin 2010;32(6):790-802.
44. Ryzhov S, Novitskiy SV, Goldstein AE, Biktasova A, Blackburn MR, Biaggioni I, et al. Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 déc 2011;187(11):6120-9.
45. Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol.* juin 2009;85(6):996-1004.
46. Zhao X, Rong L, Zhao X, Li X, Liu X, Deng J, et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest.* 1 nov 2012;122(11):4094-104.
47. Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood.* 15 avr 2008;111(8):4233-44.
48. Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, et al. GM-CSF promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor- α . *Cancer Res.* 1 nov 2013;73(21):10.1158/0008-5472.CAN-12-4124.
49. Li K, Shi H, Zhang B, Ou X, Ma Q, Chen Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 7 oct 2021;6(1):1-25.

50. Youn JI, Kumar V, Collazo M, Nefedova Y, Condamine T, Cheng P, et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat Immunol.* mars 2013;14(3):211-20.
51. Chang AL, Miska J, Wainwright DA, Dey M, Rivetta CV, Yu D, et al. CCL2 Produced by the Glioma Microenvironment Is Essential for the Recruitment of Regulatory T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 1 oct 2016;76(19):5671-82.
52. Bian Z, Shi L, Venkataramani M, Abdelaal AM, Culpepper C, Kidder K, et al. Tumor conditions induce bone marrow expansion of granulocytic, but not monocytic, immunosuppressive leukocytes with increased CXCR2 expression in mice. *Eur J Immunol.* mars 2018;48(3):532-42.
53. Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekelashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, et al. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* Baltim Md. sept 2009;50(3):799-807.
54. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol.* août 2012;22(4):275-81.
55. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med.* juill 2007;13(7):828-35.
56. Stiff A, Trikha P, Mundy-Bosse B, McMichael E, Mace TA, Benner B, et al. Nitric Oxide Production by Myeloid-Derived Suppressor Cells Plays a Role in Impairing Fc Receptor-Mediated Natural Killer Cell Function. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 avr 2018;24(8):1891-904.
57. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 1 janv 2010;70(1):68-77.
58. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 15 janv 2006;66(2):1123-31.
59. Park MJ, Lee SH, Kim EK, Lee EJ, Baek JA, Park SH, et al. Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice. *Sci Rep.* 28 févr 2018;8(1):3753.
60. Hoechst B, Gamrekelashvili J, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood.* 16 juin 2011;117(24):6532-41.
61. Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, Anderson AC, Kuchroo VK. Emerging Tim-3 functions in anti-microbial and tumor immunity. *Trends Immunol.* août 2011;32(8):345-9.
62. Ballbach M, Dannert A, Singh A, Siegmund DM, Handgretinger R, Piali L, et al. Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells. *Immunol Lett.* 1 déc 2017;192:1-6.
63. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 juill 2009;183(2):937-44.
64. Li J, Wang L, Chen X, Li L, Li Y, Ping Y, et al. CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF- β -mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology.* 2017;6(6):e1320011.

65. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* janv 2009;58(1):49-59.
66. Wang Z, Zhu F, Wang J, Tao Q, Xu X, Wang H, et al. Increased CD14+HLA-DR-/low Myeloid-Derived Suppressor Cells Correlate With Disease Severity in Systemic Lupus Erythematosus Patients in an iNOS-Dependent Manner. *Front Immunol.* 2019;10:1202.
67. Jiao Z, Hua S, Wang W, Wang H, Gao J, Wang X. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlated negatively with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2013;42(2):85-90.
68. Zhang H, Wang S, Huang Y, Wang H, Zhao J, Gaskin F, et al. Myeloid-derived suppressor cells are proinflammatory and regulate collagen-induced arthritis through manipulating Th17 cell differentiation. *Clin Immunol Orlando Fla.* avr 2015;157(2):175-86.
69. Ochando J, Conde P, Utrero-Rico A, Paz-Artal E. Tolerogenic Role of Myeloid Suppressor Cells in Organ Transplantation. *Front Immunol.* 6 mars 2019;10:374.
70. Luan Y, Mosheir E, Menon MC, Wilson D, Woytovich C, Ochando J, et al. Monocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patients and mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg expansion. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* déc 2013;13(12):3123-31.
71. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Figley C, Long R, Park D, Carter D, et al. Frontline Science: Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) facilitate maternal-fetal tolerance in mice. *J Leukoc Biol.* mai 2017;101(5):1091-101.
72. Zhang T, Zhou J, Man GCW, Leung KT, Liang B, Xiao B, et al. MDSCs drive the process of endometriosis by enhancing angiogenesis and are a new potential therapeutic target. *Eur J Immunol.* juin 2018;48(6):1059-73.
73. Dufait I, Schwarze JK, Liechtenstein T, Leonard W, Jiang H, Escors D, et al. Ex vivo generation of myeloid-derived suppressor cells that model the tumor immunosuppressive environment in colorectal cancer. *Oncotarget.* 1 mai 2015;6(14):12369-82.
74. Zhu J, Inomata T, Fujimoto K, Uchida K, Fujio K, Nagino K, et al. Ex Vivo–Induced Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cells Prevent Corneal Allograft Rejection in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 juin 2021;62(7):3.
75. Apodaca MC, Wright AE, Riggins AM, Harris WP, Yeung RS, Yu L, et al. Characterization of a whole blood assay for quantifying myeloid-derived suppressor cells. *J Immunother Cancer.* 28 août 2019;7(1):230.
76. H. Rashed M, Bayraktar E, K. Helal G, Abd-Ellah MF, Amero P, Chavez-Reyes A, et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2 mars 2017;18(3):538.
77. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells.* 3 avr 2019;8(4):E307.
78. Théry and al. Full article: Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines 2018. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2018.1535750>
79. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* avr 2018;19(4):213-28.
80. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1208-15.

81. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal CCS*. 23 avr 2021;19:47.
82. Geis-Asteggianti L, Belew AT, Clements VK, Edwards NJ, Ostrand-Rosenberg S, El-Sayed NM, et al. Differential Content of Proteins, mRNAs, and miRNAs Suggests that MDSC and Their Exosomes May Mediate Distinct Immune Suppressive Functions. *J Proteome Res*. 05 2018;17(1):486-98.
83. Rozier P, Maumus M, Bony C, Maria ATJ, Sabatier F, Jorgensen C, et al. Extracellular Vesicles Are More Potent Than Adipose Mesenchymal Stromal Cells to Exert an Anti-Fibrotic Effect in an In Vitro Model of Systemic Sclerosis. *Int J Mol Sci*. janv 2021;22(13):6837.
84. Rozier P, Maumus M, Maria ATJ, Toupet K, Jorgensen C, Guilpain P, et al. Lung Fibrosis Is Improved by Extracellular Vesicles from IFN γ -Primed Mesenchymal Stromal Cells in Murine Systemic Sclerosis. *Cells*. oct 2021;10(10):2727.
85. Steinman RM, Cohn ZA. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE : I. MORPHOLOGY, QUANTITATION, TISSUE DISTRIBUTION. *J Exp Med*. 1 mai 1973;137(5):1142-62.
86. Anderson DA, Dutertre CA, Ginhoux F, Murphy KM. Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. *Nat Rev Immunol*. févr 2021;21(2):101-15.
87. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2019. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.03176>
88. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes and progenitors. *Science*. 21 avr 2017;356(6335):eaah4573.
89. Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med*. 7 juin 2010;207(6):1273-81.
90. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. août 2015;15(8):471-85.
91. Tang-Huau TL, Segura E. Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol*. févr 2019;86:44-9.
92. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol*. mars 1996;106(3):446-53.
93. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, et al. Psoriasis Is Characterized by Accumulation of Immunostimulatory and Th1/Th17 Cell-Polarizing Myeloid Dendritic Cells. *J Invest Dermatol*. 1 janv 2009;129(1):79-88.
94. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity*. 21 févr 2013;38(2):336-48.
95. Dutertre CA, Becht E, Irac SE, Khalilnezhad A, Narang V, Khalilnezhad S, et al. Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*. 17 sept 2019;51(3):573-589.e8.
96. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. juin 2006;6(6):476-83.
97. Cantrell D. Signaling in Lymphocyte Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. juin 2015;7(6):a018788.

98. Xing Y, Hogquist KA. T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* juin 2012;4(6):a006957.
99. Sandner SE, Clarkson MR, Salama AD, Sanchez-Fueyo A, Domenig C, Habicht A, et al. Role of the Programmed Death-1 Pathway in Regulation of Alloimmune Responses In Vivo. *J Immunol.* 15 mars 2005;174(6):3408-15.
100. Peng W, Ran B, Ma Y, Huang X, Chang Q, Wang X. Dendritic cells transfected with PD-L1 recombinant adenovirus induces T cell suppression and long-term acceptance of allograft transplantation. *Cell Immunol.* 2011;271(1):73-7.
101. Tuettenberg A, Huter E, Hubo M, Horn J, Knop J, Grimbacher B, et al. The Role of ICOS in Directing T Cell Responses: ICOS-Dependent Induction of T Cell Anergy by Tolerogenic Dendritic Cells. *J Immunol.* 15 mars 2009;182(6):3349-56.
102. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* mars 2002;3(3):237-43.
103. Min WP, Gorczynski R, Huang XY, Kushida M, Kim P, Obataki M, et al. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 janv 2000;164(1):161-7.
104. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* déc 2008;226:205-18.
105. Chen L, Zhang L, Zhu Z, He W, Gao L, Zhang W, et al. Effects of IL-10- and FasL-overexpressing dendritic cells on liver transplantation tolerance in a heterotopic liver transplantation rat model. *Immunol Cell Biol.* sept 2019;97(8):714-25.
106. Ramalingam R, Larmonier CB, Thurston RD, Midura-Kiela MT, Zheng SG, Ghishan FK, et al. Dendritic cell-specific disruption of TGF- β receptor II leads to altered regulatory T cell phenotype and spontaneous multiorgan autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 oct 2012;189(8):3878-93.
107. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol.* 31 juill 2011;12(9):870-8.
108. Marin E, Bouchet-Delbos L, Renoult O, Louvet C, Nèrrière-Daguin V, Managh AJ, et al. Human Tolerogenic Dendritic Cells Regulate Immune Responses through Lactate Synthesis. *Cell Metab.* 3 déc 2019;30(6):1075-1090.e8.
109. Dixon KO, van der Kooij SW, Vignali DAA, van Kooten C. Human tolerogenic dendritic cells produce IL-35 in the absence of other IL-12 family members. *Eur J Immunol.* juin 2015;45(6):1736-47.
110. Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, Hoffman RA, Seol DW, Flavell RA, et al. Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 janv 2004;172(2):1220-6.
111. Wong TH, Chen HA, Gau RJ, Yen JH, Suen JL. Heme Oxygenase-1-Expressing Dendritic Cells Promote Foxp3+ Regulatory T Cell Differentiation and Induce Less Severe Airway Inflammation in Murine Models. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168919.
112. Li C, Liu T, Zhao N, Zhu L, Wang P, Dai X. Dendritic cells transfected with indoleamine 2,3-dioxygenase gene suppressed acute rejection of cardiac allograft. *Int Immunopharmacol.* juill 2016;36:31-8.
113. Pêche H, Trinité B, Martinet B, Cuturi MC. Prolongation of Heart Allograft Survival by Immature Dendritic Cells Generated from Recipient Type Bone Marrow Progenitors. *Am J Transplant.* 2005;5(2):255-67.

