

.....

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université

Le mercredi 8 février 2023 par

Mélanie VELIER

Propriétés angiogéniques et antifibrotiques des cellules progénitrices de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux dans la sclérodermie systémique

Composition du jury

Discipline

Biologie Santé

Spécialité

Pathologie Vasculaire et Nutrition

École doctorale

ED62 Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire/Partenaires de recherche

Centre de Recherche en

Cardiovasculaire et Nutrition

Faculté de Pharmacie, Marseille



Florence SABATIER

Directeur de thèse

Aix-Marseille Université

Françoise DIGNAT-GEORGE

Président du jury

Aix-Marseille Université

Danièle BENSOUSSAN

Rapporteur

Université de Lorraine

Danièle NOËL

Rapporteur

INSERM U1183, Montpellier

Arnaud SCHERBERICH

Examineur

Hôpital universitaire de Bâle

Fabrice SONCIN

Examineur

CNRS, Université de Lille

Affidavit

Je soussignée, Mélanie VELIER, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Professeur Florence SABATIER, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 14 novembre 2022



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. Magalon J, **Velier M**, Simoncini S, François P, Bertrand B, Daumas A, Benyamine A, Boissier R, Arnaud L, Lyonnet L, Fernandez S, Dignat-George F, Casanova D, Guillet B, Granel B, Paul P, Sabatier F. Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. **2019** Mar;78(3):391-398
2. **Velier M**, Simoncini S, Abellan M, Francois P, Eap S, Lagrange A, Bertrand B, Daumas A, Granel B, Delorme B, Dignat George F, Magalon J, Sabatier F. Adipose-Derived Stem Cells from Systemic Sclerosis Patients Maintain Pro-Angiogenic and Antifibrotic Paracrine Effects In Vitro. *J Clin Med*. **2019** Nov 14;8(11):1979.
3. **Velier M**, Mattei A, Simoncini S, Magalon J, Giraudo L, Arnaud L, Giovanni A, Dignat-George F, Sabatier F, Gugatschka M, Grossmann T. Paracrine Effects of Adipose-Derived Cellular Therapies in an in Vitro Fibrogenesis Model of Human Vocal Fold Scarring. *J Voice*. **2022** Jun 13:S0892-1997(22)00145-X
4. **Velier M**, Daumas A, Simoncini S, Arcani R, Magalon J, Benyamine A, Granel B, Dignat George F, Chabannon C, Sabatier F. Combining systemic and locally applied cellular therapies for the treatment of systemic sclerosis. *Bone Marrow Transplant*. **2022** Jan;57(1):17-22.
5. Magalon J, **Velier M**, Simoncini S, Dignat-George F, Granel B, Paul P, Sabatier F. Response to: 'Adipose stromal vascular fraction and regenerative therapy in SSc: response to the article by Magalon *et al*' by De Benedetto *et al*. *Ann Rheum Dis*. **2020** May;79(5):e54.
6. **Velier M**, Magalon J, Simoncini S, Dignat-George F, Granel B, Paul P, Sabatier F. Response to: 'Could autologous adipose-derived stromal vascular fraction turn out an unwanted source of profibrotic myofibroblasts in systemic sclerosis?' by Manetti. *Ann Rheum Dis*. **2020** May;79(5):e56.
7. Magalon J., François P., **Velier M.**, Grimaud F., Veran J., Calmels B., Sabatier F. Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018, *Revue Francophone des Laboratoires* **2018** : 34-43

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. **Novembre 2019** : GFRS (Groupe Francophone de Recherche sur la Sclérodémie) – « Adipose-derived stem cells from systemic sclerosis patients maintain pro-angiogenic and antifibrotic paracrine effects *in vitro* »

Résumé

La Sclérodermie Systémique (ScS) est une maladie auto-immune rare caractérisée par une vasculopathie ischémique et des lésions de fibrose touchant la peau et les organes profonds. Les thérapeutiques conventionnelles sont limitées, justifiant la recherche de nouvelles stratégies. Notre équipe est pionnière dans le développement de la Fraction Vasculaire Stromale (FVS) du tissu adipeux autologue, concentré de cellules régénératives non adipocytaires, pour la prise en charge du handicap des mains et du visage de ces patients. Les résultats mitigés des essais cliniques imposent de mieux comprendre les propriétés biologiques sous-tendant l'efficacité thérapeutique de la FVS dans un contexte de ScS.

L'objectif de ce travail est de rechercher un éventuel impact du contexte autologue de la ScS sur le potentiel angiogénique et antifibrotique de la FVS et des progéniteurs mésenchymateux du tissu adipeux. Nous montrons que le potentiel angiogénique de la FVS extraite chez des patients sclérodermiques est maintenu, bien que légèrement réduit, et ce malgré la mise en évidence d'une signature transcriptomique différentielle. De plus, la FVS de donneurs sains permet de réduire l'expression de marqueurs de fibrose *in vitro*. Par ailleurs, les propriétés paracrines de la composante mésenchymateuse de la FVS de patients sclérodermiques sont similaires à celles de donneurs sains.

Au total, les résultats supportent le développement d'approches autologues dérivées du tissu adipeux dans la ScS. Ce travail ouvre des perspectives d'ingénierie cellulaire ou moléculaire dans le but de renforcer l'efficacité thérapeutique de ces produits de thérapie cellulaire.

Mots clés : Sclérodermie systémique, Fraction vasculaire stromale, Cellules souches mésenchymateuses, Thérapie cellulaire, Angiogenèse, Fibrose

Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is a rare autoimmune disease characterized by an ischemic vasculopathy and fibrosis of cutaneous tissue and visceral organs. Conventional therapies are limited, justifying the search for new strategies. Our team is a pioneer in the development of Stromal Vascular Fraction (SVF) from autologous adipose tissue, a concentrate of non-adipose regenerative cells, for the management of hand and facial disability in these patients. The mixed results of clinical trials require a better understanding of the biological properties underlying the therapeutic efficacy of SVF in the context of SSc.

The objective of this work is to investigate a possible impact of the autologous context of SSc on the angiogenic and antifibrotic potential of SVF and adipose-derived mesenchymal stem cells. We show that the angiogenic potential of SVF extracted from patients with SSc is maintained, albeit slightly reduced, despite the identification of a differential transcriptomic signature. Moreover, SVF from healthy donors induces a reduction in the expression of fibrosis markers *in vitro*. Furthermore, the paracrine properties of the mesenchymal component of SVF from patients suffering from SSc are similar to those from healthy donors.

Overall, the results support the development of autologous approaches derived from adipose tissue in SSc. This work opens perspectives of cell or molecular engineering approaches in order to enhance the therapeutic efficacy of these cell therapy products.

Keywords: Systemic sclerosis, Stromal vascular fraction, Mesenchymal stem cells, Cell therapy, Angiogenesis, Fibrosis

Remerciements

À Mesdames **Danièle BENSOUSSAN et Danièle NOËL,**

Qui me font l'honneur d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs ; veuillez trouver ici ma plus sincère reconnaissance.

À Monsieur **Arnaud SCHERBERICH**

Veuillez accepter ma gratitude pour avoir accepté de siéger à ce jury

À Monsieur **Fabrice SONCIN**

Je vous remercie de juger ce travail ainsi que pour la collaboration débutante très enthousiasmante

À Madame **Françoise DIGNAT-GEORGE**

Que je remercie pour son soutien inestimable, ces conseils précieux et sa disponibilité tout au long de mon parcours. Merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

À Madame **Florence SABATIER**

C'est un véritable honneur de travailler à vos côtés quotidiennement. Je vous adresse une nouvelle fois toute mon admiration et vous remercie pour vos conseils, vos encouragements et vos relectures depuis le début. Sachez que je suis extrêmement enthousiaste des projets qui se dessinent pour les années à venir !

À ma famille, pour leur amour

À mes amis, pour les rires et le soutien

À mes collègues universitaires et hospitaliers, pour les aventures

À Raphaël, pour tout ce que nous vivons

Table des matières

Affidavit	3
Liste de publications et participation aux conférences	4
Résumé	5
Abstract	6
Remerciements	7
Table des matières	9
Liste des abréviations	12
Index des figures	16
Index des tableaux	18
Avant-Propos	19
PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	20
1. Chapitre 1 : La Sclérodermie Systémique	21
1.1. Définition et épidémiologie	21
1.2. Mécanismes physiopathologiques	22
1.2.1. Etiologies et facteurs de risque	23
1.2.2. Vasculopathie	25
1.2.3. Désordres immunitaires et réponse inflammatoire	29
1.2.4. Dysfonctionnements fibroblastiques	31
1.3. Manifestations cliniques	36
1.3.1. Syndrome de Raynaud	36
1.3.2. Manifestations cutanées	36
1.3.3. Atteinte oro-faciale	38
1.3.4. Atteinte pulmonaire	38
1.3.5. Atteinte cardiaque	39
1.3.6. Atteinte rénale	39
1.3.7. Atteinte digestive	40
1.3.8. Atteinte de l'appareil locomoteur	40
1.4. Diagnostic et classifications	42
1.4.1. Examens paracliniques	42
1.4.2. Classifications	43
1.4.3. Evolution et pronostic	47
1.5. Modèles d'étude	48
1.5.1. Modèles précliniques de la sclérodermie systémique <i>in vivo</i>	48
1.5.2. Modèles d'étude <i>in vitro</i> de la dysfonction endothéliale au cours de la sclérodermie systémique	51

1.6.	Prise en charge thérapeutique	53
1.6.1.	Traitements symptomatiques	53
1.6.2.	Traitements immunomodulateurs	55
1.6.3.	Thérapies ciblées et biothérapies en cours d'évaluation	56
1.6.4.	Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques	60
2.	Chapitre 2 : Approches thérapeutiques dérivées du tissu adipeux dans la sclérodémie systémique	66
2.1.	Les Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses	66
2.1.1.	Historique et définition des CSM	66
2.1.2.	Propriétés des CSM	69
2.1.3.	Potentiel thérapeutique des CSM dans la ScS	76
2.1.4.	Hétérogénéité, challenges et perspectives autour des CSM	79
2.2.	Le Tissu Adipeux	83
2.2.1.	Le tissu adipeux brun et la thermogenèse adaptative	83
2.2.2.	Le tissu adipeux blanc	84
2.2.3.	Potentiel thérapeutique du tissu adipeux dans la ScS	90
2.3.	La Fraction Vasculaire Stromale du tissu adipeux	94
2.3.1.	Définition et réglementation	94
2.3.2.	Composition de la FVS	95
2.3.3.	Propriétés de la FVS	99
2.3.4.	Potentiel thérapeutique de la FVS dans la ScS	104
2.4.	Impact de la ScS sur les progéniteurs endothéliaux et mésenchymateux	108
2.4.1.	Impact sur les progéniteurs endothéliaux circulants	108
2.4.2.	Impact sur les progéniteurs mésenchymateux	110
	PARTIE 2 : REVUE DE LA LITTERATURE	113
	PARTIE 3 : RESULTATS EXPERIMENTAUX	121
1.	Contexte et objectifs du travail	122
2.	Articles originaux 1 et 2	124
3.	Article original 3	141
4.	Résultats complémentaires	160
4.1.	Contexte scientifique	160
4.2.	Matériels, méthodes et résultats	162
	PARTIE 4 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	171
	Annexes	179
	Annexe 1 : <i>Supplemental data</i> de l'article original n°1	180
	Annexe 2 : Réponse à Di Benedetto <i>et al.</i>	208
	Annexe 3 : Réponse à Manetti <i>et al.</i>	209
	Annexe 4 : Résultats complémentaires sur la micrograisse émulsifiée	210
1.	Contexte scientifique	210
2.	Matériels, méthodes et résultats	211
	Références bibliographiques	218

Liste des abréviations

AAN : Ac Anti-Nucléaires

Ac : Anticorps

ACE2 : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine 2

ACR : American College of Rheumatology

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

Ang : Angiopoïétines

ASC : Adipose-derived Stromal/stem Cells

ASC-DS : ASC de donneurs sains

ASC-ScS : ASC de patients sclérodermiques

ATMP : Advanced Therapy Medicinal Product

ATP : Adénosine Triphosphate

auto-Ac : auto-Anticorps

auto-CSH : autogreffe de CSH

BAFF : B cell-Activating Factor

BM-NC : Bone Marrow- Nucleated Cells

CEC : Cellules Endothéliales Circulantes

CFU-F : Colony Forming Unit-Fibroblasts

CHFS : Cochin Hand Function Scale

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNV : Cellules Nucléées Viables

COL1A2 : Collagène type I alpha 2

CRS : Crise Rénale aiguë Sclérodermique

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSM : Cellules Souches/stromales Mésoenchymateuses

CSM-MO : CSM de moelle osseuse

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

CVF : Capacité Vitale Forcée

CYC : Cyclophosphamide

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

DLCO : Diffusion Libre du monoxyde de carbone

d-ScS : formes cutanées diffuses de ScS

EBMT : European Society for Blood and Marrow Transplant Society

ECFC : Endothelial Colony Forming Cells

EFR : Explorations Fonctionnelles Respiratoires

EGFL7 : Epidermal Growth Factor-Like domain 7

Egr-1 : Early growth response-1

EMA : European Medicines Agency

ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated protein Kinase 1/2
ET-1 : Endothéline-1
EULAR : European League Against Rheumatism
EUSTAR : EULAR Scleroderma Trials And Research
FDA : Food and Drug Administration
FGF-2 : Fibroblast Growth Factor-2
Fli-1 : Friend leukemia integration factor-1
FoxP3 : Forkhead box P3
Fra-2 : Fos related antigen -2
FVS : Fraction Vasculaire Stromale
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GDF15 : Growth/Differentiation Factor 15
GFP : Green Fluorescent Protein
GLUT4 : Glucose Transporter 4
GvH : Graft versus Host
GvHD : Graft versus Host Disease
GVH-Scl : GVH sclérodermiforme
GWAS : Genome-Wide Association Studies
HAQ-DI: Health Assessment Questionnaire–Disability Index
HDMEC : Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
Hep-2 : Human epithelial cell line type-2
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor-1 α
hiPSC : human induced Pluripotent Stem Cell
HLA : Human Leukocyte Antigen
HOCl : Acide hypochloreux
HRP : HorseRadish Peroxidase
HTAP : Hypertension Artérielle Pulmonaire
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
IDO : Indoleamine 2,3 Dioxygenase
IFATS : International Federation for Adipose Therapeutics and Science
IFN γ : Interféron γ
IGF -1: Insulin-like Growth Factor-1
IL : Interleukine
IL-1RA : Antagoniste des Récepteurs de l'Interleukine-1
IMC : Indice de Masse Corporelle
IRF-5 : Interferon Regulatory Factor-5
ISCT : International Society for stem Cell Therapy
ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase
KDR : Kinase Domain Receptor
I-ScS : formes cutanées limitées de ScS

LyB : Lymphocytes B
LyNK : Lymphocytes NK
LyT : Lymphocytes T
MAC : Myeloid Angiogenic Cells
MATHEC : Maladies Auto-immunes et Thérapie Cellulaire
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MHISS : Mouth Handicap in Systemic Sclerosis Scale
MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha
MLR : Mixed Lymphocyte Reaction
MMF : Mycophénolate Mofétil
MMP : Métalloprotéinases Matricielles
MO : Moelle Osseuse
mRSS : Score de Rodnan modifié
MTI : Médicament de Thérapie Innovante
MTI-PP : MTI – Ponctuellement Préparé
NK : Natural Killer
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor -1
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PDGF-R : PDGF-Receptor
PE : Progéniteurs Endothéliaux
PECAM : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGE2 : Prostaglandine E2
PID : Pneumopathie Interstitielle Diffuse
POIC : Pseudo-Occlusion Intestinale Chronique
PPAR γ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
PRP : Plasma Riche en Plaquettes
PTX3 : Pentraxine 3
RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RGO : Reflux Gastro-Œsophagien
ROC : Receiver Operating Curve
ROS : Reactive Oxygen Species
RPL13 : Ribosomal Protein L13
ScS : Sclérodémie Systémique
s-Fractalkine : Fractalkine soluble
SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor-1
SHAQ : Scleroderma Health Assessment Questionnaire
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SphK1 : Sphingosine kinase 1
STAT-4 : Signal Transducer and Activator of Transcription-4