114. Bhatt S, Qin J, Bennett C, Qian S, Fung JJ, Hamilton TA, et al. All-trans retinoic acid induces Arg-1 and iNOS producing dendritic cells with T cell inhibitory function. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 juin 2014;192(11):5098-108.
115. Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, González-Pérez G, Munguía R, Bajaña S, Meraz-Ríos MA, et al. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 févr 2010;184(4):1765-75.
116. Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. Phase I (Safety) Study of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells in Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes Care*. sept 2011;34(9):2026-32.
117. Jauregui-Amezaga A, Cabezón R, Ramírez-Morros A, España C, Rimola J, Bru C, et al. Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn's Disease: A Phase I Study. *J Crohns Colitis*. déc 2015;9(12):1071-8.
118. Bell GM, Anderson AE, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry RA, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. janv 2017;76(1):227-34.
119. Zubizarreta I, Flórez-Grau G, Vila G, Cabezón R, España C, Andorra M, et al. Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1b trial. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 avr 2019;116(17):8463-70.
120. Ezzelarab MB, Zahorchak AF, Lu L, Morelli AE, Chalasani G, Demetris AJ, et al. Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. août 2013;13(8):1989-2005.
121. Moreau A, Varey E, Bouchet-Delbos L, Cuturi MC. Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation. *Transplant Res*. 28 sept 2012;1(1):13.
122. Zhuang Q, Cai H, Cao Q, Li Z, Liu S, Ming Y. Tolerogenic Dendritic Cells: The Pearl of Immunotherapy in Organ Transplantation. *Front Immunol*. 6 oct 2020;11:552988.
123. Suuring M, Moreau A. Regulatory Macrophages and Tolerogenic Dendritic Cells in Myeloid Regulatory Cell-Based Therapies. *Int J Mol Sci*. 26 juill 2021;22(15):7970.
124. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*. 1 sept 1983;158(3):670-89.
125. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1 juill 1992;176(1):287-92.
126. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 juin 2000;164(12):6166-73.
127. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 17 juill 2014;41(1):14-20.
128. Riquelme P, Tomiuk S, Kammler A, Fändrich F, Schlitt HJ, Geissler EK, et al. IFN- γ -induced iNOS expression in mouse regulatory macrophages prolongs allograft survival in fully immunocompetent recipients. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. févr 2013;21(2):409-22.
129. Conde P, Rodriguez M, van der Touw W, Jimenez A, Burns M, Miller J, et al. DC-SIGN+ Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance. *Immunity*. 16 juin 2015;42(6):1143-58.

130. Zhang F, Zhang J, Cao P, Sun Z, Wang W. The characteristics of regulatory macrophages and their roles in transplantation. *Int Immunopharmacol*. févr 2021;91:107322.
131. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. déc 2008;8(12):958-69.
132. Riquelme P, Amodio G, Macedo C, Moreau A, Obermajer N, Brochhausen C, et al. DHRS9 Is a Stable Marker of Human Regulatory Macrophages. *Transplantation*. nov 2017;101(11):2731-8.
133. Navarro-Barriuso J, Mansilla MJ, Martínez-Cáceres EM. Searching for the Transcriptomic Signature of Immune Tolerance Induction—Biomarkers of Safety and Functionality for Tolerogenic Dendritic Cells and Regulatory Macrophages. *Front Immunol* 2018
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02062>
134. Fleming BD, Mosser DM. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol*. sept 2011;41(9):2498-502.
135. Gobert AP, Verriere T, Asim M, Barry DP, Piazzuelo MB, de Sablet T, et al. Heme Oxygenase-1 Dysregulates Macrophage Polarization and the Immune Response to *Helicobacter pylori*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 sept 2014;193(6):3013-22.
136. Christensen SM, Belew AT, El-Sayed NM, Tafuri WL, Silveira FT, Mosser DM. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 7 mars 2019;13(3):e0007152.
137. Sharma A, Sharma P, Ganga L, Satoeya N, Mishra S, Vishwakarma AL, et al. Infective Larvae of *Brugia malayi* Induce Polarization of Host Macrophages that Helps in Immune Evasion. *Front Immunol* 2018.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00194>
138. Sulaiman AA, Zolnierczyk K, Japa O, Owen JP, Maddison BC, Emes RD, et al. A Trematode Parasite Derived Growth Factor Binds and Exerts Influences on Host Immune Functions via Host Cytokine Receptor Complexes. *PLoS Pathog*. nov 2016;12(11):e1005991.
139. Vos ACW, Wildenberg ME, Arijs I, Duijvestein M, Verhaar AP, de Hertogh G, et al. Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro. *Inflamm Bowel Dis*. mars 2012;18(3):401-8.
140. Koelink PJ, Bloemendaal FM, Li B, Westera L, Vogels EWM, Roest M van, et al. Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through macrophage IL-10 signalling. *Gut*. 1 juin 2020;69(6):1053-63.
141. Diao J, Mikhailova A, Tang M, Gu H, Zhao J, Catral MS. Immunostimulatory conventional dendritic cells evolve into regulatory macrophage-like cells. *Blood*. 24 mai 2012;119(21):4919-27.
142. Ribechini E, Hutchinson JA, Hergovits S, Heuer M, Lucas J, Schleicher U, et al. Novel GM-CSF signals via IFN- γ /IRF-1 and AKT/mTOR license monocytes for suppressor function. *Blood Adv*. 7 juin 2017;1(14):947-60.
143. Riquelme P, Haarer J, Kammler A, Walter L, Tomiuk S, Ahrens N, et al. TIGIT+ iTregs elicited by human regulatory macrophages control T cell immunity. *Nat Commun*. 20 juill 2018;9(1):2858.
144. Sironi M, Martinez FO, D'Ambrosio D, Gattorno M, Polentarutti N, Locati M, et al. Differential regulation of chemokine production by Fc γ receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *J Leukoc Biol*. 2006;80(2):342-9.
145. Burgner D, Rockett K, Kwiatkowski D. Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child*. 1 août 1999;81(2):185-8.

146. Pilling D, Gomer RH. Persistent Lung Inflammation and Fibrosis in Serum Amyloid P Component (Apc^{s-/-}) Knockout Mice. *PLOS ONE*. 2 avr 2014;9(4):e93730.
147. Hummitzsch L, Zitta K, Rusch R, Cremer J, Steinfath M, Gross J, et al. Characterization of the Angiogenic Potential of Human Regulatory Macrophages (Mreg) after Ischemia/Reperfusion Injury In Vitro. *Stem Cells Int*. 25 juin 2019;2019:3725863.
148. Jain S, Tran TH, Amiji M. Macrophage repolarization with targeted alginate nanoparticles containing IL-10 plasmid DNA for the treatment of experimental arthritis. *Biomaterials*. 1 août 2015;61:162-77.
149. Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut*. août 2013;62(8):1131-41.
150. Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, et al. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet Lond Engl*. 23 mai 2020;395(10237):1627-39.
151. Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of Proinflammatory Responses by Ligating the Macrophage Fcγ Receptor Type I. *J Exp Med*. 1 juill 1998;188(1):217-22.
152. Hutchinson JA, Riquelme P, Geissler EK, Fändrich F. Human regulatory macrophages. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;677:181-92.
153. Janikashvili N, Trad M, Gautheron A, Samson M, Lamarthée B, Bonnefoy F, et al. Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8⁺ T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. juin 2015;135(6):1614-1624.e4.
154. Janikashvili N, Gérard C, Thébault M, Brazdova A, Boibessot C, Cladière C, et al. Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell-based treatment in graft-versus-host disease prevention while preserving graft-versus-leukemia effect. *Oncoimmunology*. 19 févr 2021;10(1):1880046.
155. Koehn BH, Saha A, McDonald-Hyman C, Loschi M, Thangavelu G, Ma L, et al. Danger-associated extracellular ATP counters MDSC therapeutic efficacy in acute GVHD. *Blood*. 7 nov 2019;134(19):1670-82.
156. Gérard C, Thébault M, Lamarthée B, Genet C, Cattin F, Brazdova A, et al. Human Monocyte-Derived Suppressor Cell Supernatant Induces Immunoregulatory Effects and Mitigates xenoGvHD. *Front Immunol*. 2022;13:827712.
157. Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 déc 2012;189(12):5602-11.
158. Whitehouse G, Gray E, Mastoridis S, Merritt E, Kodala E, Yang JHM, et al. IL-2 therapy restores regulatory T-cell dysfunction induced by calcineurin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 juill 2017;114(27):7083-8.
159. Salvarani C, Macchioni P, Zizzi F, Mantovani W, Rossi F, Castri C, et al. Epidemiologic and immunogenetic aspects of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in northern Italy. *Arthritis Rheum*. mars 1991;34(3):351-6.
160. Salvarani C, Cantini F, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *Lancet Lond Engl*. 19 juill 2008;372(9634):234-45.
161. Salvarani C, Crowson CS, O'Fallon WM, Hunder GG, Gabriel SE. Reappraisal of the epidemiology of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota, over a fifty-year period. *Arthritis Rheum*. 15 avr 2004;51(2):264-8.