TA : Tissu Adipeux
TGF: Transforming Growth Factor
TGF β RII : récepteur au TGF β de type II
TIMP : Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TLR: Toll-Like Receptor
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
Tsk1 : Tight skin 1
UCP-1 : Uncoupling Protein-1
UD : Ulcères Digitaux
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VE-Cadhérine : Vascular Endothelial-Cadhérine
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : VEGF Receptor
 α 2AP : alpha2 Antiplasmine
 α SMA: alpha Smooth Muscle Actin

Index des figures

- Figure 1** : Physiopathologie de la ScS d'après Allanore *et al.*
- Figure 2** : Altération du *crosstalk* entre cellules endothéliales et cellules périvasculaires au cours de la ScS d'après Cipriani *et al.*
- Figure 3** : Sources cellulaires susceptibles de se différencier en myofibroblastes au cours de la ScS d'après van Caam *et al.*
- Figure 4** : Liens possibles entre la vasculopathie et la fibrose au cours de la ScS d'après Trojanowska *et al.*
- Figure 5** : Score de Rodnan modifié d'après Khanna *et al.*
- Figure 6** : Différents aspects cliniques du handicap de la main chez les patients sclérodermiques d'après Magalon *et al.*
- Figure 7** : Principales complications associées à la ScS d'après Denton et Khanna
- Figure 8** : Formes cutanées diffuses (à gauche) et limitées (à droite) de ScS d'après Denton et Khanna
- Figure 9** : Formes cliniques de ScS selon LeRoy et Medsger
- Figure 10** : Principales cibles thérapeutiques en cours d'évaluation dans la ScS d'après Campochiaro et Allanore
- Figure 11** : Protocole d'autogreffes de CSH d'après Muraro *et al.*
- Figure 12** : Courbes de survie des patients au cours de l'essai ASTIS d'après Laar *et al.*
- Figure 13** : Distribution du *Global Rank Composite Score* lors de l'essai SCOT à 54 mois d'après Sullivan *et al.*
- Figure 14** : Travaux pionniers sur les CSM, d'après Andrzejewska *et al.*
- Figure 15** : Critères de définition des CSM d'après l'ISCT
- Figure 16** : Fonctions immunomodulatrices des CSM d'après Nauta et Fibbe
- Figure 17** : Propriétés des CSM sous-tendant le rationnel thérapeutique dans la ScS d'après Usunier *et al.*
- Figure 18** : Challenges associés au développement de médicaments de thérapie innovante composés de CSM d'après Levy *et al.*
- Figure 19** : Répartition des principaux dépôts de tissu adipeux d'après Gesta *et al.*
- Figure 20** : Localisation des progéniteurs endothéliaux de type « ECFC » dans la paroi vasculaire et recrutement sur les sites endommagés d'après Banno et Yoder
- Figure 21** : Principales étapes soutenant l'adipogenèse d'après Ghaben et Scherer
- Figure 22** : Guérison progressive à 4 et 8 semaines des ulcères digitaux après injection de TA autologue d'après Del Papa *et al.*
- Figure 23** : Etapes d'obtention de la FVS par digestion enzymatique et centrifugation d'un prélèvement de tissu adipeux
- Figure 24** : Stratégie de cytométrie en flux pour l'analyse de la répartition cellulaire de la FVS du TA d'après François *et al.*
- Figure 25** : Photos représentatives d'implants de collagène chargés en progéniteurs endothéliaux (a), en ASC (b) ou en une combinaison des deux types cellulaires (c) à 14 jours post-implantation sous-cutanée chez la souris NOD/SCID d'après Traktuev *et al.*
- Figure 26** : *Crosstalk* entre CSM et progéniteurs endothéliaux dans les FVS d'après Bora et Majumdar

Figure 27 : Réduction de la cicatrice hypertrophique après l'administration de FVS et d'ASC (A) images représentatives des plaies (B) mesure de l'épaisseur cutanée à 7, 8 et 9 semaines d'après Domergue *et al.*

Figure 28 : Résultats cliniques de l'essai SCLERADEC jusqu'à 2 ans après l'injection de FVS autologue d'après Daumas *et al.*

Figure 29 : Evolution du score de la main de Cochin (*Cochin Hand Function Scale : CHFS*) au cours de l'essai SCLERADEC II d'après Daumas *et al.*

Figure 30 : Stratégie d'isolement des progéniteurs endothéliaux « ECFC » par séparation immunomagnétique depuis la FVS

Figure 31 : Niveaux d'expression de l'apeline et son récepteur APJ dans les ASC de donneurs sains (ASC-DS) et de patients sclérodermiques (ASC-ScS) évalués par (A) RT-qPCR, (B) Immunofluorescence et (C) Western Blot

Figure 32 : Cinétique de formation des structures pseudo-tubulaires par les cellules de FVS

Figure 33 : Profils angiogéniques *in vitro* de FVS sclérodermiques en réponse aux différentes modulations de la voie apelinergique

Figure 34 : Profils angiogéniques *in vitro* de FVS de donneurs sains en réponse aux différentes modulations de la voie apelinergique

Figure 35 : Dosage d'apeline sérique dans une cohorte de donneurs sains et patients sclérodermiques

Figure 36 : Principaux résultats obtenus sur les modulations de la voie apelinergique dans les progéniteurs du tissu adipeux au cours de la ScS

Figure 37 : Procédé d'émulsification de la micrograisse pour obtention de la *nanofat*

Figure 38 : Caractéristiques cellulaires générales de *nanofat* et de FVS enzymatiques issues de donneurs sains (n=9) : (A) Quantité de CNV par ml de TA, (B) Viabilité cellulaire, (C) Répartition cellulaire par approche de cytométrie en flux

Figure 39 : Caractéristiques cellulaires générales de *nanofat* de donneurs sains (n=9) et de patients sclérodermiques (n=7) : (A) Quantité de CNV par ml de TA, (B) Viabilité cellulaire, (C) Rendement de production de la *nanofat* et (D) Répartition cellulaire par approche de cytométrie en flux

Figure 40 : Photos représentatives des analyses histologiques et des immunomarquages réalisées sur le tissu adipeux et sur la *nanofat*

Index des tableaux

Tableau 1 : Critères diagnostiques de la ScS selon l'*American College of Rheumatology* définis en 1980

Tableau 2 : Critères de classification ACR/EULAR de la Sclérodémie Systémique en 2013

Tableau 3 : Principaux modèles précliniques génétiques et inductibles de la ScS d'après Batteux *et al.*

Tableau 4 : Facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les CSM d'après Bronckaers *et al.*

Tableau 5 : Phénotype des CSM quiescentes et des CSM après activation par l'IFN γ d'après Galipeau *et al.*

Tableau 6 : Principales molécules impliquées dans les fonctions vasculaires du tissu adipeux

Tableau 7 : Différences phénotypiques et clonogéniques entre les cellules mononucléées de la moelle osseuse et de la FVS d'après Bourin *et al.*

Tableau 8 : Principales populations cellulaires décrites dans la FVS et les phénotypes associés d'après la revue de Guo *et al.*

Tableau 9 : Vue d'ensemble des variations quantitatives de progéniteurs endothéliaux circulants décrites au cours de la ScS d'après Del Papa et Pignataro

Tableau 10 : Recommandations pour l'étude des progéniteurs endothéliaux circulants dans la ScS d'après Distler *et al.*

Tableau 11 : Résumé des échecs et succès d'isolement de progéniteurs endothéliaux depuis des FVS de donneurs sains (n=7) et sclérodermiques (n=8)

Tableau 12 : Concentrations d'un panel de molécules évaluées dans les sécrétomes de *nanofat* extraites de patients sclérodermiques (n=3) et de donneurs sains (n=6)

Avant-Propos

La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie auto-immune rare et sévère caractérisée par une vasculopathie et des lésions de fibrose touchant la peau et les organes profonds. Malgré le développement de nouvelles biothérapies, la morbi-mortalité de la ScS demeure importante de même que l'altération de la qualité de vie des patients. Ces observations conduisent à la nécessité de développer de nouvelles options thérapeutiques.

Parmi les nouvelles stratégies évaluées dans la ScS, les approches de thérapie cellulaire représentent un véritable espoir. En effet, l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est la seule intervention thérapeutique qui a démontré un bénéfice significatif sur la survie globale des patients atteints de formes sévères de ScS au cours de ces dernières années.

Alors que certaines approches de thérapie cellulaire administrées par voie systémique visent à réinitialiser le système immunitaire, le Laboratoire de Culture et Thérapie Cellulaire (Hôpital de la Conception, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille) du Pr Florence Sabatier s'est intéressé au développement de stratégies dérivées du tissu adipeux autologue ciblant un effet localisé susceptible de limiter notamment le handicap des mains. La découverte de cellules progénitrices endothéliales et mésenchymateuses au sein du tissu adipeux nous a conduit à évaluer l'injection de fraction vasculaire stromale du tissu adipeux autologue, concentré de cellules régénératives non adipocytaires, au niveau des doigts chez les patients atteints de ScS dans un essai de phase I puis de phase II. Les conclusions hétérogènes et parfois discordantes autour des essais évaluant les stratégies autologues dérivées du tissu adipeux dans la sclérodémie questionnent sur la pertinence d'une approche autologue dans une maladie systémique et nous conduisent à la nécessité de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces produits.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse dont l'objectif est de caractériser les propriétés biologiques et thérapeutiques de la fraction vasculaire stromale et des progéniteurs mésenchymateux du tissu adipeux dans le contexte sclérodermique. Ce travail a été réalisé au Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN), sous la direction du Pr Florence Sabatier, groupe dont la thématique de recherche est centrée sur la caractérisation *in vitro* et *in vivo* des mécanismes de régénération vasculaire impliquant les progéniteurs endothéliaux et leur possible utilisation comme modèle d'étude de la physiopathologie vasculaire ou comme nouveaux acteurs de l'angiogenèse thérapeutique.

PARTIE 1 : INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Chapitre 1 : La Sclérodermie Systémique

1.1. Définition et épidémiologie

La Sclérodermie Systémique (ScS) est une maladie auto-immune systémique appartenant au groupe des connectivites. Il s'agit d'une affection généralisée du tissu conjonctif caractérisée par des anomalies microvasculaires et des lésions de fibrose cutanée et/ou viscérale, dans un contexte auto-immun. C'est une maladie répondant à la définition des maladies rares selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dont la prévalence en Europe est estimée entre 50 et 150 cas par million d'individus et dont l'incidence annuelle est d'environ 13 cas pour un million d'individus¹. Cela représente un peu moins de 10 000 personnes en France^{2,3}.

Elle atteint avec prédilection les femmes (3 à 8 femmes pour 1 homme), néanmoins les hommes développent classiquement une forme plus sévère de la maladie⁴. La maladie peut survenir à tout âge mais il existe un pic de fréquence entre 45 et 60 ans. Chez l'enfant, la ScS est extrêmement rare et représente moins de 5% de l'ensemble des patients sclérodermiques¹.

Au cours de la ScS, il existe un risque de décès 3,5 fois plus élevé que chez un sujet sain de même âge. La ScS est actuellement la connectivite avec le moins bon pronostic⁵. L'évolution est plus sombre pour les formes cutanées diffuses ou pour les patients développant des atteintes au niveau des organes profonds (pulmonaires, digestives basses, rénales et cardiaques). La survie globale à 10 ans est de 55%⁶ et les données issues de la cohorte de l'EUSTAR (*European League Against Rheumatism (EULAR) Scleroderma Trials And Research*) rapportent une survie à 3 ans de 89%⁷. De plus, le retentissement social associé à l'atteinte cutanée n'est pas négligeable et participe significativement au handicap global de la maladie⁸.

1.2. Mécanismes physiopathologiques

La grande hétérogénéité clinique de la maladie rend complexe la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-tendant. Cependant, il est admis que la ScS repose sur un trépied pathogénique : (i) une atteinte microvasculaire précoce avec des phénomènes de remodelage vasculaire, (ii) la présence de processus inflammatoires et dysimmunitaires et (iii) le développement de lésions de fibrose (Figure 1). Le processus fibrotique, caractéristique de la ScS, est considéré comme la conséquence des réponses endothéliales et immunitaires. Il se traduit par une accumulation de Matrice ExtraCellulaire (MEC) au niveau du derme et/ou des organes touchés par la maladie. Une expression variable de ces trois composantes et des facteurs génétiques de prédisposition pourrait expliquer l'hétérogénéité clinique et pronostique de la maladie.

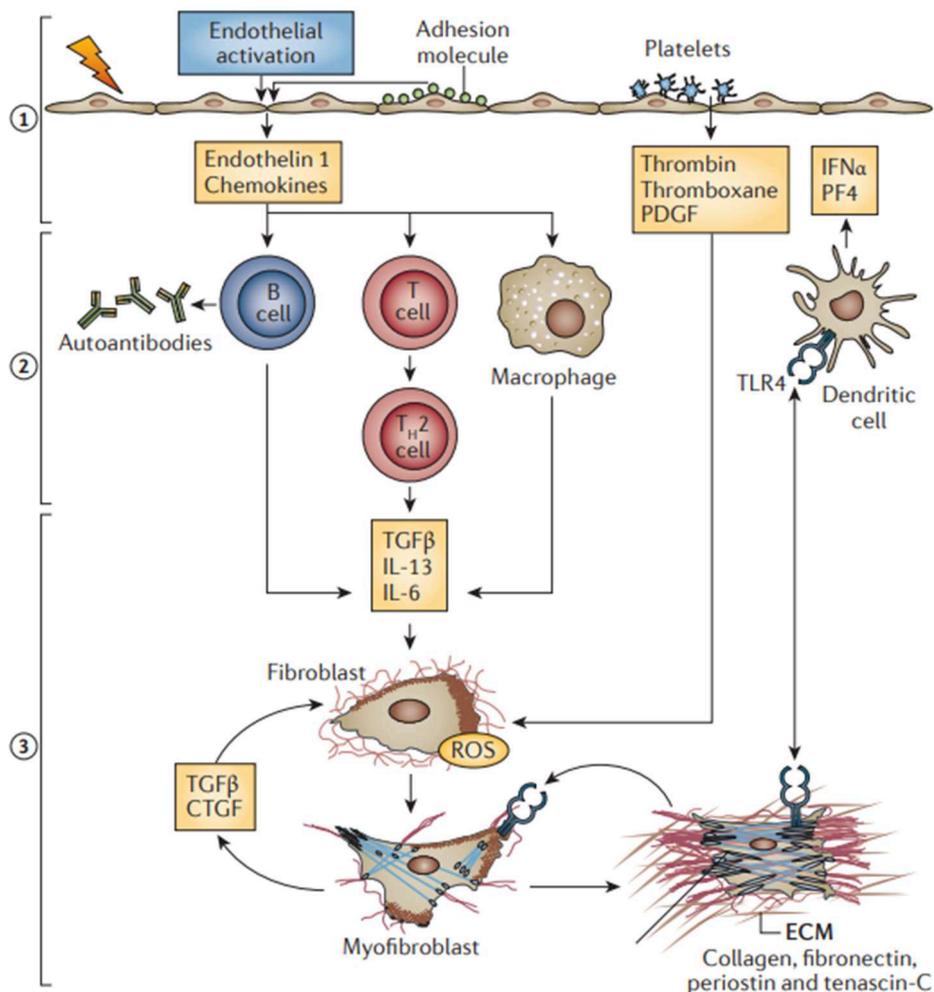


Figure 1 : Physiopathologie de la ScS d'après Allanore *et al.*⁹

1.2.1. Etiologies et facteurs de risque

1.2.1.1. Facteurs génétiques et épigénétiques

- **Facteurs génétiques**

Bien que la ScS ne soit pas une maladie génétique au sens mendélien, des études épidémiologiques ont montré une augmentation significative du risque de récurrence chez les apparentés au premier degré (1,6% *versus* 0,026% dans la population générale)¹⁰. De plus, la prévalence plus importante dans les populations caucasienne et asiatique conforte l'existence de facteurs prédisposants à la ScS¹. Cependant, les études sur des jumeaux monozygotes n'ont montré qu'un taux de concordance de 4,2%, suggérant ainsi que les facteurs génétiques n'ont qu'un faible impact sur le développement de la maladie¹¹.

La composante génétique de la ScS est polygénique, c'est-à-dire causée par l'altération d'un ensemble de gènes. Des études d'associations pangénomiques (études *Genome-Wide Association Studies* : GWAS) à large échelle et d'immunoprécipitation de chromatine ont permis d'identifier un certain nombre de loci et notamment plusieurs *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) susceptibles de favoriser la survenue de la maladie ou d'en influencer les manifestations cliniques et biologiques. Les gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) sont particulièrement impliqués ; ainsi certains polymorphismes des gènes *Human Leucocyte Antigen* (HLA) sont associés à une susceptibilité accrue de développement de la ScS (HLA DRB1*11 :04)¹², à une mortalité plus élevée (HLA-DRB1*08:02 et DQA1*05:01), à la production spécifique d'auto-anticorps (anti-Scl70 et HLA-DRB1*11, anti-centromères et HLA-DRB1*04), ou encore à certaines manifestations cliniques (fibrose pulmonaire et HLA-DPB1*03:11, crise rénale sclérodermique et HLA-DRB1*04:07)¹³. Par ailleurs, d'autres polymorphismes du HLA (HLA DRB1*13 :02) semblent protecteurs vis-à-vis de la maladie¹⁴.

Des polymorphismes génétiques sur des gènes non-HLA peuvent également être associés au développement de la ScS. Ces gènes sont impliqués dans l'immunité innée (par exemple le gène du Toll-Like Recepteur 2 : TLR2) et adaptative impliquant des gènes responsables de l'activation des Lymphocytes B et T. De plus, des variants génétiques du gène *Signal Transducer and Activator of Transcription-4* (STAT-4) et *Interferon Regulatory Factor-5* (IRF-5), également impliqués dans d'autres maladies auto-immunes, sont associés à la ScS¹⁵.

Enfin, des scores de risque polygénique combinant l'étude de 33 SNP ont été récemment développés à partir de la plus large étude GWAS réalisée dans le contexte sclérodermique (environ 9000 patients sclérodermiques et 17 500 donneurs sains). Ces scores permettent de dissocier les patients sclérodermiques des cas contrôles avec une aire sous la courbe *Receiver Operating Characteristic* (ROC) associée de 0,673¹⁶.

- **Facteurs épigénétiques**

Les modifications épigénétiques correspondent à des modulations réversibles, transmissibles et adaptatives de l'expression des gènes sans modification de la séquence nucléotidique. Depuis quelques années, les modifications épigénétiques associées à la ScS font l'objet d'un nombre exponentiel de publications scientifiques et nous n'entrerons pas dans le détail de ces études dans le cadre de ce travail.

Dans la ScS, les modifications épigénétiques touchent principalement les types cellulaires impliqués dans la pathogénie de la maladie (fibroblastes, cellules endothéliales et cellules immunes). Deux études récentes ont confirmé une hypométhylation globale des fibroblastes et des Lymphocytes T (LyT) CD4+ issus de patients sclérodermiques, contribuant au phénotype pathologique de ces cellules¹⁷. Par ailleurs, la déméthylation du promoteur du CD40 ligand est responsable d'une surexpression de cette molécule par les LyT CD4+, qui une fois liée aux Lymphocytes B (LyB), activera leur maturation en plasmocytes¹⁸. Des modifications épigénétiques sur les histones (acétylations, méthylation) sont également décrites dans la ScS. Deux enzymes responsables de ces modifications sont surexprimées dans les cellules endothéliales cutanées de patients sclérodermiques, suggérant leurs implications dans la dysangiogénèse décrite au cours de la ScS^{19,20}. Enfin, le profil d'expression des microARN de plusieurs types cellulaires ou tissulaires est significativement modifié au cours de la ScS²¹, incitant à poursuivre les investigations pour mieux documenter ces dérégulations et leurs implications dans la ScS.

1.2.1.2. Facteurs environnementaux et infectieux

Outre les facteurs génétiques, certains facteurs environnementaux sont susceptibles d'augmenter le risque de survenue de ScS²². Parmi les mieux documentés, l'exposition environnementale à certains agents chimiques (silice cristalline, métaux lourds, solvants organiques), infectieux ainsi que le régime alimentaire semblent participer au déclenchement de la maladie²³⁻²⁵.

Concernant l'exposition aux agents chimiques, le mécanisme actuellement retenu repose sur la pénétration cutanée et pulmonaire de ces substances, à l'origine d'une inflammation chronique avec formation de radicaux libres et à terme, du développement de la fibrose. De plus, l'imputabilité des solvants organiques a été confirmée dans une méta-analyse²⁶ alors que celle des prothèses mammaires a été infirmée²⁷.

Par ailleurs, des agents infectieux ont été proposés comme potentiels facteurs déclenchants²⁸. Le parvovirus B19, fréquemment retrouvé dans le sang et la moelle osseuse des patients, a été incriminé dans le développement de la ScS. En effet, ce virus touche directement l'endothélium par un effet cytotoxique et infecte de manière persistante les fibroblastes. Le cytomégalovirus pourrait également jouer un rôle dans l'apparition de la maladie en raison de sa capacité à infecter à la fois les cellules endothéliales et les

macrophages ainsi qu'à déréguler les profils cytokiniques. Enfin, une prévalence plus élevée d'infections à *Helicobacter pylori* a été retrouvée chez les patients sclérodermiques.

Bien que de nombreux mécanismes aient été suggérés (atteinte endothéliale, mimétisme moléculaire...), aucune association causale directe entre infections et ScS n'a pu être démontrée.

Enfin, des anomalies de l'équilibre du microbiote sont associées au développement de maladies auto-immunes dont la ScS. Deux études ont objectivé un déficit en *Faecalibacterium prausnitzii* dans la flore digestive des patients sclérodermiques, bactérie aux propriétés anti-inflammatoires^{29,30}.

1.2.1.3. Poly-autoimmunité

Les patients atteints de ScS présentent un risque accru de développement d'une seconde maladie auto-immune. Cette poly-autoimmunité individuelle, qui touche environ 25% des patients, se présente également à l'échelle familiale puisqu'un tiers des apparentés au premier degré des patients sclérodermiques développent eux-mêmes une maladie auto-immune^{31,32}.

1.2.2. Vasculopathie

1.2.2.1. Marqueurs de souffrance endothéliale

Les anomalies vasculaires observées au cours de la ScS sont considérées comme des éléments précoces, voire initiateurs de la ScS. L'atteinte endothéliale touche majoritairement la microcirculation (artérioles et capillaires), bien que des lésions macro-vasculaires soient également décrites dans la ScS^{33,34}. Les lésions endothéliales sont directement documentées par un excès de cellules endothéliales apoptotiques et/ou activées sur les biopsies cutanées de patients sclérodermiques, précédant souvent le développement des lésions de fibrose^{35,36}.

Plusieurs facteurs sont mis en cause dans l'activation et l'apoptose endothéliales parmi lesquels les auto-anticorps (auto-Ac) anti-cellules endothéliales, l'hyperproduction d'espèces réactives de l'oxygène (en anglais ROS : *Reactive Oxygen Species*), la dérégulation de facteurs de transcription (*up-regulation* de Fra-2 : *Fos related antigen 2* et *down-regulation* de Fli-1 : *Friend leukemia integration factor 1*) ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'Interleukine-1 (IL-1) et le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF α)³⁷.

L'activation endothéliale provoque la surexpression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, qui conjointement à la libération de facteurs chémoattractants par les cellules endothéliales, favorisent le recrutement de cellules inflammatoires. Ces processus conduisent à un infiltrat leucocytaire et macrophagique ainsi qu'à une amplification du processus apoptotique endothélial^{38,35}.

Ces phénomènes inflammatoires aboutissent à des anomalies jonctionnelles de l'endothélium. En effet, on observe au cours de la ScS, des mécanismes de clivage et d'internalisation de la *Vascular Endothelial-Cadhérine* (VE-Cadhérine)³⁹, molécule de jonction indispensable à la stabilité des jonctions adhérentes.

D'autres médiateurs inflammatoires solubles ont été associés à la pathogenèse de la ScS. Des taux élevés d'endothéline-1 (ET-1), puissant vasoconstricteur sécrété par les cellules endothéliales, ont été décrits dans les plasmas et peaux de patients sclérodermiques^{40,41}. De même, notre équipe a montré une élévation de la Fractalkine soluble (s-Fractalkine) circulante, molécule d'adhésion endothéliale soluble après clivage par des métalloprotéases, chez les patients atteints de ScS⁴². Ces deux marqueurs solubles constitueraient ainsi des biomarqueurs intéressants, témoins de l'atteinte vasculaire dans la ScS. Aussi, l'implication de l' α 2-Antiplasmine (α 2AP), protéine inhibitrice de la fibrinolyse, dans la vasculopathie sclérodermique a été mise en évidence dans un modèle murin de ScS induit par la bléomycine⁴³.

Parallèlement, des marqueurs cellulaires endothéliaux ont été étudiés au cours de la ScS. Les microvésicules endothéliales témoignent d'une activation endothéliale et se comportent comme des vecteurs d'activité biologique. Des taux élevés de ces microvésicules endothéliales ont été associés à la ScS et ce, indépendamment des facteurs de comorbidités associés⁴⁴. Les études s'intéressant à l'association entre les taux de microvésicules et les manifestations cliniques chez les patients sclérodermiques rapportent des résultats discordants⁴⁴⁻⁴⁷, soulignant la difficulté de standardisation des conditions pré-analytiques et analytiques relatives à la quantification des microvésicules. La numération de Cellules Endothéliales Circulantes (CEC) permet d'apprécier le degré d'agression de l'endothélium au cours d'un processus pathologique. Il s'agit de cellules endothéliales matures, détachées de la paroi vasculaire et se retrouvant dans le compartiment circulant. Un nombre restreint d'études documente l'intérêt des CEC comme biomarqueur dans la ScS. L'étude princeps de 2004 met en évidence une élévation des CEC chez les patients sclérodermiques comparativement à des donneurs sains. De plus les taux de CEC étaient corrélés à la sévérité de l'atteinte pulmonaire⁴⁸. Plus tard, une autre équipe rapporte un profil génique altéré des CEC en contexte sclérodermique, touchant principalement les voies apoptotiques et angiogéniques⁴⁹. De façon intéressante, un traitement par iloprost (analogue de la prostacycline) corrigerait significativement le profil des CEC chez les patients atteints de ScS. Il est cependant important de noter que les études qui ont quantifié les CEC en contexte sclérodermique ont utilisé des techniques de cytométrie en flux et non des approches de séparations immunomagnétiques qui sont considérées à ce jour comme le *gold standard*.

Notre groupe s'est également intéressé à ces marqueurs endothéliaux solubles et cellulaires. Nous avons mis en évidence une augmentation significative des taux plasmatiques de microvésicules endothéliales (Annexine V+ CD31+ CD41-) chez les patients sclérodermiques et des taux similaires de CEC entre les patients et les sujets contrôles. De

plus, les patients sclérodermiques présentaient des taux plus élevés de *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), ET-1, s-Fractalkine confortant les études précédemment décrites⁴².

La progression des lésions vasculaires conduit à une raréfaction capillaire, un épaissement de la paroi des vaisseaux ainsi qu'à un rétrécissement luminal, entraînant, à terme, une vasculopathie ischémique⁹. La dysfonction endothéliale et les anomalies microcirculatoires observées au cours de la ScS constituent le *primum movens* au développement de la fibrose.

1.2.2.2. Trouble de l'hémostase et du tonus vasculaire

On observe également une activation de la coagulation et à des anomalies du tonus vasculaire au cours de la ScS. La libération du facteur vonWillebrand, stocké dans les corps de Weibel-Palade au sein des cellules endothéliales, est accrue chez les patients sclérodermiques alors que les taux d'activateur tissulaire du plasminogène sont réduits comparativement à des sujets sains⁵⁰.

Conjointement aux dérégulations de la coagulation et de la fibrinolyse, l'activation chronique et l'état d'hyper-agrégabilité des plaquettes participent également aux désordres vasculaires observés lors la ScS⁵¹. La synthèse de modulateurs du tonus vasculaire est également perturbée au cours de la ScS avec notamment une moindre production de monoxyde d'azote et de prostacyclines vasodilatatrices. L'ET-1 est au contraire un puissant vasoconstricteur responsable des lésions ischémiques digitales et de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP)⁵². Il en résulte des anomalies dans la régulation de la perméabilité et du tonus vasculaire chez les patients sclérodermiques^{52,53}.

1.2.2.3. Dérégulation des processus angiogéniques et vasculogéniques

La vasculopathie sclérodermique se caractérise aussi par une altération des processus angiogéniques (production de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux déjà existants) et vasculogéniques (formation *de novo* de réseaux vasculaires). En conditions physiologiques, l'hypoxie tissulaire induit des mécanismes compensateurs qui participent à l'initiation de ces deux phénomènes. Ainsi, pour pallier l'ischémie vasculaire au cours de la ScS, des mécanismes pro-angiogéniques sont mis en place tels que l'élévation des taux circulants de VEGF, facteur de croissance pro-angiogénique et la mobilisation des progéniteurs endothéliaux dans le sang périphérique des patients sclérodermiques⁵⁴⁻⁵⁶.

L'augmentation chronique du VEGF et de son récepteur, à la fois au niveau sérique et au niveau cutané, participent à la désorganisation architecturale des vaisseaux et à la perte d'intégrité de l'endothélium^{39,57}. D'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) et le *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2) sont retrouvés élevés au cours de la ScS³⁷. Cependant, ces réponses pro-angiogéniques, qui pourraient représenter une tentative de réparation des dégâts vasculaires, s'avèrent insuffisantes et/ou inefficaces.

Aussi, d'autres facteurs aux propriétés anti-angiogéniques (endostatine, thrombospondine 1 et CXCL4)⁵⁸⁻⁶¹ sont surexprimés chez les patients sclérodermiques. De même, Manetti *et al.* ont rapporté un switch d'isoforme du VEGF pro-angiogénique (VEGF₁₆₅) vers un isoforme anti-angiogénique (VEGF_{165b})⁶².

Plusieurs études ont également caractérisé le rôle et l'altération des progéniteurs endothéliaux au cours de la ScS. Le terme de « Progéniteurs Endothéliaux (PE) » rassemble plusieurs types cellulaires capables de favoriser la régénération vasculaire. Ils ont été découverts en 1997 par Asahara *et al.* dans le sang périphérique et isolés par tris magnétiques⁶³. Dans ce travail pionnier, les PE étaient définis par leur phénotype CD34+ et *Kinase Domain Receptor* (KDR) +, leur potentiel de différenciation en cellules endothéliales matures *in vitro* et par leur capacité à créer des néovaisseaux chez l'animal. Depuis cette découverte, de nombreuses études ont proposé de nouveaux marqueurs à la surface des PE tels que le CD133 ou encore la VE-Cadherine, conduisant à comparabilité réduite des études entre elles. Dans un objectif de clarification, deux sous-catégories ont été distinguées⁶⁴ :

- les PE issus de la lignée hématopoïétique (CD45+, CD14+ et CD31+), aussi appelés *Myeloid Angiogenic Cells* (MAC) ou encore PE précoces, qui vectorisent leur action pro-angiogénique principalement par des mécanismes paracrines,
- les PE issus de la lignée endothéliale, nommés *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC) ou PE tardifs, présentant des capacités angiogéniques intrinsèques.