162. Chaudhry IA, Shamsi FA, Elzaridi E, Arat YO, Bosley TM, Riley FC. Epidemiology of giant-cell arteritis in an Arab population: a 22-year study. *Br J Ophthalmol.* juin 2007;91(6):715-8.
163. Lee JL, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. The geo-epidemiology of temporal (giant cell) arteritis. *Clin Rev Allergy Immunol.* oct 2008;35(1-2):88-95.
164. Barrier JH, Billaud E, Magadur G. [Respective prevalences and frequencies of Horton's disease and rhizomelic pseudopolyarthritis. Epidemiological study in the Loire-Atlantic department using a general practice research network (RESOMED 44)]. *Rev Med Interne.* oct 1992;13(5):393-6.
165. Samson M, Jacquin A, Audia S, Daubail B, Devilliers H, Petrella T, et al. Stroke associated with giant cell arteritis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* févr 2015;86(2):216-21.
166. Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. The HLA-DRB1 locus as a genetic component in giant cell arteritis. Mapping of a disease-linked sequence motif to the antigen binding site of the HLA-DR molecule. *J Clin Invest.* déc 1992;90(6):2355-61.
167. Combe B, Sany J, Le Quellec A, Clot J, Eliaou JF. Distribution of HLA-DRB1 alleles of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in a Mediterranean population. *J Rheumatol.* 1 janv 1998;25(1):94-8.
168. Gonzalez-Gay MA. Genetic epidemiology. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Res.* 2001;3(3):154-7.
169. Prieto-Peña D, Remuzgo-Martínez S, Atienza-Mateo B, López-Mejias R, González-Gay MÁ. Cranial and extracranial giant cell arteritis do not have different HLA-DRB1 and HLA-B association in Caucasian individuals. *Arthritis Res Ther.* 2021;23:268.
170. Carmona FD, Vaglio A, Mackie SL, Hernández-Rodríguez J, Monach PA, Castañeda S, et al. A Genome-wide Association Study Identifies Risk Alleles in Plasminogen and P4HA2 Associated with Giant Cell Arteritis. *Am J Hum Genet.* 5 janv 2017;100(1):64-74.
171. Márquez A, Solans R, Hernández-Rodríguez J, Cid MC, Castañeda S, Ramentol M, et al. A Candidate Gene Approach Identifies an IL33 Genetic Variant as a Novel Genetic Risk Factor for GCA. *PLOS ONE.* 19 nov 2014;9(11):e113476.
172. Enjuanes A, Benavente Y, Hernández-Rodríguez J, Queralt C, Yagüe J, Jares P, et al. Association of NOS2 and potential effect of VEGF, IL6, CCL2 and IL1RN polymorphisms and haplotypes on susceptibility to GCA- a simultaneous study of 130 potentially functional SNPs in 14 candidate genes. *Rheumatol Oxf Engl.* mai 2012;51(5):841-51.
173. Serrano A, Carmona FD, Castañeda S, Solans R, Hernández-Rodríguez J, Cid MC, et al. Evidence of association of the NLRP1 gene with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* avr 2013;72(4):628-30.
174. Matthey DL, Hajeer AH, Dababneh A, Thomson W, González-Gay MA, García-Porrúa C, et al. Association of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica with different tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms. *Arthritis Rheum.* août 2000;43(8):1749-55.
175. Gonzalez-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Garcia-Porrúa C, Amoli MM, Thomson W, et al. Corticotropin releasing hormone promoter polymorphisms in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol.* avr 2002;20(2):133-8.
176. Salvarani C, Casali B, Boiardi L, Ranzi A, Macchioni P, Nicoli D, et al. Intercellular adhesion molecule 1 gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis: association with disease risk and severity. *J Rheumatol.* mai 2000;27(5):1215-21.

177. G P, L B, B C, E F, D N, N P, et al. CC chemokine receptor 5 polymorphism in Italian patients with giant cell arteritis. *Mod Rheumatol* sept 2013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23001713/>
178. Rueda B, Miranda-Fillooy JA, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Association of CD24 gene polymorphisms with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol*. mai 2008;35(5):850-4.
179. Makki RF, al Sharif F, González-Gay MA, García-Porrúa C, Ollier WE, Hajeer AH. RANTES gene polymorphism in polymyalgia rheumatica, giant cell arteritis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. juin 2000;18(3):391-3.
180. Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol*. févr 2007;8(2):145-53.
181. Coit P, De Lott LB, Nan B, Elner VM, Sawalha AH. DNA methylation analysis of the temporal artery microenvironment in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. juin 2016;75(6):1196-202.
182. Li Y, Liu Y, Strickland FM, Richardson B. Age-dependent decreases in DNA methyltransferase levels and low transmethylation micronutrient levels synergize to promote overexpression of genes implicated in autoimmunity and acute coronary syndromes. *Exp Gerontol*. avr 2010;45(4):312-22.
183. Czesnikiewicz-Guzik M, Lee WW, Cui D, Hiruma Y, Lamar DL, Yang ZZ, et al. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin Immunol Orlando Fla*. avr 2008;127(1):107-18.
184. Mohan SV, Liao YJ, Kim JW, Goronzy JJ, Weyand CM. Giant cell arteritis: immune and vascular aging as disease risk factors. *Arthritis Res Ther*. 2 août 2011;13(4):231.
185. Ly KH, Régent A, Tamby MC, Mouthon L. Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev*. août 2010;9(10):635-45.
186. Evangelatos G, Grivas A, Pappa M, Kouna K, Iliopoulos A, Fragoulis GE. Cranial giant cell arteritis mimickers: A masquerade to unveil. *Autoimmun Rev*. 1 mai 2022;21(5):103083.
187. Nagel MA, White T, Khmeleva N, Rempel A, Boyer PJ, Bennett JL, et al. Analysis of Varicella-Zoster Virus in Temporal Arteries Biopsy Positive and Negative for Giant Cell Arteritis. *JAMA Neurol*. nov 2015;72(11):1281-7.
188. Weyand CM, Goronzy JJ. Immune mechanisms in medium and large-vessel vasculitis. *Nat Rev Rheumatol*. déc 2013;9(12):731-40.
189. Krupa WM, Dewan M, Jeon MS, Kurtin PJ, Younge BR, Goronzy JJ, et al. Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. *Am J Pathol*. nov 2002;161(5):1815-23.
190. Ma-Krupa W, Jeon MS, Spoerl S, Tedder TF, Goronzy JJ, Weyand CM. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J Exp Med*. 19 janv 2004;199(2):173-83.
191. Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ, Weyand CM. Th17 and Th1 T-cell responses in Giant Cell Arteritis. *Circulation*. 23 févr 2010;121(7):906-15.
192. Terrier B, Geri G, Chaara W, Allenbach Y, Rosenzweig M, Costedoat-Chalumeau N, et al. Interleukin-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):2001-11.
193. Samson M, Greigert H, Ciudad M, Gerard C, Ghesquière T, Trad M, et al. Improvement of Treg immune response after treatment with tocilizumab in giant cell arteritis. *Clin Transl Immunol*. 2021;10(9):e1332.
194. Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Terrades-García N, Alba MA, Prieto-González S, et al. Blocking interferon γ reduces expression of chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 and decreases macrophage

- infiltration in ex vivo cultured arteries from patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* juin 2016;75(6):1177-86.
195. Samson M, Ly KH, Tournier B, Janikashvili N, Trad M, Ciudad M, et al. Involvement and prognosis value of CD8(+) T cells in giant cell arteritis. *J Autoimmun.* août 2016;72:73-83.
 196. Lozano E, Segarra M, García-Martínez A, Hernández-Rodríguez J, Cid MC. Imatinib mesylate inhibits in vitro and ex vivo biological responses related to vascular occlusion in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* nov 2008;67(11):1581-8.
 197. Kaiser M, Weyand CM, Björnsson J, Goronzy JJ. Platelet-derived growth factor, intimal hyperplasia, and ischemic complications in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* avr 1998;41(4):623-33.
 198. Esen I, Jiemy WF, van Sleen Y, van der Geest KSM, Sandovici M, Heeringa P, et al. Functionally Heterogenous Macrophage Subsets in the Pathogenesis of Giant Cell Arteritis: Novel Targets for Disease Monitoring and Treatment. *J Clin Med.* 26 oct 2021;10(21):4958.
 199. Planas-Rigol E, Terrades-Garcia N, Corbera-Bellalta M, Lozano E, Alba MA, Segarra M, et al. Endothelin-1 promotes vascular smooth muscle cell migration across the artery wall: a mechanism contributing to vascular remodelling and intimal hyperplasia in giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* sept 2017;76(9):1624-34.
 200. Régent A, Ly KH, Groh M, Khifer C, Lofek S, Clary G, et al. Molecular analysis of vascular smooth muscle cells from patients with giant cell arteritis: Targeting endothelin-1 receptor to control proliferation. *Autoimmun Rev.* 1 avr 2017;16(4):398-406.
 201. Borchers AT, Gershwin ME. Giant cell arteritis: A review of classification, pathophysiology, geoepidemiology and treatment. *Autoimmun Rev.* 1 mai 2012;11(6):A544-54.
 202. Gonzalez-Gay MA, Lopez-Diaz MJ, Barros S, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A, Paz-Carreira J, et al. Giant cell arteritis: laboratory tests at the time of diagnosis in a series of 240 patients. *Medicine (Baltimore).* sept 2005;84(5):277-90.
 203. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* août 1990;33(8):1122-8.
 204. Stone JH, Tuckwell K, Dimonaco S, Klearman M, Aringer M, Blockmans D, et al. Trial of Tocilizumab in Giant-Cell Arteritis. *N Engl J Med.* 27 juill 2017;377(4):317-28.
 205. Mahr PA. Ce PNDs a été actualisé sous la coordination du : 2017;47.
 206. Bardi M, Diamantopoulos AP. EULAR recommendations for the use of imaging in large vessel vasculitis in clinical practice summary. *Radiol Med (Torino).* oct 2019;124(10):965-72.
 207. Dejaco C, Brouwer E, Mason JC, Buttgerit F, Matteson EL, Dasgupta B. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: current challenges and opportunities. *Nat Rev Rheumatol.* oct 2017;13(10):578-92.
 208. Hellmich B, Agueda A, Monti S, Buttgerit F, de Boysson H, Brouwer E, et al. 2018 Update of the EULAR recommendations for the management of large vessel vasculitis. *Ann Rheum Dis.* janv 2020;79(1):19-30.
 209. Broder MS, Sarsour K, Chang E, Collinson N, Tuckwell K, Napalkov P, et al. Corticosteroid-related adverse events in patients with giant cell arteritis: A claims-based analysis. *Semin Arthritis Rheum.* oct 2016;46(2):246-52.

210. Perrineau S, Ghesquière T, Charles P, Paule R, Samson M, Gayraud M, et al. A French cohort of patients with giant cell arteritis: glucocorticoid treatment and its associated side effects. *Clin Exp Rheumatol*. avr 2021;39 Suppl 129(2):155-60.
211. Mahr AD, Jover JA, Spiera RF, Hernández-García C, Fernández-Gutiérrez B, Lavalley MP, et al. Adjunctive methotrexate for treatment of giant cell arteritis: an individual patient data meta-analysis. *Arthritis Rheum*. août 2007;56(8):2789-97.
212. Villiger PM, Adler S, Kuchen S, Wermelinger F, Dan D, Fiege V, et al. Tocilizumab for induction and maintenance of remission in giant cell arteritis: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 7 mai 2016;387(10031):1921-7.
213. Langford CA, Cuthbertson D, Ytterberg SR, Khalidi N, Monach PA, Carette S, et al. A Randomized, Double-Blind Trial of Abatacept (CTLA-4Ig) for the Treatment of Giant Cell Arteritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. avr 2017;69(4):837-45.
214. Cid MC, Unizony SH, Blockmans D, Brouwer E, Dagna L, Dasgupta B, et al. Efficacy and safety of mavrilimumab in giant cell arteritis: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. mai 2022;81(5):653-61.
215. Venhoff N, Schmidt WA, Lamprecht P, Tony HP, App C, Sieder C, et al. Efficacy and safety of secukinumab in patients with giant cell arteritis: study protocol for a randomized, parallel group, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *Trials*. 17 août 2021;22(1):543.
216. Koster MJ, Crowson CS, Giblon RE, Jaquith JM, Duarte-García A, Matteson EL, et al. Baricitinib for relapsing giant cell arteritis: a prospective open-label 52-week pilot study. *Ann Rheum Dis*. juin 2022;81(6):861-7.
217. Bairkdar M, Rossides M, Westerlind H, Hesselstrand R, Arkema EV, Holmqvist M. Incidence and prevalence of systemic sclerosis globally: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Rheumatology*. 1 juill 2021;60(7):3121-33.
218. 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.
219. El Adssi H, Cirstea D, Virion JM, Guillemin F, de Korwin JD. 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.
220. Herrick AL, Ennis H, Bhushan M, Silman AJ, Baildam EM. Incidence of childhood linear scleroderma and systemic sclerosis in the UK and Ireland. *Arthritis Care Res*. févr 2010;62(2):213-8.
221. Hachulla E, Agard C, Allanore Y, Avouac J, Belot A, Berezne A, et al. Protocole National de Diagnostic et de Soins sur la Sclérodémie Systémique. 2017;143.
222. Nikpour M, Stevens WM, Herrick AL, Proudman SM. Epidemiology of systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. déc 2010;24(6):857-69.
223. Gladman DD, Kung TN, Siannis F, Pellett F, Farewell VT, Lee P. HLA markers for susceptibility and expression in scleroderma. *J Rheumatol*. août 2005;32(8):1481-7.
224. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front Immunol* juin 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4459100/>
225. Ota Y, Kuwana M. Updates on genetics in systemic sclerosis. *Inflamm Regen*. 15 juin 2021;41:17.

226. 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.
227. Radstake TRDJ, Gorlova O, Rueda B, Martin JE, 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.
228. 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.
229. Martin JE, 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.
230. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and systemic sclerosis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* mars 2012;39(3):3103-8.
231. COUSTET B, BOUAZIZ M, DIEUDÉ P, GUEDJ M, BOSSINI-CASTILLO L, AGARWAL S, et al. Independent Replication and Metaanalysis 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.
232. 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.
233. 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.
234. Dospinescu P, Jones GT, Basu N. Environmental risk factors in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* mars 2013;25(2):179-83.
235. Cutolo M. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights: Expert Review of Clinical Immunology: Vol 15, No 7 2019 <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1744666X.2019.1614915>
236. Watad A, Rosenberg V, Tiosano S, Cohen Tervaert JW, Yavne Y, Shoenfeld Y, et al. Silicone breast implants and the risk of autoimmune/rheumatic disorders: a real-world analysis. *Int J Epidemiol.* 1 déc 2018;47(6):1846-54.
237. Lunardi C, Bason C, Navone R, Millo E, Damonte G, Corrocher R, et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med.* oct 2000;6(10):1183-6.
238. Arnson Y, Amital H, Guiducci S, Matucci-Cerinic M, Valentini G, Barzilai O, et al. The role of infections in the immunopathogenesis of systemic sclerosis--evidence from serological studies. *Ann N Y Acad Sci.* sept 2009;1173:627-32.
239. Caselli. HHV-6A Infection and Systemic Sclerosis: Clues of a Possible Association. - PubMed - NCBI. 2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31878218>
240. 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.

241. Wang YY, Wang Q, Sun XH, Liu RZ, Shu Y, Kanekura T, et al. DNA hypermethylation of the forkhead box protein 3 (FOXP3) promoter in CD4⁺ T cells of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* juill 2014;171(1):39-47.
242. Zhu H, Li Y, Qu S, Luo H, Zhou Y, Wang Y, et al. MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma. *J Clin Immunol.* juin 2012;32(3):514-22.
243. Rozier P, Maumus M, Maria ATJ, Toupet K, Lai-Kee-Him J, Jorgensen C, et al. Mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles alleviate systemic sclerosis via miR-29a-3p. *J Autoimmun.* juill 2021;121:102660.
244. Zhang L, Wu H, Zhao M, Lu Q. Meta-analysis of differentially expressed microRNAs in systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis.* oct 2020;23(10):1297-304.
245. Szabo I, Muntean L, Crisan T, Rednic V, Sirbe C, Rednic S. Novel Concepts in Systemic Sclerosis Pathogenesis: Role for miRNAs. *Biomedicines.* 14 oct 2021;9(10):1471.
246. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* févr 1988;15(2):202-5.
247. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primer.* 23 2015;1:15002.
248. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet Lond Engl.* 7 oct 2017;390(10103):1685-99.
249. Wigley FM, Flavahan NA. Raynaud's Phenomenon. *N Engl J Med.* 11 août 2016;375(6):556-65.
250. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med.* 7 mai 2009;360(19):1989-2003.
251. Steen VD, Medsger TA. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* nov 2000;43(11):2437-44.
252. Ostojić P, Damjanov N. Different clinical features in patients with limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* juill 2006;25(4):453-7.
253. Marc C. Hochberg. Systemic Sclerosis. BoD – Books on Demand; 2010. 218 p.
254. Perelas A, Silver RM, Arrossi AV, Highland KB. Systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Lancet Respir Med.* mars 2020;8(3):304-20.
255. Launay D, Sobanski V, Hachulla E, Humbert M. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: different phenotypes. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* 30 sept 2017;26(145):170056.
256. Lóránd V, Cziráj L, Minier T. Musculoskeletal involvement in systemic sclerosis. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. oct 2014;43(10 Pt 2):e315-328.
257. 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.
258. Mouthon L, Bussone G, Berezné A, Noël LH, Guillevin L. Scleroderma renal crisis. *J Rheumatol.* juin 2014;41(6):1040-8.
259. Domsic R, Fasanella K, Bielefeldt K. Gastrointestinal manifestations of systemic sclerosis. *Dig Dis Sci.* mai 2008;53(5):1163-74.
260. Lambova S. Cardiac manifestations in systemic sclerosis. *World J Cardiol.* 26 sept 2014;6(9):993-1005.

261. Valenzuela A, Song P, Chung L. Calcinosis in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* nov 2018;30(6):554-61.
262. Onishi A, Sugiyama D, Kumagai S, Morinobu A. Cancer incidence in systemic sclerosis: meta-analysis of population-based cohort studies. *Arthritis Rheum.* juill 2013;65(7):1913-21.
263. Partouche L, Goulabchand R, Maria ATJ, Rivière S, Jorgensen C, Rigau V, et al. Biphasic Temporal Relationship between Cancers and Systemic Sclerosis: A Clinical Series from Montpellier University Hospital and Review of the Literature. *J Clin Med.* mars 2020;9(3):853.
264. Hudson M, Thombs BD, Steele R, Panopalis P, Newton E, Baron M, et al. Health-related quality of life in systemic sclerosis: a systematic review. *Arthritis Rheum.* 15 août 2009;61(8):1112-20.
265. Thombs BD, van Lankveld W, Bassel M, Baron M, Buzza R, Haslam S, et al. Psychological health and well-being in systemic sclerosis: State of the science and consensus research agenda. *Arthritis Care Res.* août 2010;62(8):1181-9.
266. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis.* juill 2007;66(7):940-4.
267. Kayser C, Fritzler MJ. Autoantibodies in Systemic Sclerosis: Unanswered Questions. *Front Immunol.* 15 avr 2015;6:167.
268. Chepy A, Bourel L, Koether V, Launay D, Dubucquoi S, Sobanski V. Can Antinuclear Antibodies Have a Pathogenic Role in Systemic Sclerosis? *Front Immunol.* 2022;13:930970.
269. Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P, Black CM, Loizou S, Byron MA, et al. Measurement and characterisation of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol.* juin 1988;72(3):450-6.
270. 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.
271. Salojin KV, Le Tonquèze M, Saraux A, Nassonov EL, Dueymes M, Piette JC, et al. Antiendothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. *Am J Med.* févr 1997;102(2):178-85.
272. Servettaz A, Guilpain P, Tamas N, Kaveri SV, Camoin L, Mouthon L. Natural anti-endothelial cell antibodies. *Autoimmun Rev.* juin 2008;7(6):426-30.
273. Steen V, Domsic RT, Lucas M, Fertig N, Medsger TA. A clinical and serologic comparison of African American and Caucasian patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* sept 2012;64(9):2986-94.
274. Nihtyanova SI, Sari A, Harvey JC, Leslie A, Derrett-Smith EC, Fonseca C, et al. Using Autoantibodies and Cutaneous Subset to Develop Outcome-Based Disease Classification in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* mars 2020;72(3):465-76.
275. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An ACR-EULAR Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum.* nov 2013;65(11):2737-47.
276. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* août 2005;35(1):35-42.
277. Mayes MD, Lacey 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.* août 2003;48(8):2246-55.
278. Herrick AL, Pan X, Peytrignet S, Lunt M, Hesselstrand R, Mouthon L, et al. Treatment outcome in early diffuse cutaneous systemic sclerosis: the European Scleroderma Observational Study (ESOS). *Ann Rheum Dis.* juill 2017;76(7):1207-18.