Malgré une (ou des) identité(s) controversée(s) des PE, le potentiel thérapeutique et la relevance clinique des PE dans les désordres vasculaires ont fait l'objet de nombreuses publications. En effet, la découverte des cellules présentant un potentiel vasculogénique à l'âge adulte constitue un outil majeur à la fois comme biomarqueur potentiel mais également comme témoin physiopathologique dans certaines pathologies. Plusieurs études ont montré une altération quantitative et/ou qualitative des PE dans différents contextes pathologiques comme les maladies cardiovasculaires et le diabète^{65,66}. Les altérations fonctionnelles et les variations dans les taux de PE au cours de la ScS seront discutées dans le deuxième chapitre de la partie introductive.

Un autre processus décrit dans le développement de la ScS est la transition endothélio-mésenchymateuse. Ce phénomène suggère que les cellules endothéliales, une fois exposées au *Transforming Growth Factor β* (TGFβ) et à l'ET-1, se transdifférencient en myofibroblastes⁶⁷⁻⁶⁹. Cette transition endothélio-mésenchymateuse se caractérise par la perte de marqueurs endothéliaux en surface comme *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule* (PECAM) ou VE-Cadhérine et l'acquisition de marqueurs myofibroblastiques tels que l'*α-Smooth Muscle Actin* (αSMA), la fibronectine et le collagène de type I⁷⁰. Ceci conduit à un remodelage vasculaire majeur et à un défaut fonctionnel important des cellules endothéliales. Une récente étude montre que cette transdifférenciation peut également être médiée par la voie de l'*Hypoxia-Inducible Factor-1α* (HIF-1 α), activée lors des processus ischémiques. La transition endothélio-mésenchymateuse est une anomalie précoce et réversible dans la ScS,

qui contribue à la fibrose tissulaire. Elle fait actuellement l'objet d'études comme cible thérapeutique potentielle.

L'ensemble de ces anomalies vasculaires conduit, à terme, à la perte de l'intégrité de la monocouche endothéliale, à l'altération de l'interaction entre l'endothélium et la couverture péricytaire et participent au développement de la fibrose^{39,71,72} (Figure 2).

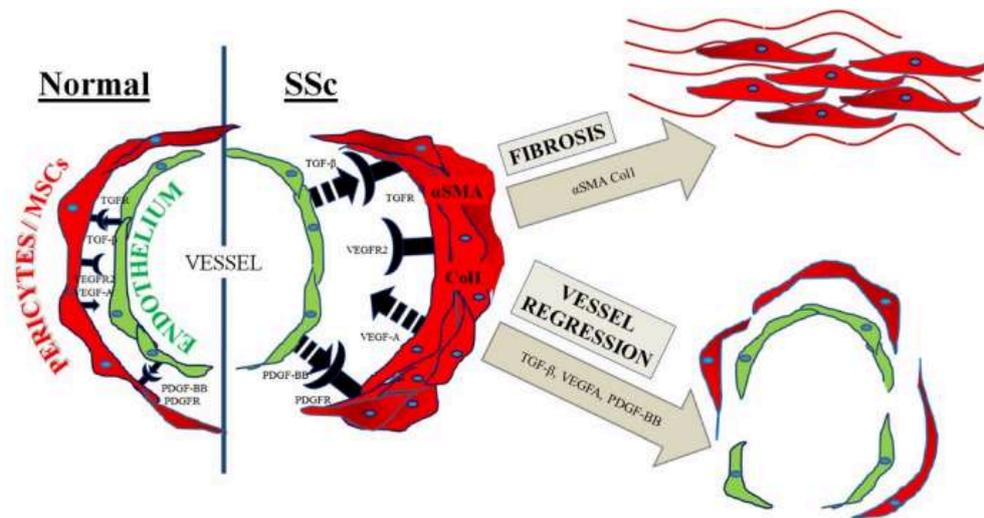


Figure 2 : Altération du *crosstalk* entre cellules endothéliales et cellules péricytaire au cours de la ScS d'après Cipriani *et al.*⁷²

1.2.3. Désordres immunitaires et réponse inflammatoire

Des anomalies de l'immunité innée et de l'immunité adaptative sont décrites au cours de la ScS. Les arguments en faveur de l'implication du système immunitaire sont nombreux : le développement d'infiltrats inflammatoires dans les tissus cibles (peau et poumons), les altérations dans la distribution tissulaire et circulante des cellules immunes, la présence d'une signature de type interféron de type 1 et évidemment le développement d'auto-Ac sériques.

1.2.3.1. Implication de l'immunité innée

De par leur grande plasticité, les monocytes et les macrophages ont la capacité d'acquérir un profil pro-inflammatoire et pro-fibrosant (profil M1). Ce phénotype particulier est associé à la sécrétion de ROS et autres cytokines inflammatoires^{73,74}. De plus, les biopsies cutanées de patients ayant une forme débutante de ScS présentent un infiltrat riche en monocytes et macrophages^{75,76}. Le rôle des mastocytes est également rapporté comme pouvant être à l'origine de la production d'histamine, d'IL-4 et autres cytokines pro-fibrosantes⁷⁷.

L'implication précise des polynucléaires neutrophiles au cours de la ScS reste encore mal connue. Des études anciennes ont suggéré qu'ils participeraient aux dysfonctionnements endothéliaux et fibroblastiques via une production excessive de ROS et d'IL-6^{78,79}.

La libération de signaux de dangers, *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), est responsable de l'activation précoce de l'immunité innée⁸⁰, avec le recrutement et l'activation de cellules dendritiques plasmacytoïdes par les *Toll Like Receptor* (TLR). Cette activation entraîne une sécrétion de molécules pro-inflammatoires (IL-4, IL-6, IL-13 et CXCL4)⁶⁰ et favorise la synthèse d'auto-Ac en activant les LyB⁸¹. Par ailleurs, des analyses transcriptomiques sur cellules mononucléées circulantes de patients sclérodermiques montrent une expression différentielle des gènes de la voie de l'interféron de type 1. Aussi, les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes issues de cette première phase de stimulation du système immunitaire font le lien avec l'immunité adaptative, activant à leur tour les LyT et LyB. Ainsi, des LyT CD4+ activés se retrouvent précocement au contact de fibroblastes dermiques et auraient un rôle dans l'activation de ces derniers⁸².

1.2.3.2. Implication de l'immunité adaptative cellulaire

Bien que les premières études se soient principalement intéressées aux différentes sous-populations de LyT, les études actuelles se concentrent sur les dérégulations de sécrétion cytokinique et d'interaction avec les autres acteurs de la ScS : l'endothélium et les fibroblastes.

La présence d'infiltrats dermiques périvasculaires observés aux phases précoces de la maladie et composés majoritairement de LyT CD4+ activés représente un argument fort en faveur du rôle des LyT dans la ScS⁸². Aussi, les LyT présentent un répertoire T oligoclonal, suggérant l'existence d'une réponse spécifique contre un ou plusieurs antigènes⁸³

En résultent des anomalies majeures dans la balance cytokinique Th1 / Th2, plutôt en faveur d'un profil Th2⁸⁴, avec une sécrétion accrue d'IL-4, IL-5 et IL-13. Ces cytokines stimulent la synthèse de collagène, de manière directe en activant la transcription du gène du collagène type I alpha 2 (COL1A2) ou par l'activation de la voie TGFβ⁸⁵. L'orientation vers un profil Th2 est confirmée par l'observation de taux circulants élevés d'IL-4 et d'IL-13 dans le sérum des patients sclérodermiques⁸⁰. Un tel profil cytokinique favorise l'activation des LyB et la production d'auto-Ac⁸⁰. Des travaux plus récents suggèrent également une augmentation des *LyT follicular helper* qui favoriseraient la différenciation des précurseurs B en plasmablastes ainsi que la synthèse des auto-Ac, par l'intermédiaire d'une sécrétion accrue d'IL-21⁸⁶.

Enfin, le rôle des LyT Th17, dont les taux circulants sont augmentés chez les patients sclérodermiques, reste débattu^{87,88}. En effet, dans les modèles murins, l'IL-17A sécrétée par les LyT Th17 est responsable de lésions fibrotiques et de manifestations sclérodermiformes⁸⁹. Toutefois, chez l'homme, les données plaident pour un effet antifibrotique puisqu'il existe une corrélation inverse entre le nombre de cellules IL-17A positives et l'étendue de la fibrose⁹⁰.

Les variations dans la répartition de ces différentes sous-populations Th17, Th1, Th2, et *T follicular helper* au cours de la ScS participent, en partie, à l'hétérogénéité clinique observée⁹¹.

1.2.3.3. Implication de l'immunité adaptative humorale

Le rôle de l'immunité adaptative dans la pathogénèse de la maladie est supporté par le développement d'auto-Ac détectables sériques chez la majorité des patients sclérodermiques. Certains ont pour cible des cellules (fibroblastes et cellules endothéliales) ou des molécules clés (le VEGF, l'ET-1, la fibrilline, les Métalloprotéinases Matricielles : MMP) dans le développement de la maladie⁹². L'altération de la réponse B au cours de la sclérodermie reste néanmoins mal caractérisée bien que des preuves d'efficacité du rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20, ciblant le lymphocyte B) soient en faveur d'une implication importante des LyB dans la physiopathologie de la maladie⁹³. Des taux élevés de *B cell-Activating Factor* (BAFF), qui favorise la survie et la maturation des LyB, ont également été mis en évidence dans les sérums et les biopsies cutanées de patients sclérodermiques. De plus, les taux de BAFF sont corrélés à la sévérité de l'atteinte cutanée⁹⁴. Sous l'effet du BAFF, les LyB activés produisent une sécrétion accrue d'IL-6, cytokine pro-inflammatoire qui participe à l'apparition de manifestations inflammatoires et fibrotiques de la maladie⁹⁵. En résulte une augmentation des taux d'IL-6 dans le sérum et la peau des patients sclérodermiques⁹⁶.

Aussi, Les LyB sont également à l'origine d'une production excessive de TGF β , amplifiant la synthèse excessive de MEC par les fibroblastes activés⁹⁷.

Le rôle pathogène des LyB ou des auto-Ac dans la ScS reste débattu. Les mécanismes conduisant à l'exposition d'antigènes cibles et à la rupture de tolérance à l'origine de la production d'auto-Ac ne sont pas entièrement élucidés.

1.2.4. Dysfonctionnements fibroblastiques

L'aboutissement de la séquence pathogénique de la ScS est la fibrose. Celle-ci est définie par l'accumulation de MEC aussi bien par synthèse accrue de ses constituants que par défaut de résorption. Il en résulte des dépôts en excès de collagène, d'acide hyaluronique, de glycosaminoglycanes ou de fibronectine formant un tissu conjonctif épais et rigide qui perturbe l'architecture et les fonctions des tissus atteints⁸⁰.

Ce tissu fibreux est également caractérisé par l'apparition de cellules α SMA+ appelées « myofibroblastes » qui résistent à l'apoptose et produisent une grande quantité de collagène⁹⁸. Certains facteurs favoriseraient cette transformation, comme le défaut d'expression du facteur de transcription Fli-1 ou encore certains auto-Ac⁹⁹. En effet, la présence d'Ac anti-*PDGF-Receptor* (PDGF-R) entraîne une différenciation myofibroblastique et une synthèse excessive des collagènes de la MEC¹⁰⁰. L'acquisition de ce phénotype « myofibroblastique » augmente la capacité proliférative, la motilité ainsi que la capacité de synthèse du collagène des fibroblastes^{98,101}. Ces cellules contractiles sécrètent non seulement des molécules matricielles mais également le TGF β et d'autres médiateurs pro-fibrotiques créant ainsi des boucles d'auto-amplification.

L'origine cellulaire de ces myofibroblastes pourrait être des cellules résidentes comme les péricytes, les cellules endothéliales ou encore les cellules stromales mésenchymateuses contenues dans la paroi des microvaisseaux³⁷. Une autre source de myofibroblastes évoquée constitue les cellules progénitrices adipocytaires, normalement confinées dans la couche graisseuse adjacente au derme, qui pourraient perdre leurs marqueurs adipocytaires et exprimer des marqueurs myofibroblastiques¹⁰². Des travaux récents d'études transcriptomiques et d'analyses tissulaires par approche de séquençage de l'ARN à l'échelle cellulaire (*single-cell RNA sequencing*) mettent en évidence une grande hétérogénéité des fibroblastes et myofibroblastes entre les tissus atteints mais également au sein d'un même tissu¹⁰³⁻¹⁰⁵. Au total, plusieurs types cellulaires peuvent se différencier en myofibroblastes (fibroblastes, péricytes, cellules endothéliales, adipocytes ...), sous l'influence de médiateurs pro-inflammatoires comme le TGF β (Figure 3).

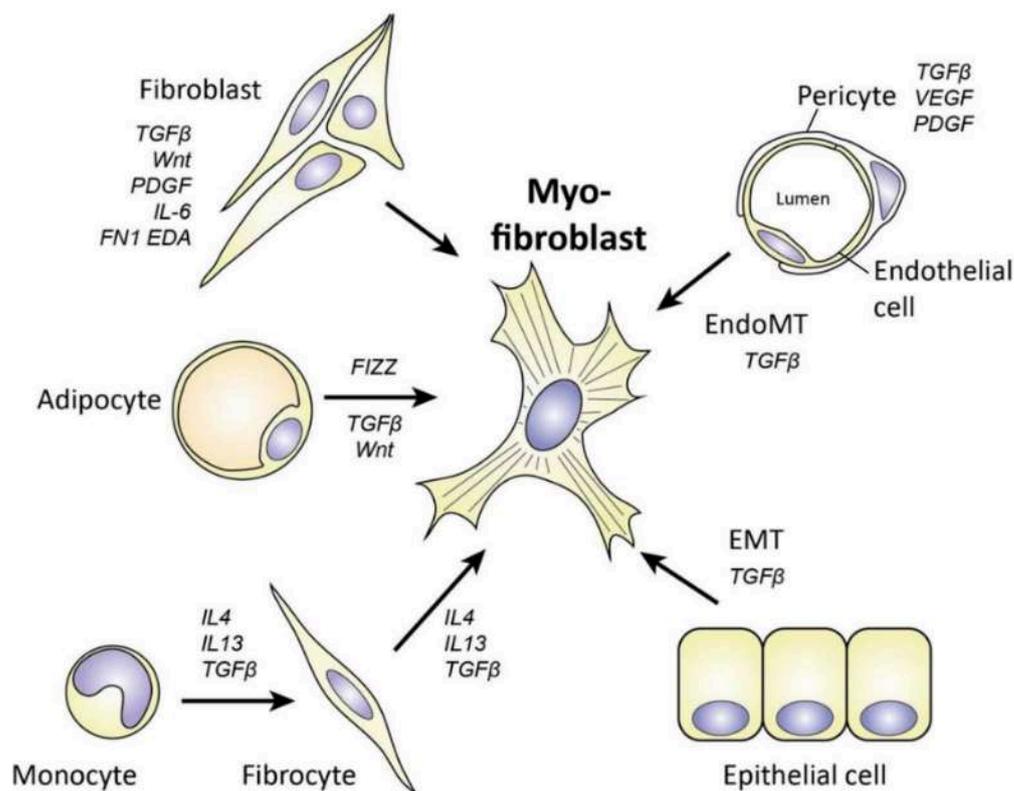


Figure 3 : Sources cellulaires susceptibles de se différencier en myofibroblastes au cours de la ScS d'après van Caam *et al.*¹⁰¹

De nombreux médiateurs contribuent à l'activation fibroblastique ; toutefois le TGF β est considéré comme le facteur régulateur central dans les processus de fibrose. En effet, on assiste à une activation constitutive de la voie du TGF β au niveau des fibroblastes chez les patients sclérodermiques. Ce phénomène est lié à la transcription autonome et dérégulée des gènes du procollagène et du *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), habituellement sous la dépendance du TGF β ¹⁰⁶. Il en résulte une surexpression du CTGF dans les lésions tissulaires et

une augmentation des taux circulants en contexte sclérodermique. Les SMADs agissent alors comme des effecteurs de signalisation de la voie du TGF β . L'accumulation de la forme phosphorylée de SMAD3, même en l'absence de TGF β , dans les fibroblastes aboutit à la transcription du gène COL1A2¹⁰⁷. Ainsi, le taux de CTGF circulant, puisque corrélé à la sévérité et à l'étendue de la maladie¹⁰⁸, a été envisagé comme biomarqueur dans la ScS. De plus, la culture des fibroblastes dermiques en conditions d'hypoxie conduit à la surexpression du CTGF¹⁰⁹.