279. van den Hoogen FH, Boerbooms AM, Swaak AJ, Rasker JJ, van Lier HJ, van de Putte LB. Comparison of methotrexate with placebo in the treatment of systemic sclerosis: a 24 week randomized double-blind trial, followed by a 24 week observational trial. *Br J Rheumatol.* avr 1996;35(4):364-72.
280. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR, Baron M, Ellman M, Carette S, et al. A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* juin 2001;44(6):1351-8.
281. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med.* 22 juin 2006;354(25):2655-66.
282. Volkmann ER, Tashkin DP, Li N, Roth MD, Khanna D, Hoffmann-Vold AM, et al. Mycophenolate Mofetil Versus Placebo for Systemic Sclerosis-Related Interstitial Lung Disease: An Analysis of Scleroderma Lung Studies I and II. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* juill 2017;69(7):1451-60.
283. Sharada B, Kumar A, Kakker R, Adya CM, Pande I, Uppal SS, et al. Intravenous dexamethasone pulse therapy in diffuse systemic sclerosis. A randomized placebo-controlled study. *Rheumatol Int.* 1994;14(3):91-4.
284. Herrick AL, Griffiths-Jones DJ, Ryder WD, Mason JC, Denton CP. Clinical trial protocol: PRednisolone in early diffuse cutaneous Systemic Sclerosis (PRedSS). *J Scleroderma Relat Disord.* 1 juin 2021;6(2):146-53.
285. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 29 mai 2014;370(22):2071-82.
286. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, Azuma A, Fischer A, Mayes MD, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med.* 27 juin 2019;380(26):2518-28.
287. Cottin V, Martinez FJ, Jenkins RG, Belperio JA, Kitamura H, Molina-Molina M, et al. Safety and tolerability of nintedanib in patients with progressive fibrosing interstitial lung diseases: data from the randomized controlled INBUILD trial. *Respir Res.* 7 avr 2022;23(1):85.
288. Daoussis D, Melissaropoulos K, Sakellaropoulos G, Antonopoulos I, Markatseli TE, Simopoulou T, et al. A multicenter, open-label, comparative study of B-cell depletion therapy with Rituximab for systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Semin Arthritis Rheum.* 1 avr 2017;46(5):625-31.
289. Ebata S, Yoshizaki A, Oba K, Kashiwabara K, Ueda K, Uemura Y, et al. Safety and efficacy of rituximab in systemic sclerosis (DESIREs): a double-blind, investigator-initiated, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Rheumatol.* 1 juill 2021;3(7):e489-97.
290. Khanna D, Lin CJF, Furst DE, Goldin J, Kim G, Kuwana M, et al. Tocilizumab in systemic sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* oct 2020;8(10):963-74.
291. Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, McSweeney PA, Pinckney A, Welch B, et al. Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N Engl J Med.* 4 janv 2018;378(1):35-47.
292. Crespo MM, Bermudez CA, Dew MA, Johnson BA, George MP, Bhama J, et al. Lung Transplant in Patients with Scleroderma Compared with Pulmonary Fibrosis. Short- and Long-Term Outcomes. *Ann Am Thorac Soc.* juin 2016;13(6):784-92.
293. Thoreau B, Chaigne B, Renaud A, Mouthon L. Treatment of systemic sclerosis. *Presse Médicale.* 1 avr 2021;50(1):104088.
294. Campochiaro C, Allanore Y. An update on targeted therapies in systemic sclerosis based on a systematic review from the last 3 years. *Arthritis Res Ther.* 1 juin 2021;23(1):155.
295. Servettaz A, Kavian N, Nicco C, Deveaux V, Chéreau C, Wang A, et al. Targeting the Cannabinoid Pathway Limits the Development of Fibrosis and Autoimmunity in a Mouse Model of Systemic Sclerosis. *Am J Pathol.* 1 juill 2010;177(1):187-96.

296. Spiera R, Hummers L, Chung L, Frech TM, Domsic R, Hsu V, et al. Safety and Efficacy of Lenabasum in a Phase II, Randomized, Placebo-Controlled Trial in Adults With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(8):1350-60.
297. Maria ATJ, Toupet K, Maumus M, Rozier P, Vozenin MC, Le Quellec A, et al. Fibrosis Development in HOCl-Induced Systemic Sclerosis: A Multistage Process Hampered by Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol.* 5 nov 2018;9:2571.
298. Maria ATJ, Rozier P, Fonteneau G, Sutra T, Maumus M, Toupet K, et al. iNOS Activity Is Required for the Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem Cells in Experimental Systemic Sclerosis. *Front Immunol* 2018 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03056>
299. Volkman ER, Varga J. Emerging targets of disease-modifying therapy for systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* avr 2019;15(4):208-24.
300. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* oct 2007;7(10):803-15.
301. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, et al. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J Rheumatol.* oct 1994;21(10):1838-44.
302. Distler O, Distler JHW, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J, et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res.* 9 juill 2004;95(1):109-16.
303. Manetti M, Guiducci S, Romano E, Ceccarelli C, Bellando-Randone S, Conforti ML, et al. Overexpression of VEGF165b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Leads to Insufficient Angiogenesis in Patients With Systemic Sclerosis. *Circ Res.* 22 juill 2011;109(3):e14-26.
304. 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.
305. Schmitt P, Girard JP, Cayrol C. L'interleukine 33 - De la biologie aux implications thérapeutiques. *médecine/sciences.* 1 mai 2019;35(5):440-51.
306. Li L, Zhu H, Zuo X. Interleukin-33 in Systemic Sclerosis: Expression and Pathogenesis. *Front Immunol* nov 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6249369/>
307. 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.
308. Frasca L, Lande R. Toll-like receptors in mediating pathogenesis in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2020;201(1):14-24.
309. 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.* 1 janv 2013;182(1):192-205.
310. Fang F, Marangoni RG, Zhou X, Yang Y, Ye B, Shangguang A, et al. Toll-like Receptor 9 Signaling Is Augmented in Systemic Sclerosis and Elicits Transforming Growth Factor β -Dependent Fibroblast Activation. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. août 2016;68(8):1989-2002.
311. Ciechomska M, Huigens CA, Hügler T, Stanly T, Gessner A, Griffiths B, et al. Toll-like receptor-mediated, enhanced production of profibrotic TIMP-1 in monocytes from patients with systemic sclerosis: role of serum factors. *Ann Rheum Dis.* août 2013;72(8):1382-9.

312. Kioon MDA, Tripodo C, Fernandez D, Kirou KA, Spiera RF, Crow MK, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. *Sci Transl Med* janv 2018 <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aam8458>
313. Lescoat A, Lecureur V, Roussel M, Sunnaram BL, Ballerie A, Coiffier G, et al. CD16-positive circulating monocytes and fibrotic manifestations of systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. juill 2017;36(7):1649-54.
314. Stifano G, Christmann RB. Macrophage Involvement in Systemic Sclerosis: Do We Need More Evidence? *Curr Rheumatol Rep*. janv 2016;18(1):2.
315. Christmann RB, Lafyatis R. The cytokine language of monocytes and macrophages in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):146.
316. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*. juin 2018;154(2):186-95.
317. Trombetta AC, Soldano S, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Paolino S, et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir Res*. 24 sept 2018;19(1):186.
318. Hügler T, Hogan V, White KE, van Laar JM. Mast cells are a source of transforming growth factor β in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. mars 2011;63(3):795-9.
319. Horikawa M, Hasegawa M, Komura K, Hayakawa I, Yanaba K, Matsushita T, et al. Abnormal natural killer cell function in systemic sclerosis: altered cytokine production and defective killing activity. *J Invest Dermatol*. oct 2005;125(4):731-7.
320. Barnes TC, Anderson ME, Edwards SW, Moots RJ. Neutrophil-derived reactive oxygen species in SSc. *Rheumatol Oxf Engl*. juill 2012;51(7):1166-9.
321. Didier K, Giusti D, Le Jan S, Terryn C, Muller C, Pham BN, et al. Neutrophil Extracellular Traps Generation Relates with Early Stage and Vascular Complications in Systemic Sclerosis. *J Clin Med*. juill 2020;9(7):2136.
322. Wohlfahrt T, Usherenko S, Englbrecht M, Dees C, Weber S, Beyer C, et al. Type 2 innate lymphoid cell counts are increased in patients with systemic sclerosis and correlate with the extent of fibrosis. *Ann Rheum Dis*. mars 2016;75(3):623-6.
323. 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.
324. Nguyen JK, Austin E, Huang A, Mamalis A, Jagdeo J. The IL-4/IL-13 Axis in Skin Fibrosis and Scarring: Mechanistic Concepts and Therapeutic Targets. *Arch Dermatol Res*. mars 2020;312(2):81-92.
325. 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*. juin 2011;139(3):249-57.
326. Radstake TRDJ, Bon L van, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, et al. The Pronounced Th17 Profile in Systemic Sclerosis (SSc) Together with Intracellular Expression of TGF β and IFN γ Distinguishes SSc Phenotypes. *PLOS ONE*. 17 juin 2009;4(6):e5903.
327. 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.
328. Slobodin G, Rimar D. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. avr 2017;52(2):194-201.

329. 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):946-955.e9.
330. Yan C, Richmond A. Th9 and Th17 cells: the controversial twins in cancer immunity. *J Clin Invest.* 130(7):3409-11.
331. Rojas-Zuleta WG, Vásquez G. Th9 lymphocytes: A recent history from IL-9 to its potential role in rheumatic diseases. *Autoimmun Rev.* 1 juill 2016;15(7):649-55.
332. Guggino G, Lo Pizzo M, Di Liberto D, Rizzo A, Cipriani P, Ruscitti P, et al. Interleukin-9 over-expression and T helper 9 polarization in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Immunol.* 2017;190(2):208-16.
333. Li G, Larregina AT, Domsic RT, Stolz DB, Medsger TA, Lafyatis R, et al. Skin-Resident Effector Memory CD8+CD28- T Cells Exhibit a Profibrotic Phenotype in Patients with Systemic Sclerosis. *J Invest Dermatol.* 2017;137(5):1042-50.
334. Fuschiotti P, Larregina AT, Ho J, Feghali-Bostwick C, Medsger TA. IL-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* janv 2013;65(1):236-46.
335. Dumoitier N, Chaigne B, Régent A, Lofek S, Mhibik M, Dorfmueller P, et al. Scleroderma Peripheral B Lymphocytes Secrete Interleukin-6 and Transforming Growth Factor β and Activate Fibroblasts. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* mai 2017;69(5):1078-89.
336. 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.
337. 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.
338. Abdel-Magied RA, Kamel SR, Said AF, Ali HM, Abdel Gawad EA, Moussa MM. Serum interleukin-6 in systemic sclerosis and its correlation with disease parameters and cardiopulmonary involvement. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis Off J WASOG.* 23 déc 2016;33(4):321-30.
339. Negi VS, Elluru S, Sibérl S, Graff-Dubois S, Mouthon L, Kazatchkine MD, et al. Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. *J Clin Immunol.* mai 2007;27(3):233-45.
340. Chaigne B, Rodeia S, Benmostefa N, Bérézné A, Authier J, Cohen P, et al. Corticosteroid-sparing benefit of intravenous immunoglobulin in systemic sclerosis-associated myopathy: A comparative study in 52 patients. *Autoimmun Rev.* janv 2020;19(1):102431.
341. Agostini E, De Luca G, Bruni C, Bartoli F, Tofani L, Campochiaro C, et al. Intravenous immunoglobulins reduce skin thickness in systemic sclerosis: evidence from Systematic Literature Review and from real life experience. *Autoimmun Rev.* déc 2021;20(12):102981.
342. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kühl AA, Günther J, Radic M, et al. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther.* 28 janv 2014;16(1):R29.
343. Rodnan GP, Benedek TG. An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma). *Ann Intern Med.* août 1962;57:305-19.
344. 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.