D'autre part, il a été décrit une surexpression des récepteurs au TGF β type I et II à la surface des fibroblastes de patients sclérodermiques, en faveur d'une sensibilité accrue au TGF β circulant^{110,111}. Aussi, le TGF β induit l'expression du facteur de transcription Egr-1 (*Early growth response-1*) dans les fibroblastes par les voies impliquant les kinases ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated protein Kinase 1/2*)¹¹². Par conséquent, la peau et les poumons de patients sclérodermiques surexpriment Egr1, de même que la peau de souris traitées par bléomycine¹¹³⁻¹¹⁵. Au total, il n'y aurait pas qu'une production excessive de TGF β mais également un dérèglement de sa synthèse et de ses récepteurs au cours de la ScS.

Le stress oxydant a un impact majeur dans la mise en place des processus pathologiques dans la sclérodermie. Contrairement aux autres maladies auto-immunes, les taux circulants des espèces réactives de l'oxygène des patients atteints de ScS sont relativement indépendants de l'état inflammatoire¹⁰⁰. Ces ROS sont produits par la NADPH oxydase membranaire, exprimée par plusieurs types cellulaires présents dans la paroi vasculaire, en réponse à une agression vasculaire^{116,117}. Les radicaux libres produits exercent directement un effet pro-fibrosant sur les fibroblastes cutanés¹¹⁸ et contribuent à la libération de médiateurs impliqués dans la fibrose¹¹⁹, créant ainsi des boucles d'amplification.

Par ailleurs la MEC n'est pas un ensemble de protéines purement structurales. Par exemple, la tenascine C et la fibronectine, présentes au sein de la MEC, peuvent induire la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes en agissant comme agonistes de certains TLR^{120,121}. De même, les fibroblastes sont pourvus de mécanorécepteurs et la rigidité de la MEC peut également participer à leur activation¹²². Enfin, la MEC constitue également un réservoir de molécules pro-fibrosantes telles que le TGF β , stocké sous une forme latente liée à la fibrilline 1¹⁰².

Parmi les autres molécules incriminées dans l'activation des fibroblastes ; l'IL-4, cytokine produite par les LyT Th2, est trouvée en excès chez les patients sclérodermiques. Elle stimule la croissance fibroblastique et le dépôt tissulaire de MEC¹²³. Une démonstration du rôle pathogène de l'IL-4 est également fournie par l'étude du modèle murin de ScS « Tight skin » (Tsk1/+) où une activation constitutive de la voie de signalisation de l'IL-4 est montrée comme responsable de la fibrose, réversible après administration d'Ac anti-IL-4¹²⁴. Un excès de sérotonine est également observé dans la ScS, contribuant à la prolifération des fibroblastes et leur synthèse de collagène^{125,126}. De plus, les fibroblastes participent à l'inflammation tissulaire au cours de la ScS puisqu'ils secrètent des molécules telles que le l'IL-1b, le TNF α , l'IL-6 et le MCP-1, à l'origine de processus auto-amplifiés⁹⁷.

L'IL-6, cytokine pro-inflammatoire, est également considérée comme un acteur clé dans la pathogénie de la ScS. Des taux élevés d'IL-6 ont été mis en évidence dans les biopsies cutanées¹²⁷ et les sérums de patients sclérodermiques¹²⁸. De plus les niveaux d'IL-6 étaient corrélés au score de Rodnan modifié¹²⁹. Aussi, cette interleukine semble impliquée dans l'activation et l'apoptose endothéliales⁷⁸, suggérant un rôle majeur dans les stades précoces de la maladie. L'IL-13 est également une cytokine importante dans la fibrose sclérodermique. Les patients ont des taux élevés d'IL-13 sérique^{130,131} et plusieurs polymorphismes génétiques du gène de l'IL-13 ont été décrits chez les patients atteints de ScS¹³². Par ailleurs, l'ET-1 est un également un médiateur de l'activation fibroblastique au cours de la ScS. Cette puissante molécule vasoactive participe à la transformation myofibroblastique, à la synthèse de collagène et à l'inhibition des MMP^{133,134}. Enfin, il est à noter dans le contexte de la ScS, une perte de l'expression de microARN régulant la production de collagène par les fibroblastes tels que mir-29a, mir-150 et mir-let7a¹³⁵⁻¹³⁷.

Comme décrit précédemment, les cellules endothéliales participent activement au développement de la fibrose dans la ScS par la sécrétion de TGF β et de VEGF qui stimulent la synthèse de collagène et la transition endothélio-mésenchymateuse. Plusieurs études décrivent l'implication des péricytes (en excès dans le derme des patients sclérodermiques) et d'autres progéniteurs endothéliaux dans la fibrogenèse de la ScS, notamment à travers l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique^{138,139}. Par ailleurs, il semble que le *crossstalk* entre cellules endothéliales et cellules périvasculaires soit altéré au cours de la ScS⁷². Cipriani *et al.* ont mis en évidence la surexpression de marqueurs de fibrose (TGF β et α SMA) dans des cellules stromales mésenchymateuses (saines ou pathologiques) au contact de cellules endothéliales de patients sclérodermiques dans des modèles de co-cultures *in vitro*⁷².

Ces données confortent l'imbrication des processus pathogéniques qui participent au développement et à l'aggravation de la ScS (Figure 4). La meilleure compréhension des liens entre vasculopathie, fibrose et auto-immunité pourrait aider à l'optimisation des nouvelles stratégies thérapeutiques en cours de développement dans la ScS.

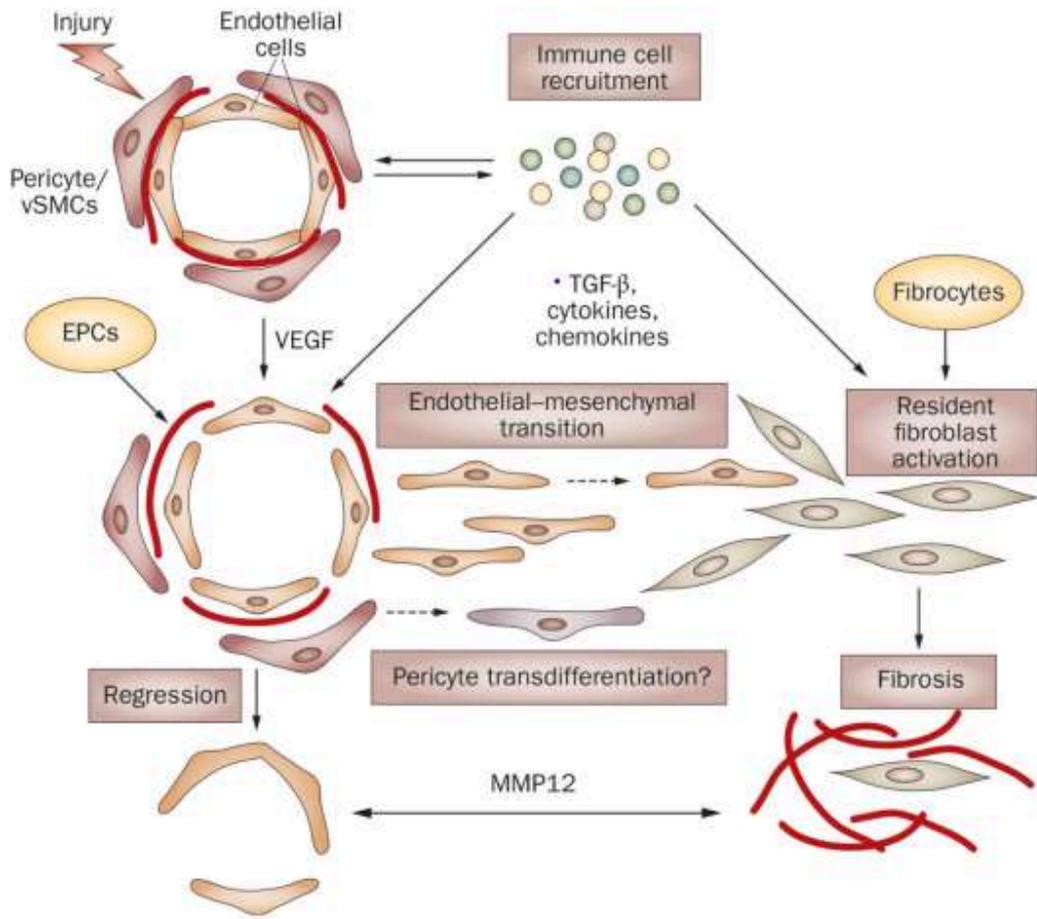


Figure 4 : Liens possibles entre la vasculopathie et la fibrose au cours de la ScS d'après Trojanowska *et al.*³⁷

1.3. Manifestations cliniques

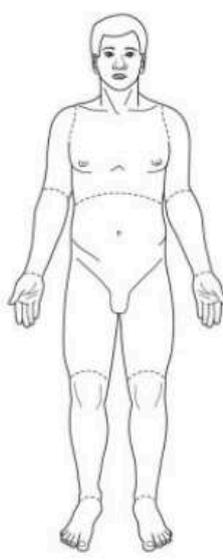
La ScS est une connectivite avec une grande hétérogénéité clinique. En effet, l'un des éléments caractéristiques de cette pathologie est la grande variabilité de la symptomatologie décrite ; résultant d'une atteinte mixte, à la fois d'origine vasculaire et fibrotique. Classiquement on retrouve des atteintes cutanées touchant principalement le visage et les mains, responsables d'un handicap fonctionnel important et des complications au niveau des organes profonds (atteintes cardiaques, pulmonaires, rénales) pouvant mettre en jeu le pronostic vital.

1.3.1. Syndrome de Raynaud

Le syndrome de Raynaud est la conséquence d'un vasospasme des artères distales après exposition au froid ou lors d'un stress, entraînant une diminution du débit sanguin, une ischémie et un accès paroxystique douloureux des extrémités. Il se divise classiquement en 3 phases : (i) une phase blanche, associée à l'ischémie, (ii) une phase bleue en lien avec la stase sanguine et (iii) une phase rouge associée à la vasodilatation réactionnelle. Ce phénomène, présent chez plus de 95% des patients, précède souvent de quelques mois à quelques années l'apparition de signes cutanés.

1.3.2. Manifestations cutanées

La fibrose cutanée est une manifestation constante de la maladie, à l'exception de rares formes de ScS *sine scleroderma*. Dans un délai variable par rapport au phénomène de Raynaud, des lésions de sclérose cutanée surviennent, débutant souvent au niveau des mains des patients, avec une rétraction et un durcissement de la peau et des ongles (sclerodactylie). Il peut s'agir d'une sclérose localisée, intéressant seulement les doigts ou les pieds des patients, ou pouvant s'étendre au-delà des extrémités. Le score de Rodnan modifié (*modified Rodnan Skin Score* en anglais, mRSS), sur 51 points, est un score permettant d'évaluer l'extension de la sclérose cutanée. Il quantifie l'épaississement cutané avec une somme totale des scores des différentes zones évaluées pouvant varier de 0 à 51¹⁴⁰ (Figure 5). Ce score est utilisé notamment comme critère d'étude de réponse thérapeutique dans les essais cliniques.



	Right				Left			
Fingers	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Hands	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Forearms	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Upper Arms	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Face			0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>		
Anterior Chest			0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>		
Abdomen			0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>		
Thighs	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Legs	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Feet	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Column Totals								
Total:								
Key:	0 – No Thickening	1 – Mild Thickening	2 – Moderate Thickening	3 – Severe Thickening				
Notes:								

Figure 5 : Score de Rodnan modifié d'après Khanna *et al.*¹⁴⁰

La sclérose cutanée peut évoluer en différentes phases successives : une phase œdémateuse transitoire (aspect boudiné des doigts), une phase indurée correspondant souvent au pic de la maladie et enfin une phase atrophique caractérisée par une disparition de l'hypoderme et aboutissant à une rétraction des doigts en flexion.

Les télangiectasies sont quasi-constantes chez les patients atteints de ScS et se définissent par des lésions cutanées érythémateuses disparaissant à la vitropression. Elles sont l'un des témoins de l'atteinte endothéliale au cours de la ScS.

D'autres manifestations cutanées peuvent s'associer, notamment des troubles trophiques tels que des Ulcères Digitaux (UD), définis par une perte de substance très douloureuse, évoluant dans certains cas vers une surinfection ou une gangrène. Près de la moitié des patients atteints de ScS développeront au cours de leur maladie au moins un UD¹⁴¹.

La calcinose sous-cutanée est une atteinte caractérisée par des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite dans les tissus mous sous-cutanés. Elle touche environ 25% des patients sclérodermiques et l'importance de la calcinose augmente avec la sévérité de la ScS, la durée de la maladie et la gravité de l'atteinte cutanée. Les lésions de calcinose siègent le plus souvent aux extrémités des doigts, sur les avants bras et faces antérieures des genoux. La physiopathologie est encore mal comprise ; il n'existe pas d'anomalie du bilan phosphocalcique pouvant expliquer la formation de ces calcifications. Une atteinte préférentielle de la main dominante et des zones exposées aux microtraumatismes évoque l'hypothèse de l'intervention de facteurs tissulaires locaux.

Des UD d'origine mécanique peuvent également apparaître en regard d'une calcinose ou d'un relief osseux. Quelquefois, des phénomènes d'érosion aux extrémités des doigts, appelés

acro-ostéolyse, peuvent survenir et sont à l'origine d'un raccourcissement de la dernière phalange.

En conclusion, les lésions de sclérose, d'ischémie et la calcinose sont associées à un syndrome douloureux et à un handicap fonctionnel de la main des patients (Figure 6). Ce handicap participe à 75% au handicap global de la maladie^{141,142}.



Figure 6 : Différents aspects cliniques du handicap de la main chez les patients sclérodermiques d'après Magalon *et al.*¹⁴³

1.3.3. Atteinte oro-faciale

Il existe de nombreuses manifestations oro-faciales de la ScS qui peuvent être à l'origine d'atteintes fonctionnelles et/ou tissulaires. Sont décrites des difficultés masticatoires dues à une limitation de l'ouverture buccale par sclérose labiale, des douleurs neuropathiques telles que des névralgies trigéminales, des anomalies des articulations temporo-mandibulaires, une fibrose des gencives prédisposant au risque de parodontite ainsi qu'une hyposialie.

1.3.4. Atteinte pulmonaire

L'atteinte pulmonaire concerne plus de 50% des patients sclérodermiques et représente la première cause de décès. Parmi les complications pulmonaires, on retrouve la Pneumopathie Interstitielle Diffuse (PID), pneumopathie fibrosante survenant suite à un excès de production de collagène au niveau des poumons (atteinte parenchymateuse). Elle empêche la diffusion

de l'oxygène entre les alvéoles et les vaisseaux sanguins. Elle se manifeste par une toux sèche persistante, une dyspnée d'effort et dans les formes avancées, une insuffisance respiratoire chronique. Les atteintes parenchymateuses surviennent plus fréquemment au cours des formes diffuses¹⁴¹, *a fortiori* lorsque des Ac anti-Scl-70 sont présents.

La PID est le plus souvent lentement évolutive et environ un patient sclérodermiques sur dix développera une insuffisance respiratoire terminale. Des marqueurs sériques ont été identifiés comme biomarqueurs associés à la progression de la PID. Ainsi, la L-leucine, la L-isoleucine, la xanthosine et l'adénosine monophosphate ont permis de différencier la PID en progression des formes stables chez les patients sclérodermiques¹⁴⁴.

Bien que l'évolution de cette fibrose soit imprévisible, l'évolutivité de l'atteinte pulmonaire est surtout observée au début de la maladie, justifiant une surveillance rapprochée durant les cinq premières années suivant le diagnostic¹⁴¹. La sévérité de la fibrose pulmonaire est donc naturellement associée à un pronostic péjoratif de la ScS¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

L'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP) est une autre complication pulmonaire pouvant être associée à la ScS. L'HTAP doit être systématiquement évoquée devant une asthénie, des palpitations et des signes d'insuffisance cardiaque droite (œdèmes des membres inférieurs, turgescence jugulaire...). Elle concerne environ 10% des patients sclérodermiques et résulte d'anomalies du remodelage vasculaire, avec une incidence de 0,6% des patients par année¹⁴⁸. Compte-tenu de la gravité de l'HTAP, un dépistage systématique par une échocardiographie transthoracique est justifié, au minimum une fois par an^{141,148,149}.

1.3.5. Atteinte cardiaque

Les atteintes cardiaques associées à la ScS seraient largement sous-estimées¹⁴¹. Ainsi, une fibrose myocardique sans retentissement clinique concernerait 70% des patients atteints de ScS¹⁵⁰. En cas de doute sur une atteinte cardiaque, une IRM cardiaque est indiquée et une insuffisance cardiaque droite doit être soupçonnée lors de dyspnées, douleurs thoraciques et/ou d'œdèmes des membres inférieurs.

1.3.6. Atteinte rénale

La Crise Rénale aiguë Sclérodermique (CRS) est une complication rare, d'origine vasculaire et redoutable qui concerne 5% des patients sclérodermiques. Elle est révélée par une hypertension artérielle, des œdèmes des membres inférieurs et une protéinurie. Plusieurs facteurs prédictifs de la survenue de cette complication sévère de la ScS ont été identifiés : la présence d'une forme cutanée diffuse, la progression rapide de l'atteinte cutanée, un événement cardiaque récent, une anémie, l'identification d'Ac anti-ARN polymérase III ou encore l'utilisation préalable de corticoïdes à forte dose ou de ciclosporine dans les trois mois précédant la CRS^{151,152}.

1.3.7. Atteinte digestive

Environ 90% des patients sclérodermiques sont handicapés par des troubles digestifs, de sévérité et manifestation clinique variables¹⁵³. L'ensemble du tractus digestif peut être atteint, depuis la cavité buccale jusqu'au rectum. L'atteinte œsophagienne, fréquente et précoce, se manifeste principalement par une dysphagie, des douleurs rétrosternales et/ou des Reflux Gastro-Œsophagiens (RGO). Une gastroparésie, présente chez 10 à 75% des patients sclérodermiques, se révèle par un syndrome dyspeptique, une sensation de satiété précoce, des nausées et occasionnellement par une intolérance alimentaire totale¹⁵⁴.

L'atteinte de l'intestin grêle, caractérisée par une hypo-motilité intestinale, est responsable de Pseudo-Occlusion Intestinale Chronique (POIC) à l'origine d'une pullulation microbienne intestinale pouvant conduire à un syndrome de malabsorption digestive et à une dénutrition. L'atteinte colique (constipations, fausses diarrhées, météorisme abdominal et syndrome occlusif) est présente chez 10 à 50% des patients sclérodermiques¹⁵⁴. Enfin, l'atteinte sphinctérienne anorectale se caractérise par une incontinence anale et/ou par un prolapsus rectal.

Au total, l'atteinte de l'appareil digestif est responsable de troubles nutritionnels, aggravant encore le pronostic global de la maladie^{155,156}. Le recours à la nutrition artificielle, le plus souvent par voie parentérale, est fréquent¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

1.3.8. Atteinte de l'appareil locomoteur

Une proportion importante de patients sclérodermiques et plus particulièrement, les formes cutanées diffuses sont touchées par des douleurs musculosquelettiques, d'origine mécanique ou inflammatoire¹⁶⁰. La mise en tension des gaines tendineuses touchées par le processus de fibrose peut aboutir à une rétraction irréductible des doigts. Les arthralgies inflammatoires sont également décrites au cours de la ScS bien que les véritables arthrites soient rares, devant faire suspecter un syndrome de chevauchement. Les atteintes musculaires sont également de manifestations variables : de simples myalgies à un déficit moteur proximal.

La Figure 7 présente une vue d'ensemble des principales complications cutanées et viscérales pouvant être associées à la ScS.

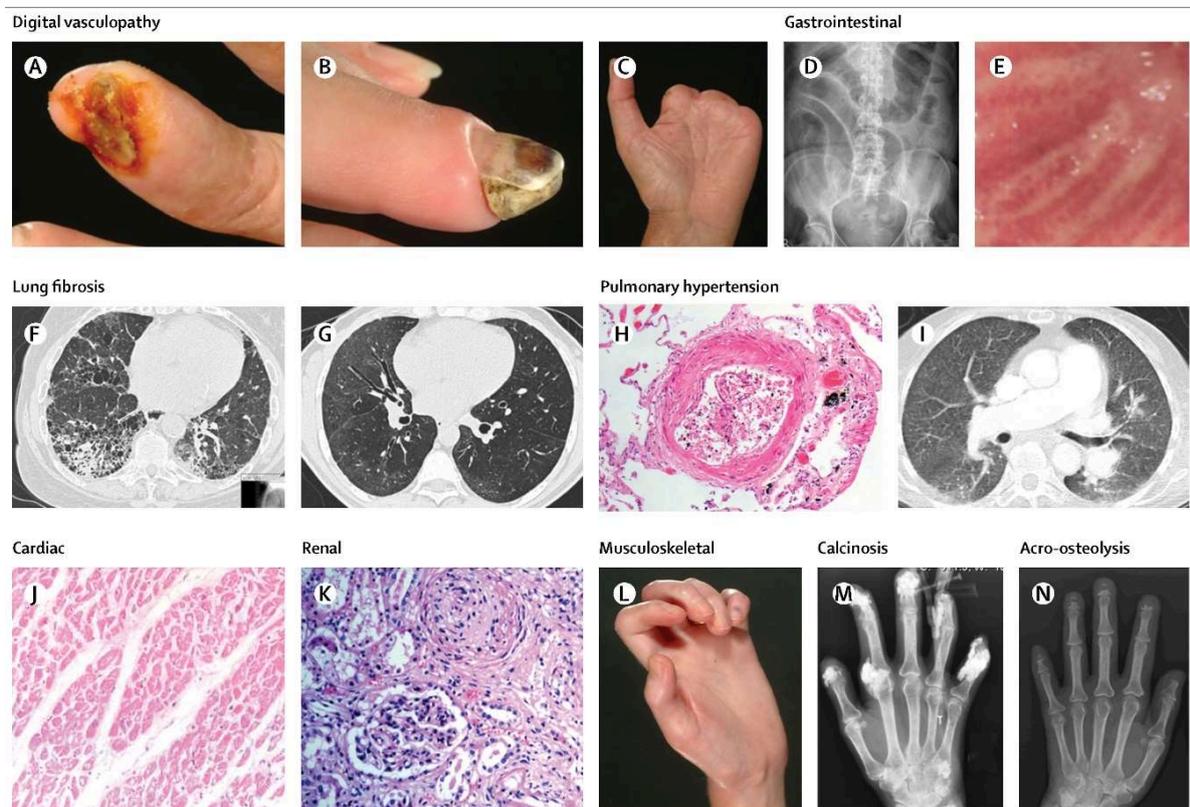


Figure 7 : Principales complications associées à la ScS d'après Denton et Khanna¹⁴¹

1.4. Diagnostic et classifications

1.4.1. Examens paracliniques

Des examens paracliniques permettent de confirmer le diagnostic lorsque les signes cliniques sont insuffisants et de rechercher de potentielles complications viscérales.

La recherche d'auto-Ac, notamment les Ac Anti-Nucléaires (AAN), constitue un examen complémentaire de première intention réalisé au stade de suspicion de ScS. Plus de 90% présentent des AAN circulants positifs. La recherche d'AAN est réalisée par immunofluorescence indirecte sur cellules Human Epithelial cell line type 2 (HEp-2). En cas de positivité, une titration et une identification de l'aspect de la fluorescence (homogène, mouchetée, nucléolaire ou centromérique) sont réalisées. Les principaux AAN retrouvés et leur fréquence au cours de la ScS sont les suivants :

- Ac anti-centromères (20 à 40%)
- Ac anti-topoisomérase1 (anti-Scl70) (20 à 30%)
- Ac anti-ARN polymérase III, associés à un risque élevé de CRS
- Ac anti-Fibrillarine (4 à 10%)
- Ac anti-Th/To (2 à 5%)
- Ac anti PM-Scl, Ac anti-Ku ; qui sont les Ac classiques des syndromes de chevauchement ScS-myosite (2%)

Les deux AAN les plus fréquents sont les anti-centromères et les anti-Scl70 et concernent au total 80% des patients^{92,161}. Les Ac de type anti-centromères, détectés chez 40% des patients, sont surtout retrouvés dans les formes cutanées limitées¹⁶². Les Ac anti topoisomérase de type 1 (ou anti Scl70) sont préférentiellement associés aux formes cutanées diffuses¹⁶¹.

Les Ac anti-ARN polymérase de type III, positifs chez environ 15% des malades, sont plus souvent associés à la survenue d'une CRS et au développement de cancers¹⁶³. De nombreux auto-Ac non spécifiques ont également été décrits. Ils ciblent par exemple les fibroblastes, les cellules endothéliales, les MMP-1 et -3, et le PDGF-R.

La capillaroscopie péri-unguéale est un examen non invasif et indolore, qui permet une étude morphologique et dynamique des capillaires au lit de l'ongle. Elle doit être réalisée au moins une fois devant tout phénomène de Raynaud atypique pour rechercher une microangiopathie organique et permettre un diagnostic précoce de la ScS. La présence de zones avasculaires (témoins d'une raréfaction du réseau vasculaire), de dystrophies capillaires ou encore de mégacapillaires sont très évocateurs de la ScS^{54,164}.

D'autres examens complémentaires permettent d'identifier les complications viscérales et de préciser le pronostic du patient : la réalisation d'une imagerie thoracique et d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires (EFR) avec détermination de la Diffusion Libre du monoxyde de

carbone (DLCO) est indispensable pour rechercher une atteinte pulmonaire de la ScS. De plus, une échocardiographie transthoracique permettra le dépistage de l'HTAP. Enfin, une manométrie œsophagienne et une fibroscopie œsogastroduodénale seront réalisées en cas de manifestations digestives.

1.4.2. Classifications

La ScS se caractérise par une grande hétérogénéité dans son expression clinique, son évolution et par voie de conséquence, son pronostic. Plusieurs classifications ont été proposées. Historiquement, la classification de référence est celle de l'*American College of Rheumatology* (ACR) datant de 1980 (Tableau 1) dont les critères présentent une bonne spécificité (98%) mais manquent de sensibilité (34% dans les formes limitées)¹⁶⁵.

Diagnostic de ScS si 1 critère majeur ou au moins 2 critères mineurs
<p><u>Critère Majeur</u></p> <p>Sclérose cutanée proximale remontant vers la racine des membres au-delà des articulations métacarpo- et/ou métatarsophalangiennes</p>
<p><u>Critères Mineurs</u></p> <p>Sclerodactylie (épaississement cutané limité aux doigts et aux orteils)</p> <p>Cicatrice déprimée d'un doigt ou perte de substance de la partie distale de la pulpe digitale</p> <p>Fibrose pulmonaire des bases</p>

Tableau 1 : Critères diagnostiques de la ScS selon l'*American College of Rheumatology* définis en 1980¹⁶⁵

En 1988, LeRoy *et al.* ont individualisé deux principales catégories de ScS sur la base de l'extension de l'atteinte cutanée¹⁶⁶ (Figure 8) :

- **Les formes cutanées limitées (l-ScS)**, qui concernent deux tiers des patients, au cours desquelles l'atteinte cutanée est distale (mains, avant-bras, face, pieds, jambes) mais ne remonte pas au-dessus des coudes et des genoux. Ces formes concernent plus de la moitié des patients sclérodermiques et sont généralement associées à une HTAP.
- **Les formes cutanées diffuses (d-ScS)**, au cours desquelles l'atteinte cutanée s'étend au-delà des coudes et des genoux, intéressant la partie proximale des membres et/ou le tronc. Ces formes sont généralement associées aux atteintes viscérales précoces (pulmonaires, cardiaques, rénales ou digestives). Leur pronostic est globalement moins bon (moins de 50% de survie à 10 ans contre 75% pour les formes limitées).

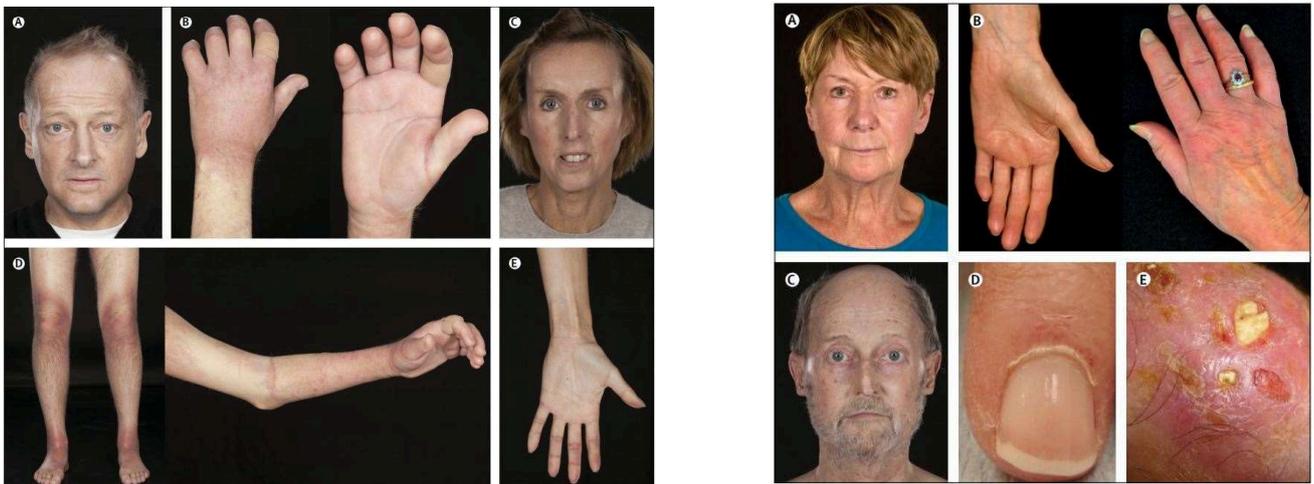


Figure 8 : Formes cutanées diffuses (à gauche) et limitées (à droite) de ScS d'après Denton et Khanna¹⁴¹

Le syndrome de CREST associant Calcinose, syndrome de Raynaud, atteinte Œsophagienne, Sclerodactylie et Télangiectasie, constitue, dans la plupart des cas, une entité particulière de forme cutanée limitée de ScS.

En 2001, LeRoy et Medsger ont proposé de nouveaux critères de classification pour la ScS en introduisant la notion de ScS sans atteinte cutanée¹⁶⁷. En effet, s'ajoutent à ces deux présentations principales (cutanées limitées et diffuses) des formes rares de ScS *sine scleroderma* définies par la présence d'un phénomène de Raynaud et des anomalies capillaroscopiques, sans aucune lésion de sclérose cutanée. Ces formes représentent moins de 5% des malades. (Figure 9).