345. Huang M, Liu Z, Baugh L, DeFuria J, Maione A, Smith A, et al. Lysyl oxidase enzymes mediate TGF- β 1-induced fibrotic phenotypes in human skin-like tissues. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* avr 2019;99(4):514-27.
346. Desmouliere A, Darby IA, Laverdet B, Bonté F. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* nov 2014;301.
347. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AMJ, Langelier Y, et al. Novel Fibrogenic Pathways Are Activated in Response to Endothelial Apoptosis: Implications in the Pathophysiology of Systemic Sclerosis. *J Immunol.* 1 mai 2005;174(9):5740-9.
348. 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.
349. Tsou PS, Balogh B, Pinney AJ, Zakhem G, Lozier A, Amin MA, et al. Lipoic acid plays a role in scleroderma: insights obtained from scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(5):411.
350. Lafyatis R. Transforming growth factor β --at the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* déc 2014;10(12):706-19.
351. Higley H, Persichitte K, Chu S, Waegell W, Vancheeswaran R, Black C. Immunocytochemical Localization and Serologic Detection of Transforming Growth Factor β 1. *Arthritis Rheum.* 1994;37(2):278-88.
352. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juin 1986;83(12):4167-71.
353. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF- β : Regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* mars 1992;41(3):557-9.
354. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, et al. Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* août 1995;105(2):280-4.
355. Chujo S, Shirasaki F, Kondo-Miyazaki M, Ikawa Y, Takehara K. Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis. *J Cell Physiol.* juill 2009;220(1):189-95.
356. Makino K, Makino T, Stawski L, Lipson KE, Leask A, Trojanowska M. Anti-connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) monoclonal antibody attenuates skin fibrosis in mice models of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 13 juin 2017;19(1):134.
357. Kawaguchi Y, Suzuki K, Hara M, Hidaka T, Ishizuka T, Kawagoe M, et al. Increased endothelin-1 production in fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* août 1994;53(8):506-10.
358. Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, Holmes AM, Bou-Gharios G, Pearson JD, et al. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol.* mars 2001;116(3):417-25.
359. Soldano S, Pizzorni C, Paolino S, Trombetta AC, Montagna P, Brizzolara R, et al. Alternatively Activated (M2) Macrophage Phenotype Is Inducible by Endothelin-1 in Cultured Human Macrophages. *PLOS ONE.* 15 nov 2016;11(11):e0166433.
360. Yamakage A., Kikuchi K., Smith E.A., LeRoy E.C., Trojanowska M. Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med.* 1 mai 1992;175(5):1227-34.

361. 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.
362. Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology.* 1 oct 2008;47(suppl_5):v2-4.
363. 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.
364. Shroff A, Mamalis A, Jagdeo J. Oxidative Stress and Skin Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.* 2014;2(4):257-67.
365. Bourji K, Meyer A, Chatelus E, Pincemail J, Pigatto E, Defraigne JO, et al. High reactive oxygen species in fibrotic and nonfibrotic skin of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Free Radic Biol Med.* oct 2015;87:282-9.
366. 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.* 1 mai 2009;182(9):5855-64.
367. van Caam A, Vonk M, van den Hoogen F, van Lent P, van der Kraan P. Unraveling SSc Pathophysiology; The Myofibroblast. *Front Immunol* 2018 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02452>
368. Manetti M, Romano E, Rosa I, Guiducci S, Bellando-Randone S, De Paulis A, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* mai 2017;76(5):924-34.
369. Thuan DTB, Zayed H, Eid AH, Abou-Saleh H, Nasrallah GK, Mangoni AA, et al. A Potential Link Between Oxidative Stress and Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 19 sept 2018;9:1985.
370. Patschan S, Tampe D, Müller C, Seitz C, Herink C, Müller GA, et al. Early Endothelial Progenitor Cells (eEPCs) in systemic sclerosis (SSc) - dynamics of cellular regeneration and mesenchymal transdifferentiation. *BMC Musculoskelet Disord.* 12 août 2016;17:339.
371. Wang Y, Fan PS, 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.
372. Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, et al. Fibrosis, vascular activation, and immune abnormalities resembling systemic sclerosis in bleomycin-treated Fli-1-haploinsufficient mice. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* févr 2015;67(2):517-26.
373. Nakamura M, Tokura Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci.* janv 2011;61(1):7-13.
374. O'Kane D, Jackson MV, Kissenpfennig A, Spence S, Damkat-Thomas L, Tolland JP, et al. SMAD inhibition attenuates epithelial to mesenchymal transition by primary keratinocytes in vitro. *Exp Dermatol.* juill 2014;23(7):497-503.
375. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(5):R1113-1123.
376. Cipriani P, Di Benedetto P, Ruscitti P, Liakouli V, Berardicurti O, Carubbi F, et al. Perivascular Cells in Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis Overexpress Activated ADAM12 and Are Involved in Myofibroblast Transdifferentiation and Development of Fibrosis. *J Rheumatol.* juill 2016;43(7):1340-9.

377. Cutolo M, Soldano S, Montagna P, Trombetta AC, Contini P, Ruaro B, et al. Effects of CTLA4-Ig treatment on circulating fibrocytes and skin fibroblasts from the same systemic sclerosis patients: an in vitro assay. *Arthritis Res Ther*. 27 juill 2018;20(1):157.
378. Tourkina E, Bonner M, Oates J, Hofbauer A, Richard M, Znoyko S, et al. Altered monocyte and fibrocyte phenotype and function in scleroderma interstitial lung disease: reversal by caveolin-1 scaffolding domain peptide. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 1 juill 2011;4(1):15.
379. Marangoni RG, Korman BD, Wei J, Wood TA, Graham LV, Whitfield ML, et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. avr 2015;67(4):1062-73.
380. Frangogiannis NG. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med*. 20 févr 2020;217(3):e20190103.
381. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol*. janv 1998;110(1):47-51.
382. Nakerakanti S, Trojanowska M. The Role of TGF- β Receptors in Fibrosis. *Open Rheumatol J*. 15 juin 2012;6:156-62.
383. Pannu J, Asano Y, Nakerakanti S, Smith E, Jablonska S, Blaszczyk M, et al. Smad1 pathway is activated in systemic sclerosis fibroblasts and is targeted by imatinib mesylate. *Arthritis Rheum*. août 2008;58(8):2528-37.
384. Dees C, Pötter S, Zhang Y, Bergmann C, Zhou X, Lubber M, et al. TGF- β -induced epigenetic deregulation of SOCS3 facilitates STAT3 signaling to promote fibrosis. *J Clin Invest*. 1 mai 2020;130(5):2347-63.
385. 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.
386. Wei J, Ghosh AK, Sargent JL, Komura K, Wu M, Huang QQ, et al. PPAR γ downregulation by TGF β in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis. *PloS One*. 2 nov 2010;5(11):e13778.
387. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68-75.
388. 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.
389. Dees C, Schlottmann I, Funke R, Distler A, Palumbo-Zerr K, Zerr P, et al. The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. juin 2014;73(6):1232-9.
390. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun*. 13 mars 2012;3(1):735.
391. 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.
392. 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.

393. Leask A, Denton CP, Abraham DJ. Insights Into the Molecular Mechanism of Chronic Fibrosis: The Role of Connective Tissue Growth Factor in Scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1 janv 2004;122(1):1-6.
394. Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, Leask A, Bradham D, Beauchamp JR, et al. Autocrine Overexpression of CTGF Maintains Fibrosis: RDA Analysis of Fibrosis Genes in Systemic Sclerosis. *Exp Cell Res.* 25 août 2000;259(1):213-24.
395. Nakerakanti SS, Bujor AM, Trojanowska M. CCN2 Is Required for the TGF- β Induced Activation of Smad1 - Erk1/2 Signaling Network. *PLOS ONE.* 8 juill 2011;6(7):e21911.
396. Shi-Wen X, Rodríguez-Pascual F, Lamas S, Holmes A, Howat S, Pearson JD, et al. Constitutive ALK5-Independent c-Jun N-Terminal Kinase Activation Contributes to Endothelin-1 Overexpression in Pulmonary Fibrosis: Evidence of an Autocrine Endothelin Loop Operating through the Endothelin A and B Receptors. *Mol Cell Biol.* juill 2006;26(14):5518-27.
397. Shi-wen X, Kennedy L, Renzoni EA, Bou-Gharios G, du Bois RM, Black CM, et al. Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts. *Arthritis Rheum.* déc 2007;56(12):4189-94.
398. Cipriani P, Di Benedetto P, Ruscitti P, Verzella D, Fischietti M, Zazzeroni F, et al. Macitentan inhibits the transforming growth factor- β profibrotic action, blocking the signaling mediated by the ETR/T β RI complex in systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):247.
399. Xu S wen, 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.
400. Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, Fukasawa C, Sugiura T, Nishimagi E, et al. Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors. *Arthritis Rheum.* janv 2004;50(1):216-26.
401. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertens Dallas Tex* 1979. sept 2000;36(3):330-6.
402. Marut W, Jamier V, Kavian N, Servettaz A, Winyard PG, Eggleton P, et al. The natural organosulfur compound dipropyltetrasulfide prevents HOCl-induced systemic sclerosis in the mouse. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R167.
403. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 30 mars 2001;276(13):10229-33.
404. Bhattacharyya S, Tamaki Z, Wang W, Hinchcliff M, Hoover P, Getsios S, et al. FibronectinEDA promotes chronic cutaneous fibrosis through Toll-like receptor signaling. *Sci Transl Med.* 16 avr 2014;6(232):232ra50.
405. Oriente A, Fedarko NS, Pacocha SE, Huang SK, Lichtenstein LM, Essayan DM. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther.* mars 2000;292(3):988-94.
406. O'Reilly S, Ciechomska M, Fullard N, Przyborski S, van Laar JM. IL-13 mediates collagen deposition via STAT6 and microRNA-135b: a role for epigenetics. *Sci Rep.* 26 avr 2016;6(1):25066.
407. Postlethwaite, . Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady- state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol.* 1 févr 1988;106(2):311-8.
408. Kirk TZ, Mayes MD. IL-1 rescues scleroderma myofibroblasts from serum-starvation-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 5 févr 1999;255(1):129-32.