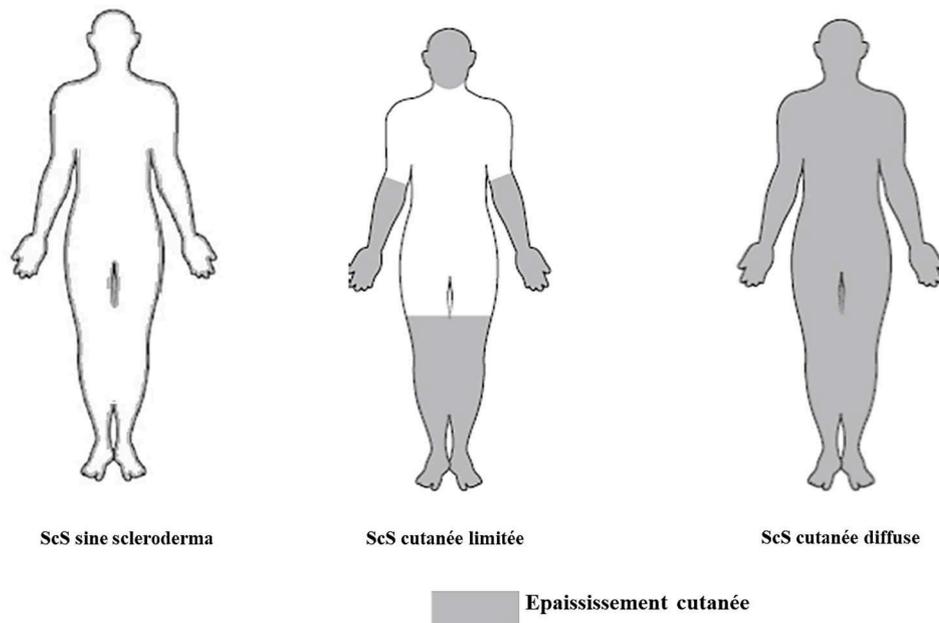


Figure 9 : Formes cliniques de ScS selon LeRoy et Medsger en 2001¹⁶⁷

Enfin, de nouveaux critères de classification de la ScS ont été établis par l'EULAR et l'ACR en 2013 (Tableau 2)¹⁶⁸. Ils apportent une meilleure sensibilité (91%) et une meilleure spécificité (92%) pour la classification des patients comparativement aux critères précédents. Le diagnostic de ScS repose, à ce jour, sur des critères cliniques, immunologiques et paracliniques et toute suspicion clinique de ScS doit donner lieu à une recherche d'AAN et à la réalisation d'une capillaroscopie.

DOMAINE	CRITERE *	SCORE **
Atteinte proximale de la peau	Epaississement cutané des doigts des deux mains s'étendant au-delà des articulations métacarpo-phalangiennes	9
Epaississement de la peau des doigts	Doigts boudinés	2
	Atteinte des doigts ne dépassant pas les articulations métacarpo-phalangiennes	4
Lésions pulpaire	Ulcères pulpaire digitaux	2
	Cicatrices déprimées	3
Télangiectasies		2
Anomalies capillaroscopiques		2
Atteinte pulmonaire	HTAP et/ou fibrose pulmonaire	2
Phénomène de Raynaud		3
Anticorps spécifiques de la ScS	Anti-topoisomérase I Anti-centromères Anti-ARN polymérase III	3

Tableau 2 : Critères de classification ACR/EULAR de la ScS établis en 2013

** Le critère peut être retenu s'il est présent à un moment de l'histoire clinique*

*** Le poids de chaque item présent doit être additionné pour obtenir un score total.
Un score supérieur ou égal à 9 classe les patients comme atteints de ScS.*

Il est à noter que ces critères ne sont pas des critères de diagnostic mais seulement des critères de classification de la ScS au sein des autres maladies systémiques.

1.4.3. Evolution et pronostic

La ScS est responsable d'une réduction significative de la survie et le pronostic est globalement moins bon pour les formes cutanées diffuses que pour les formes cutanées limitées avec moins de 50% de survie à 10 ans contre 75%¹⁴⁵. Les autres facteurs associés au risque de décès sont l'âge avancé au diagnostic, le sexe masculin et les atteintes d'organes profonds.

C'est principalement l'atteinte pulmonaire qui conditionne le pronostic avec une survie à 5 ans supérieure à 90% en l'absence de PID contre 70% en présence de PID¹⁶⁹. Également, la progression vasculaire pèse fortement sur le pronostic et a un rôle central dans les complications viscérales telles que l'HTAP, la CRS, la myocardiopathie.

Les auto-Ac ont également une valeur pronostique puisque les patients avec des Ac anti-ARN polymérase III positifs ont une survie à 10 ans de 30% contre 93% pour anti-centromères et 66% pour anti-Scl70.

Les formes d-ScS se définissent par des lésions cutanées rapidement évolutives, d'extension maximale en 1 à 5 ans après apparition du premier signe clinique en dehors du phénomène de Raynaud. Chez ses patients, les complications viscérales apparaissent généralement dans les 3 à 5 ans et se manifestent par des atteintes musculaires, digestives, rénales, pulmonaires ou cardiaques. On observe plus rarement des manifestations viscérales chez les patients présentant une forme l-ScS bien qu'elles puissent se compliquer d'HTAP et de manifestations digestives sévères.

La gravité de ces atteintes viscérales justifie leur recherche systématique et répétée par un interrogatoire dirigé, un examen clinique poussé et des analyses complémentaires. En effet, la prise en charge thérapeutique précoce de ces complications est un facteur déterminant pour la survie des patients.

Enfin, l'association « ScS-cancers » n'est pas rare puisque 3 à 10% des patients atteints de ScS développeront au moins un cancer au cours de leur vie¹⁷⁰. Aussi, le développement de la ScS pourrait être un syndrome paranéoplasique directement en lien avec une réponse immunitaire contre le cancer, particulièrement pour les patients ayant développé des Ac anti-ARN polymérase III¹⁷¹.

L'ensemble de ces paramètres justifie un suivi spécialisé dans un centre expert, au minimum annuel et adapté aux complications associées.

1.5. Modèles d'étude

1.5.1. Modèles précliniques de la sclérodermie systémique *in vivo*

Il existe plus d'une vingtaine de modèles animaux de ScS, principalement représentés par des modèles murins. Les caractéristiques des principaux modèles précliniques de ScS sont résumées dans le Tableau 3.

Aucun de ces modèles ne reflète entièrement la complexité de la maladie et l'hétérogénéité des phénotypes cliniques. Il conviendra donc de choisir le modèle le plus pertinent en fonction de la problématique d'étude ou de l'approche thérapeutique évaluée.

	Fibrosis	Inflammation	Autoimmunity	Vasculopathy	Key mechanisms
Genetic models					
Tsk-1 mice	Skin	No	Autoantibodies	Endothelial dysfunction but no typical features of SSc vasculopathy	Spontaneous autosomal dominant mutation in the fibrillin gene FBN1
	Lung: emphysema rather than fibrosis				
Tsk-2 mice	Skin	Inflammatory cellular infiltrate in the tissues	Autoantibodies	No	Unknown mechanism
Fra-2 mice	Skin	Systemic inflammation	No	Loss of small blood vessels in the skin and lung	Transgenic construct with the ubiquitous promoter H2Kb and the Fra-2 locus
	Lung			Endothelial cell apoptosis	Fra-2 is a member of the activator protein 1 family
UCD-200 chickens	Oesophagus	Perivascular mononuclear cell infiltrates	Autoantibodies	Raynaud's like syndrome	Activation and apoptosis of endothelial cells
	Heart			Necrotic and ischaemic lesions	
	Lung				
	Kidney				
TGFβRIIΔk mice	Skin (at 12 weeks)	Mild	No	Vascular remodelling in the lungs	Fibroblast-specific activation of TGFβ signalling
	Lung				
	Fibrotic cardiomyopathy				
Inducible models					
Bleomycin	Skin	Inflammatory cellular infiltrates	Autoantibodies	Endothelial cell apoptosis	Production of reactive oxygen species
	Lung				
HOCI	Skin	Inflammatory cells infiltrate in the lung	Autoantibodies	Endothelial cell damages (↑ sVCAM1)	Production of H ₂ O ₂ by skin fibroblasts consequent to OH [•] generation in the skin
	Lung	High AOPP and nitrates serum concentration	IL-4, IL-13		Oxidation of DNA-Topoisomerase-1 leading to a breach of tolerance and to the diffusion of the disease
Sci-GVHD	Kidney	Tissue infiltration of T cells, monocytes, mast cells	Autoantibodies		
	Skin	Alloreactive T-cells			
	Lung		Increase in splenic B cells number		
	Kidney				

Human systemic sclerosis (SSc) is characterized by fibrosis, inflammation, autoimmunity and vasculopathy. Sci-GVHD, sclerodermatous graft versus host disease.

Tableau 3 : Principaux modèles précliniques génétiques et inductibles de la ScS d'après Batteux *et al.*¹⁷²

1.5.1.1. Modèles induits chimiquement

Les modèles précliniques de ScS induits pas un agent chimique externe sont les plus représentés dans la littérature. Ils miment au mieux la pluralité des mécanismes qui entraînent secondairement la fibrose et la vasculopathie.

- **Bléomycine**

Parmi ces modèles induits chimiquement, ceux utilisant la bléomycine chez les rongeurs, soit par des injections sous-cutanées, soit par inhalation intra-trachéale sont particulièrement utilisés. La bléomycine est un glycopeptide anticancéreux produit par *Streptomyces verticillus*. Elle provoque une inflammation locale sévère à l'origine de lésions de fibrose limitées au tissu ou organe directement exposé. La bléomycine exerce son action pro-fibrosante par l'intermédiaire de *Reactive Oxygen Species* (ROS) qui entraînent la production de TGF β . De plus, ces ROS endommagent les cellules environnantes, induisent l'expression de molécules d'adhésion sur l'endothélium aboutissant une infiltration leucocytaire et à l'activation des fibroblastes¹⁷³. Par ailleurs, on observe une raréfaction des microvaisseaux dans la zone lésée¹⁷⁴. Ce modèle est, à ce jour, le plus couramment utilisé compte tenu de sa facilité de mise en œuvre.

- **Acide hypochloreux (HOCl)**

Un autre modèle de ScS induit chimiquement consiste en l'injection quotidienne intradermique d'acide hypochloreux (HOCl) préparé extemporanément pendant 6 semaines. C'est l'un des modèles les plus complets en termes de manifestations cliniques, associant une atteinte pulmonaire (PID), une fibrose cutanée et une atteinte vasculaire rénale. De plus, l'immunisation contre la topoisomérase I et la production d'anticorps anti-Scl70 semblent déterminants dans l'établissement des manifestations systémiques puisque les souris immunodéficientes ne développent pas de PID après injections d'HOCl¹⁷⁵.

Il est également observé dans ce modèle certaines anomalies vasculaires similaires à celle observées chez l'homme. En effet, chez les souris traitées par l'HOCl, on observe une augmentation des taux de microvésicules extracellulaires, de *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM) et de la E-sélectine circulants¹⁷⁶. Dans les modèles de ScS induits par la bléomycine ou l'HOCl, le développement de ROS représente un acteur central bien que les mécanismes qui conduisent à la propagation de la maladie diffèrent.

- **Chlorure de vinyle**

Ce modèle original est basé sur l'accouplement de souris femelles BALB/c à des mâles C57BL/6J suivi d'une exposition quotidienne par voie intrapéritonéale au chlorure de vinyle. Ce solvant organique induit chez ces souris femelles une majoration du microchimérisme objectivé par une augmentation des cellules fœtales circulantes chez ces souris, à l'origine d'une fibrose cutanée avec infiltrat immunitaire et de stigmates d'auto-immunité inconstants¹⁷⁷.

1.5.1.2. Modèles génétiques spontanés

- **Poulets de l'Université de Californie à Davis lignée 200**

Cette lignée de poulet de l'Université de Californie à Davis lignée 200 développe spontanément une connectivité héréditaire. Celle-ci se caractérise par des occlusions artériolaires aboutissant à une fibrose cutanée et œsophagienne mais également à une polyarthrite ainsi qu'au développement d'AAN. Ce modèle aviaire est particulièrement intéressant pour l'étude des lésions endothéliales^{178,179}.

- **Souris Tight Skin 1 et 2**

Ces lignées de souris présentent une mutation hétérozygote constitutionnelle sur le gène de la fibrilline (FBN1), composant majeur de la MEC¹⁸⁰. Après quelques semaines de vie, les animaux développent des lésions de fibrose cutanée, des anomalies pulmonaires et des auto-Ac circulants.

Un second modèle nommé « Tsk 2 » a été développé dans un deuxième temps associant aux lésions de fibrose, un important infiltrat inflammatoire dans le derme profond¹⁸¹. L'atteinte vasculaire dans les deux modèles Tsk1 et 2 est variable selon les équipes.

1.5.1.3. Modèles génétiques induits

- **Souris transgéniques surexprimant Fra-2**

Ce modèle transgénique repose sur la surexpression du facteur de transcription Fra-2. Fra-2 est un effecteur en aval des voies pro-fibrosantes du TGFβ et du PDGF. Le rationnel de ce modèle repose sur la surexpression de Fra-2 dans les parois vasculaires des biopsies cutanées de patients atteints de ScS. Ce modèle associe fibrose pulmonaire, microangiopathie et inflammation systémique mais ne permet pas le développement d'auto-Ac¹⁸².

- **Souris mutées sur le gène Fli-1**

Ce modèle plus récent repose sur la délétion du gène Fli-1 à l'état hétérozygote (Fli-1 ^{+/-}) ou sur la perte totale d'expression de ce gène dans les cellules endothéliales (Fli-EC KO). Ce dernier conduit à une dysfonction endothéliale sévère avec remodelage vasculaire anarchique et hyperperméabilité vasculaire¹⁸³.

- **Souris surexprimant Wnt-10b**

Ce modèle transgénique de souris surexprimant le gène Wnt10 conduit au développement d'une fibrose cutanée ainsi qu'à une perte de tissu adipeux et une accumulation de myofibroblastes. Il est donc particulièrement intéressant pour l'étude des processus fibrotiques¹⁸⁴.

- **Souris transgénique TGFβRII sans kinase associée**

La surexpression du récepteur au TGFβ de type II (TGFβRII) déficient en kinase uniquement au niveau des fibroblastes induit un phénotype fibrotique à la fois cutané et pulmonaire, indépendamment de processus inflammatoires ou d'auto-immunité¹⁸⁵.

1.5.1.4. Modèle de réaction du greffon contre l'hôte sclérodermique (GVH-Scl)

La maladie chronique du greffon contre l'hôte (ou en anglais *Graft Versus Host*, GVH) est une complication redoutable des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques. Elle se rapproche cliniquement d'une forme diffuse de ScS, avec dans 15% des cas une fibrose et une inflammation chronique cutanées, pulmonaires et digestives^{186,187}. Ce modèle est inspiré sur le modèle décrit par Jafee et Claman¹⁸⁸ reposant sur l'administration de cellules hématopoïétiques médullaires et spléniques provenant de souris B10.D2 à des souris BALB/c irradiées. Les souris receveuses développent un épaississement de la peau, des lésions de fibrose cutanée et viscérale, des anomalies vasculaires et des auto-Ac spécifiques de la ScS¹⁸⁹.

1.5.2. Modèles d'étude *in vitro* de la dysfonction endothéliale au cours de la sclérodermie systémique

L'étude des mécanismes physiopathologiques sous-tendant les altérations endothéliales au cours de la sclérodermie est un enjeu majeur. Cependant, celle-ci est rendue difficile, d'une part, par le caractère peu accessible de l'endothélium en situation pathologique et d'autre part, par la rareté des modèles animaux précliniques représentatifs de l'atteinte vasculaire au cours de la ScS.