409. Kaviani N, Servettaz A, Marut W, Nicco C, Chéreau C, Weill B, et al. Sunitinib inhibits the phosphorylation of platelet-derived growth factor receptor β in the skin of mice with scleroderma-like features and prevents the development of the disease. *Arthritis Rheum.* juin 2012;64(6):1990-2000.
410. Svegliati S, Cancellato 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.
411. Svegliati Baroni S, 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.
412. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM. Endogenous IL-1 α from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest.* mai 1999;103(9):1253-60.
413. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Tamaki K. Increased expression of integrin α v β 5 induces the myofibroblastic differentiation of dermal fibroblasts. *Am J Pathol.* févr 2006;168(2):499-510.
414. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Increased Expression of Integrin α v β 3 Contributes to the Establishment of Autocrine TGF- β Signaling in Scleroderma Fibroblasts. *J Immunol.* 1 déc 2005;175(11):7708-18.
415. Ho YY, Lagares D, Tager AM, Kapoor M. Fibrosis—a lethal component of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* juill 2014;10(7):390-402.
416. Shi-wen X, Thompson K, Khan K, Liu S, Murphy-Marshman H, Baron M, et al. Focal adhesion kinase and reactive oxygen species contribute to the persistent fibrotic phenotype of lesional scleroderma fibroblasts. *Rheumatol Oxf Engl.* déc 2012;51(12):2146-54.
417. Lagares D, Busnadiego O, García-Fernández RA, Kapoor M, Liu S, Carter DE, et al. Inhibition of focal adhesion kinase prevents experimental lung fibrosis and myofibroblast formation. *Arthritis Rheum.* mai 2012;64(5):1653-64.
418. Akhmetshina A, Dees C, Pilecky M, Szucs G, Spriewald BM, Zwerina J, et al. Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* août 2008;58(8):2553-64.
419. Jiang C, Huang H, Liu J, Wang Y, Lu Z, Xu Z. Fasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Int J Mol Sci.* 4 juill 2012;13(7):8293-307.
420. Bhattacharyya S, Fang F, Tourtellotte W, Varga J. Egr-1: new conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). *J Pathol.* janv 2013;229(2):286-97.
421. Dooley A, Shi-Wen X, Aden N, Tranah T, Desai N, Denton CP, et al. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. *Rheumatol Oxf Engl.* nov 2010;49(11):2024-36.
422. 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.
423. Christner PJ, Peters J, Hawkins D, Siracusa LD, Jiménez SA. The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum.* déc 1995;38(12):1791-8.
424. Zhang Y, Zhu H, Layritz F, Luo H, Wohlfahrt T, Chen CW, et al. Recombinant Adenosine Deaminase Ameliorates Inflammation, Vascular Disease, and Fibrosis in Preclinical Models of Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(8):1385-95.

425. Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, et al. Endothelial Fli1 Deficiency Impairs Vascular Homeostasis. *Am J Pathol.* avr 2010;176(4):1983-98.
426. 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.
427. Denton CP, Zheng B, Evans LA, Shi-wen X, Ong VH, Fisher I, et al. Fibroblast-specific expression of a kinase-deficient type II transforming growth factor beta (TGFbeta) receptor leads to paradoxical activation of TGFbeta signaling pathways with fibrosis in transgenic mice. *J Biol Chem.* 4 juill 2003;278(27):25109-19.
428. 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.* 1 sept 2014;73(9):1700-9.
429. 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.
430. Phan SH, Thrall RS, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: biochemical demonstration of increased rate of collagen synthesis. *Am Rev Respir Dis.* mars 1980;121(3):501-6.
431. Stawski L, Han R, Bujor AM, Trojanowska M. Angiotensin II induces skin fibrosis: a novel mouse model of dermal fibrosis. *Arthritis Res Ther.* 22 août 2012;14(4):R194.
432. Claman HN, Jaffee BD, Huff JC, Clark RA. 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.* août 1985;94(1):73-84.
433. Cid MC, Cebrián M, Font C, Coll-Vinent B, Hernández-Rodríguez J, Esparza J, et al. Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis: Inflammation-induced angiogenesis as the preferential site of leukocyte–endothelial cell interactions. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):184-94.
434. Hadjadj J, Canaud G, Mirault T, Samson M, Bruneval P, Régent A, et al. mTOR pathway is activated in endothelial cells from patients with Takayasu arteritis and is modulated by serum immunoglobulin G. *Rheumatol Oxf Engl.* 1 juin 2018;57(6):1011-20.
435. Maciejewski-Duval A, Comarmond C, Leroyer A, Zaidan M, Le Joncour A, Desbois AC, et al. mTOR pathway activation in large vessel vasculitis. *J Autoimmun.* nov 2018;94:99-109.
436. Kikuchi K, Kadono T, Ihn H, Sato S, Igarashi A, Nakagawa H, et al. Growth Regulation in Scleroderma Fibroblasts: Increased Response to Transforming Growth Factor-β1. *J Invest Dermatol.* juill 1995;105(1):128-32.
437. Korosec A, Frech S, Gesslbauer B, Vierhapper M, Radtke C, Petzelbauer P, et al. Lineage Identity and Location within the Dermis Determine the Function of Papillary and Reticular Fibroblasts in Human Skin. *J Invest Dermatol.* févr 2019;139(2):342-51.
438. Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol.* avr 2011;57(4):376-9.
439. Landry NM, Rattan SG, Dixon IMC. An Improved Method of Maintaining Primary Murine Cardiac Fibroblasts in Two-Dimensional Cell Culture. *Sci Rep.* 9 sept 2019;9(1):12889.

440. Jafarinejad-Farsangi S, Gharibdoost F, Farazmand A, Kavosi H, Jamshidi A, Karimizadeh E, et al. MicroRNA-21 and microRNA-29a modulate the expression of collagen in dermal fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity*. mai 2019;52(3):108-16.
441. Ayers NB, Sun CM, Chen SY. Transforming growth factor- β signaling in systemic sclerosis. *J Biomed Res*. 26 janv 2018;32(1):3-12.
442. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. juin 2015;4(3):215-66.
443. Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, Kooten CV, et al. TGF- β 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int*. 1 févr 2001;59(2):579-92.
444. Lawrence A, Khanna D, Misra R, Aggarwal A. Increased expression of basic fibroblast growth factor in skin of patients with systemic sclerosis. *Dermatol Online J*. 27 janv 2006;12(1):2.
445. Hance AJ, Crystal RG. Rigid control of synthesis of collagen Types I and III by cells in culture. *Nature*. juill 1977;268(5616):152-4.
446. Meng X ming, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. juin 2016;12(6):325-38.
447. De Pieri A, Korman BD, Jünger A, Wuertz-Kozak K. Engineering Advanced In Vitro Models of Systemic Sclerosis for Drug Discovery and Development. *Adv Biol*. 2021;5(4):2000168.
448. Nakamura Y, Noma M, Kidokoro M, Kobayashi N, Takei M, Kurashima S, et al. Expression of CD33 Antigen on Normal Human Activated T Lymphocytes. *Blood*. 1 mars 1994;83(5):1442-3.
449. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. août 2002;2(8):569-79.
450. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 9 mars 2017;168(6):960-76.
451. Liang M, Lv J, Chu H, Wang J, Chen X, Zhu X, et al. Vertical inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling demonstrates in vitro and in vivo anti-fibrotic activity. *J Dermatol Sci*. nov 2014;76(2):104-11.
452. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. août 2010;62(8):2476-87.
453. Su TIK, Khanna D, Furst DE, Danovitch G, Burger C, Maranian P, et al. Rapamycin versus methotrexate in early diffuse systemic sclerosis: results from a randomized, single-blind pilot study. *Arthritis Rheum*. déc 2009;60(12):3821-30.
454. Shi JH, Guan H, Shi S, Cai WX, Bai XZ, Hu XL, et al. Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. *Arch Dermatol Res*. mai 2013;305(4):341-52.
455. Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Tanaka R, Miyazaki J, Yamamoto K. In vivo IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung. *Thorax*. oct 2006;61(10):886-94.
456. Tsou PS, Sawalha AH. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B: a key mediator and an emerging therapeutic target in autoimmune diseases. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. juill 2020;34(7):8810-23.

457. Yu B, Sondag GR, Malcuit C, Kim MH, Safadi FF. Macrophage-Associated Osteoactivin/GPNMB Mediates Mesenchymal Stem Cell Survival, Proliferation, and Migration Via a CD44-Dependent Mechanism. *J Cell Biochem.* juill 2016;117(7):1511-21.
458. Ramani V, Chung JS, Ariizumi K, Cruz PD. Soluble DC-HIL/Gpnmb Modulates T-Lymphocyte Extravasation to Inflamed Skin. *J Invest Dermatol.* mai 2022;142(5):1372-1380.e5.
459. Palisoc PJ, Vaikutis L, Gurrea-Rubio M, Model EN, O'mara MM, Ory S, et al. Functional Characterization of Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma Protein B in Scleroderma Fibrosis. *Front Immunol.* 2022;13:814533.
460. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST: Role in Biology. *Annu Rev Immunol.* 1998;16(1):27-55.
461. Nagatani Y, Funakoshi Y, Suto H, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, et al. Immunosuppressive effects and mechanisms of three myeloid-derived suppressor cells subsets including monocytic-myeloid-derived suppressor cells, granulocytic-myeloid-derived suppressor cells, and immature-myeloid-derived suppressor cells. *J Cancer Res Ther.* sept 2021;17(4):1093-100.
462. Park MJ, Moon SJ, Lee EJ, Jung KA, Kim EK, Kim DS, et al. IL-1-IL-17 Signaling Axis Contributes to Fibrosis and Inflammation in Two Different Murine Models of Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:1611.
463. Yamashita T, Asano Y, Taniguchi T, Nakamura K, Saigusa R, Takahashi T, et al. A potential contribution of altered cathepsin L expression to the development of dermal fibrosis and vasculopathy in systemic sclerosis. *Exp Dermatol.* avr 2016;25(4):287-92.
464. Prowse R k., Chaplin P, Robinson HC, Spithill TW. *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunol.* 2002;24(2):57-66.
465. Hu Y, Guo1 L, Zhang2 KG and M. Study on the Mechanism of Cathepsin L on the Activation of M1 Macrophages in Sepsis-induced Acute Renal Injury. *Indian J Pharm Sci.* 30 juill 2020;0(0):102-7.
466. Lee SY, Lee CM, Ma B, Kamle S, Elias JA, Zhou Y, et al. Targeting Chitinase 1 and Chitinase 3-Like 1 as Novel Therapeutic Strategy of Pulmonary Fibrosis. *Front Pharmacol.* <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.826471>
467. Zhou Y, Peng H, Sun H, Peng X, Tang C, Gan Y, et al. Chitinase 3-like 1 suppresses injury and promotes fibroproliferative responses in Mammalian lung fibrosis. *Sci Transl Med.* 11 juin 2014;6(240):240ra76.
468. Kwak EJ, Hong JY, Kim MN, Kim SY, Kim SH, Park CO, et al. Chitinase 3-like 1 drives allergic skin inflammation via Th2 immunity and M2 macrophage activation. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* nov 2019;49(11):1464-74.
469. Kypreou KP, Kavvadas P, Karamessinis P, Peroulis M, Alberti A, Sideras P, et al. Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis. *PROTEOMICS.* 2008;8(12):2407-19.
470. Rizvi Q, Zaidi U, Shahid S, Ahmed S, Shamsi T. Homozygous CALR Mutation in Primary Myelofibrosis and Its Effect on Disease Phenotype: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Hematol.* 20 janv 2019;2019:1-4.
471. Zhou Y, He CH, Yang DS, Nguyen T, Cao Y, Kamle S, et al. Galectin-3 Interacts with the CHI3L1 Axis and Contributes to Hermansky–Pudlak Syndrome Lung Disease. *J Immunol.* 15 mars 2018;200(6):2140-53.
472. Maiorano G, Sabella S, Sorce B, Brunetti V, Malvindi MA, Cingolani R, et al. Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein–Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response. *ACS Nano.* 28 déc 2010;4(12):7481-91.

473. Sioud M. New insights into mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression through galectins. *Scand J Immunol.* févr 2011;73(2):79-84.
474. Baum LG, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, et al. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin Immunol Orlando Fla.* déc 2003;109(3):295-307.
475. Mora GF, Zubieta MR. Galectin-1 and Galectin-3 Expression in Lesional Skin of Patients With Systemic Sclerosis-Association With Disease Severity. *J Clin Rheumatol Pract Rep Rheum Musculoskelet Dis.* 1 déc 2021;27(8):317-23.
476. Tian Y, Yuan W, Li J, Wang H, Hunt MG, Liu C, et al. TGF β regulates Galectin-3 expression through canonical Smad3 signaling pathway in nucleus pulposus cells: implications in intervertebral disc degeneration. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* mars 2016;50:39-52.
477. Chagué C, Gautier T, Dal Zuffo L, Pais de Barros J, Wetzel A, Tarris G, et al. High-density lipoprotein infusion protects from acute graft-versus-host disease in experimental allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Am J Transplant.* mai 2022;22(5):1350-61.
478. Pers YM, Bony C, Duroux-Richard I, Bernard L, Maumus M, Assou S, et al. miR-155 Contributes to the Immunoregulatory Function of Human Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol.* 2021;12:624024.
479. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1 nov 2010;38(20):7248-59.
480. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol.* <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00402>
481. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 1 févr 2021;78(4):1233-61.

ANNEXES

Publications scientifiques

Hélène Greigert, André Ramon, **Coraline Genet**, Claire Gerard, Claudie Cladiere, Marion Ciudad, Louis Arnould, Catherine Creuzot-Garcher, Laurent Martin, Georges Tarris, Sethi Ouandji, Sylvain Audia, Maria Cinta Cid, Bernard Bonnotte, Maxime Samson. Neointimal myofibroblasts maintain Th1 and Tc1 inflammation in giant cell arteritis. Soumis dans *Annals of the Rheumatic Diseases*, October 2022

Baptiste Lamarthée, **Coraline Genet**, Florine Cattin, Richard Danger, Magali Giral, Sophie Brouard, Elisabet Van Loon, Jasper Callemeyn, Maarten Naesens, Dany Anglicheau, Bernard Bonnotte, Mathieu Legendre, Jean-Michel Rebibou and Claire Tinel. Single-cell mapping of leukocyte immunoglobulin-like receptors in kidney transplant rejection, *Frontiers in Transplantation*, August 2022

Eva Michaud, Louis Waeckel, Rémi Gayet, Roman Goguyer-Deschaumes, Blandine Chanut, Fabienne Jospin, Katell Bathany, Magali Monnoye, **Coraline Genet**, Amelie Prier, Caroline Tokarski, Philippe Gérard, Xavier Roblin, Nicolas Rochereau, Stéphane Paul. Alteration of microbiota antibody-mediated immune selection contributes to dysbiosis in inflammatory bowel diseases. *EMBO Molecular Medicine*, August 2022

Claire Gérard, Marine Thébault, Baptiste Lamarthée, **Coraline Genet**, Florine Cattin, Andréa Brazdova, Nona Janikashvili, Claudie Cladière, Marion Ciudad, Séthi Ouandji, Thibault Ghesquière, Hélène Greigert, Claire Tinel, Olivier Adotevi, Philippe Saas, Maxime Samson, Sylvain Audia and Bernard Bonnotte. Human Monocyte-Derived Suppressor Cell Supernatant Induces Immunoregulatory Effects and Mitigates xenoGvHD. *Frontiers Immunology*, March 2022

Maxime Samson, Hélène Greigert, Marion Ciudad, Claire Gerard, Thibault Ghesquière, Malika Trad, Marc Corbera-Bellalta, **Coraline Genet**, Sethi Ouandji, Claudie Cladière, Marine Thebault, Kim Heang Ly, Eric Liozon, François Maurier, Boris Bienvenu, Benjamin Terrier, Loïc Guillevin, Pierre Charles, Valérie Quipourt, Hervé Devilliers, Pierre-Henry Gabrielle, Catherine Creuzot-Garcher, Georges Tarris, Laurent Martin, Philippe Saas, Sylvain Audia, Maria Cinta Cid, Bernard Bonnotte. Improvement of Treg immune response after treatment with tocilizumab in Giant Cell Arteritis. *Clinical & Translational Immunology*, August 2021

Thibault Ghesquière, Marion Ciudad, André Ramon, Hélène Greigert, Claire Gerard, Claudie Cladière, Marine Thébault, **Coraline Genet**, Hervé Devilliers, François Maurier, Paul Ornetti, Valérie Quipourt, Pierre-Henry Gabrielle, Catherine Creuzot-Garcher, Georges Tarris, Laurent Martin, Agnès Soudry-Faure, Philippe Saas, Sylvain Audia, Bernard Bonnotte, Maxime Samson. Mucosal Associated Invariant T cells in Giant Cell Arteritis. *Journal of Autoimmunity*, May 2021

Communications orales et affichées

- Communication orale au congrès INCIT à Nantes, septembre 2022
- Communication orale à la journée des Fourmis de la Recherche, INSERM U1098, mai 2022
- Présentation d'un poster au forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, juin 2021
- Communication grand public, Fête de la Science éditions 2021 et 2022, Besançon

Encadrement

- Etudiant en 3^{ème} année de Licence Biochimie et Biologie Moléculaire, stage de 1 semaine
- Etudiante en 3^{ème} année de Licence Biochimie et Biologie Moléculaire, stage de 1 mois
- Etudiant en Master 1 Biologie santé, stage de 2 mois

Résumé

HuMoSC, une nouvelle thérapie pour le traitement des maladies dysimmunitaires et fibrosantes

Mots clés : cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes ; immunorégulation ; remodelage vasculaire ; fibrose ; artérite à cellules géantes ; sclérodémie systémique

Notre équipe a développé une méthode expérimentale pour générer des cellules immunosuppressives d'origine monocytaire baptisées les *Human Monocyte-derived Suppressor Cells* (HuMoSC). Si leurs propriétés immunosuppressives ont déjà été montrées, aucune étude n'avait encore évalué leurs intérêts sur le remodelage tissulaire.

L'objectif de cette thèse était d'une part, d'évaluer le potentiel thérapeutique des HuMoSC et de leur surnageant pour le traitement du remodelage tissulaire. D'autre part, nous avons cherché à identifier les mécanismes d'action impliqués dans les fonctions du surnageant.

L'effet des HuMoSC a d'abord été évalué dans l'artérite à cellules géantes en utilisant un modèle de culture d'artères temporales *ex vivo*, puis dans un modèle de fibrose *in vitro* et *in vivo*, similaire à celle décrite dans la Sclérodémie Systémique.

Nos résultats ont montré que le surnageant de HuMoSC diminuait l'expression des protéines matricielles et des facteurs pro-fibrosants ainsi que la prolifération cellulaire.

En conclusion, ce travail de thèse a mis en avant les propriétés anti-remodelage du surnageant de HuMoSC, représentant ainsi un nouvel espoir dans le traitement des maladies fibrosantes.

HuMoSC, a new therapy for the treatment of auto-immune diseases and fibrosis

Keywords: myeloid derived suppressor cells ; immunoregulation; vascular remodeling ; fibrosis ; giant cell arteritis ; systemic sclerosis

Our team has developed an experimental method to generate immunosuppressive cells of monocyte origin called Human Monocyte-derived Suppressor Cells (HuMoSC). Although their immunosuppressive properties have already been shown, no study had yet evaluated their interest in tissue remodeling.

The objective of this thesis was to evaluate the therapeutic potential of HuMoSCs and their supernatant for the treatment of tissue remodeling. On the other hand, we sought to identify the mechanisms of action involved in the functions of the supernatant of HuMoSC.

The effect of HuMoSCs was first evaluated in giant cell arteritis using an *ex vivo* temporal artery culture model, and then in an *in vitro* and *in vivo* fibrosis model, similar to that described in Systemic Scleroderma.

Our results showed that HuMoSC supernatant decreased the expression of matrix proteins and pro-fibrosing factors as well as cell proliferation.

In conclusion, this thesis work has highlighted the anti-remodeling properties of HuMoSC supernatant, thus representing a new hope in the treatment of fibrosing diseases.