Plusieurs modèles d'étude *in vitro* ont ainsi été développés pour caractériser au niveau cellulaire les dommages vasculaires associés à la ScS. Deux principales stratégies peuvent être envisagées à partir de cellules de patients atteints de ScS : (i) l'expansion *ex vivo* de cellules endothéliales à partir du sang périphérique ou autre tissu riche en populations vasculaires et (ii) l'utilisation de cellules souches pluripotentes humaines induites après reprogrammation génétique et différenciation.

1.5.2.1. Expansion de cellules endothéliales *ex vivo*

L'expansion *ex vivo* de cellules endothéliales issues de patients permet de fournir un matériel biologique endothélial comportant « une empreinte » de la maladie¹⁹⁰.

L'étude des progéniteurs endothéliaux circulants de type « *Endothelial Colony Forming Cells* » (ECFC) circulants est délicate chez les patients sclérodermiques en raison de la nécessité de prélever un grand volume de sang. Cependant des études reposant sur ce modèle ont documenté l'association entre la *down-regulation* de voies pro-angiogéniques dépendantes de l'EGFL7 (*Epidermal Growth Factor-Like domain 7*) ou du VEGFR1 (*VEGF Receptor 1*) et l'atténuation des capacités de régénération endothéliale ainsi que la progression des atteintes microvasculaires au cours de la ScS^{191,192}.

D'autres équipes ont isolé les populations endothéliales microvasculaires dermiques humaines (en anglais *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*, HDMEC) par tris immunomagnétiques CD31+ à partir de biopsies cutanées. Cette stratégie a été utilisée pour mettre en évidence un défaut d'expression de la protéine CCN3 dans les HDMEC de patients sclérodermiques en lien avec une altération des processus angiogéniques¹⁹³. De même, Cipriani *et al.* ont démontré un défaut du *crossstalk* entre HDMEC et cellules périvasculaires au cours de la ScS dans un modèle *in vitro* similaire⁷².

Ces études confortent la relevance de ces modèles cellulaires *in vitro* pour mieux appréhender les mécanismes associés à la vasculopathie au cours de la ScS.

1.5.2.2. Utilisation de cellules souches pluripotentes humaines induites

L'emploi de cellules souches pluripotentes humaines induites (en anglais *human induced Pluripotent Stem Cell*, hiPSC) est une stratégie largement utilisée pour la modélisation *in vitro* de pathologies. La possibilité de différencier les hiPSC de patients en cellules endothéliales offre des cellules cibles pertinentes pour mieux comprendre la physiopathologie endothéliale et évaluer des stratégies thérapeutiques.

Dans le contexte de la ScS, l'étude de Gholami *et al.* confirme la possibilité d'obtention d'hiPSC à partir de fibroblastes dermiques ou de cellules mononucléées du sang périphérique de patients sclérodermiques ainsi que la faisabilité d'une différenciation endothéliale à partir des cellules reprogrammées¹⁹⁴. Les auteurs fournissent également des données préliminaires en faveur d'un déficit du comportement angiogénique de cellules endothéliales pathologiques reprogrammées. Ce déficit est associé à une diminution de l'expression de la VE-cadhérine mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à étudier.

1.6. Prise en charge thérapeutique

L'absence de traitement agissant simultanément sur chacun des différents mécanismes pathogéniques de la ScS rend la prise en charge thérapeutique particulièrement difficile. Les thérapeutiques actuelles comportent trois objectifs principaux :

- Limiter ou arrêter la progression de la maladie ;
- Réduire ses séquelles ;
- Améliorer la qualité de vie des patients par une prise en charge du handicap.

Par ailleurs, les facteurs potentiellement aggravants (silice, solvants) doivent être éradiqués.

1.6.1. Traitements symptomatiques

1.6.1.1. Syndrome de Raynaud

Les mesures préventives peuvent être très efficaces dans la prise en charge du phénomène de Raynaud : protection contre le froid, port de sous-gants en soie, bonne isolation des pieds. Les inhibiteurs calciques constituent le traitement de première intention dans la prise en charge du syndrome de Raynaud. La nifédipine est le seul à avoir obtenu une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) dans la ScS et permet de réduire de 30% le nombre de crises. Néanmoins, d'autres inhibiteurs calciques peuvent être prescrits du fait d'une meilleure tolérance.

En seconde intention, plusieurs molécules peuvent être proposées : le losartan (antagoniste spécifique des récepteurs de l'angiotensine II), l'iloprost par voie intraveineuse (analogue des prostacyclines) ou encore le sildénafil (inhibiteur de la phosphodiesterase 5).

Certains médicaments pouvant aggraver ou déclencher une crise doivent être évités : bêtabloquants, dérivés de l'ergot de seigle, clonidine, antimigraineux... Enfin, il est important de noter qu'aucun traitement ne permet de faire disparaître définitivement le phénomène de Raynaud.

1.6.1.2. Ulcères digitaux et calcinose

Le traitement des ulcérations digitales est d'abord préventif (hygiène cutanée et unguéale, protection des doigts, soins locaux en cas de plaies, arrêt du tabac) mais certaines molécules peuvent être utilisées en cas d'ulcérations actives telles que l'iloprost et le sildénafil. Le bosentan (antagoniste mixte des récepteurs de l'ET-1) est quant à lui prescrit à visée préventive en cas de maladie ulcéreuse digitale sévère récidivante. Une détersion mécanique (voire chirurgicale) peut être nécessaire dans les formes les plus graves.

Cette prise en charge pharmacologique est nécessairement associée à des mesures de protection contre le froid (gants, vêtements thermiques, chaufferettes) et de protection cutanée à type d'émollients.

1.6.1.3. Manifestations digestives

Toutes les mesures diététiques et posturales doivent être mises en place pour limiter le RGO, deuxième manifestation la plus courante après le syndrome de Raynaud. Un traitement par inhibiteur de la pompe à protons ou anti-acides est souvent proposé au long cours. En cas de RGO symptomatique, des pansements digestifs sont prescrits aux patients.

Le prise d'antibiotiques, généralement en cures séquentielles, est indiquée lors de pullulation microbienne de l'intestin grêle. Enfin, une nutrition entérale ou parentérale peut être discutée dans certaines formes sévères d'altération de l'état général.

1.6.1.4. Crise rénale sclérodermique

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion constituent le traitement de choix initial de la CRS. Le pronostic à court terme de la CRS reste sombre, malgré les thérapeutiques actuelles, avec environ 20% de décès la première année.

La pression artérielle doit être maintenue sous le seuil de 140/90 mmHg. En cas d'insuffisance rénale terminale irréversible, la transplantation rénale peut être discutée.

Enfin, il est important de limiter la prescription de glucocorticoïdes et de ne pas dépasser 15mg/jour d'équivalent prednisone.

1.6.1.5. Hypertension artérielle pulmonaire

Un diagnostic précoce de l'HTAP est essentiel et l'initiation d'un traitement spécifique doit être discutée en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP). Il repose tout d'abord sur le respect de mesures générales : l'éviction des efforts entraînant un essoufflement important, des bains chauds et des séjours en altitude ainsi que l'arrêt du tabac.

Si ces mesures s'avèrent insuffisantes, différents traitements vasoactifs (antagonistes des récepteurs de l'ET-1, analogues de la phosphodiesterase 5, analogues de la prostacycline) pourront être proposés, seuls ou en association.

1.6.1.6. Arthromyalgies

Pour les atteintes articulaires, les antalgiques et la corticothérapie à faible dose peuvent être prescrits, en association à des séances de kinésithérapie et d'ergothérapie.

Malheureusement, ces traitements symptomatiques ne stoppent pas l'évolution de la maladie et certains patients évolueront vers une défaillance d'organes où seule la transplantation de l'organe concerné permettra de prolonger la survie. Par ailleurs, des thérapies non pharmacologiques comme la rééducation fonctionnelle peuvent réduire le handicap associé à la ScS, mais leur efficacité est fortement dépendante de l'adhésion du patient au traitement.

1.6.2. Traitements immunomodulateurs

Les traitements immunosuppresseurs et/ou immunomodulateurs doivent être réservés aux formes d-ScS récentes (moins de 5 ans) ou évolutives. L'efficacité de ces traitements, souvent jugée sur l'amélioration des atteintes cutanées, limite la puissance des résultats.

L'utilisation de faibles doses de prednisone (≤ 15 mg/j) apporte un bénéfice net aux patients présentant des formes l-ScS œdémateuses. Cependant, elle ne fait pas l'objet de consensus et nécessite une bonne évaluation du rapport bénéfices/risques avec notamment le risque de précipiter une CRS. Une surveillance étroite de la pression artérielle et de la fonction rénale est par ailleurs nécessaire. De plus, la corticothérapie peut freiner la cicatrisation d'un trouble trophique digital.

Les traitements immunomodulateurs conventionnels tels que le méthotrexate ou le Mycophénolate Mofétil (MMF) peuvent être proposés pour limiter l'extension de la fibrose cutanée ou certaines complications articulaires sévères^{195,196}. Dans les formes cutanées graves, le MMF et le cyclophosphamide (CYC) peuvent être utilisés en début de prise en charge¹⁹⁷. Une étude a démontré la supériorité du rituximab (Ac monoclonal anti CD-20) dans la prise en charge de la PID par rapport au CYC¹⁹⁸. À ce jour, aucun traitement de fond anti-fibrosant ou immunosuppresseur seul n'a permis d'améliorer la survie dans le cadre d'étude prospective randomisée.

Le rationnel sous-tendant l'utilisation des thérapies anti-TNF α chez les patients sclérodermiques repose sur la présence d'un infiltrat cutané inflammatoire dans les stades précoces de forme cutanée diffuse. Cependant, l'efficacité de ces molécules dans la ScS reste à ce jour controversée. En effet, en 2011, un groupe d'experts du consensus EULAR ne recommandait pas l'emploi des anti-TNF α en routine dans le traitement de la ScS mais suggérait que ces traitements pourraient être une alternative thérapeutique dans la prise en charge des manifestations arthritiques associées à la ScS¹⁹⁹.

1.6.3. Thérapies ciblées et biothérapies en cours d'évaluation

Au cours de la dernière décennie, de nouveaux mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la ScS ont été découverts offrant de nouvelles perspectives thérapeutiques. La Figure 10 présente une actualisation des molécules évaluées lors d'essais cliniques ciblant un ou plusieurs acteurs physiopathologiques de la maladie.

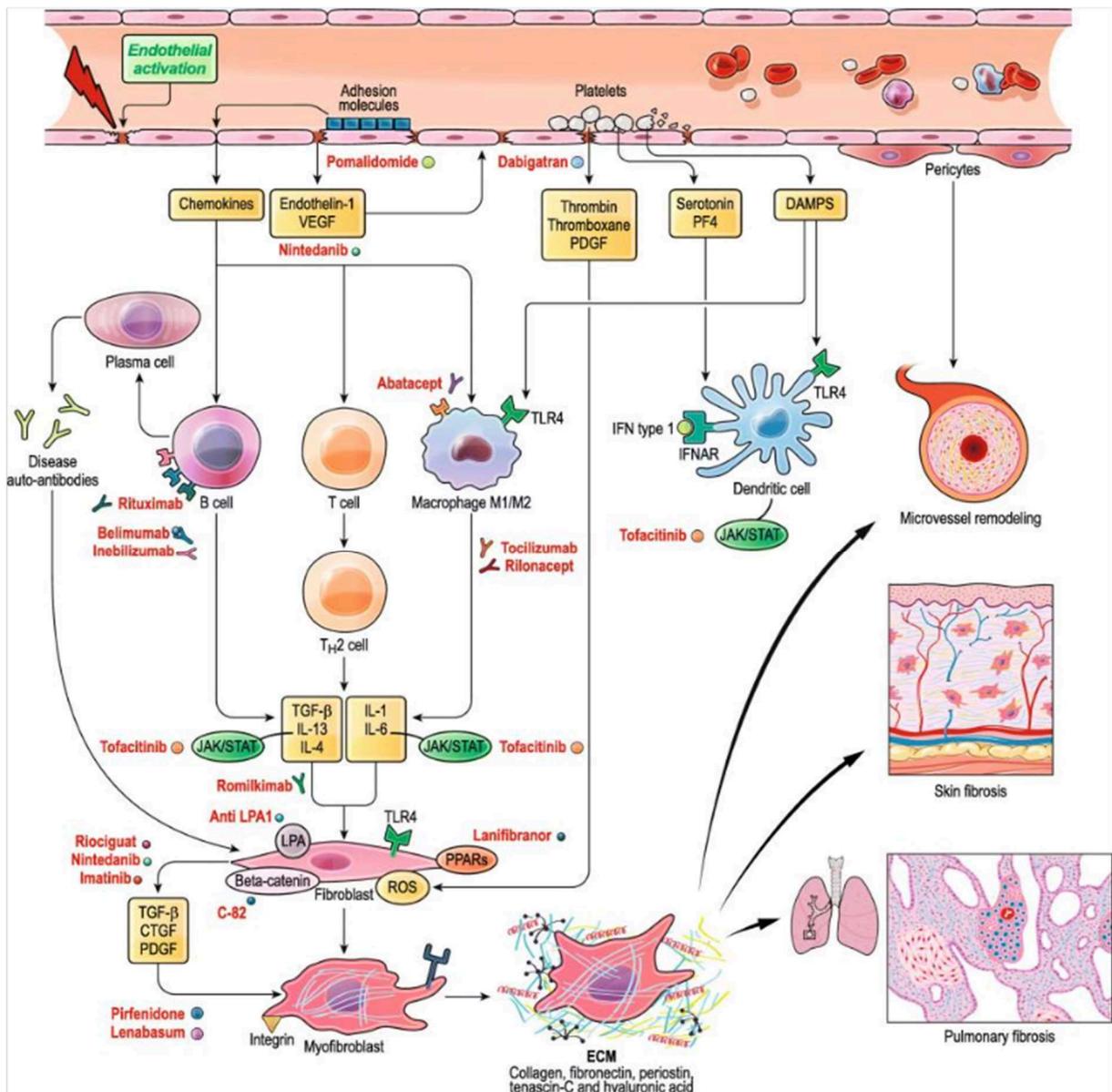


Figure 10 : Principales cibles thérapeutiques en cours d'évaluation dans la ScS d'après Campochiaro et Allanore²⁰⁰

Deux thérapies ciblées et ont été approuvées par la *Food and Drug Administration* (FDA) dans la prise en charge de la PID associée à la ScS suite à des essais cliniques de phase III : le nintedanib et le tocilizumab.

- **Nintedanib**

Le nintedanib est un Inhibiteur de Tyrosine Kinase (ITK) qui bloque le récepteur-1 du FGF, le récepteur-2 du VEGF et les récepteurs- α et β du PDGF²⁰¹. Son potentiel antifibrotique et anti-inflammatoire a déjà été démontré dans des modèles murins de ScS avec PID (bléomycine, Tsk1, GVH-Scl)²⁰². Un essai randomisé en double aveugle, contrôlé (essai SENSICIS) a évalué l'efficacité du nintedanib dans les PID associées à la ScS sur 576 patients²⁰³. Il s'agit d'une étude positive sur le critère d'étude principal puisque le taux ajusté de déclin de la Capacité Vitale Forcée (CVF) était de -52 ml par an dans le groupe nintedanib et de -93 ml par an dans le groupe placebo. Cet ITK, déjà indiqué dans la fibrose pulmonaire idiopathique, a été approuvé pour le traitement de la PID associée à la ScS par la FDA en 2019 et par l'*European Medicines Agency* (EMA) en avril 2020.

- **Tocilizumab**

La surexpression de l'IL-6 dans le sang et la peau des patients sclérodermiques a motivé l'évaluation du tocilizumab (Ac monoclonal anti-récepteur IL-6) dans la ScS. Un essai de phase II randomisé contre placebo en double aveugle testant l'efficacité du tocilizumab chez 87 patients sclérodermiques (essai faScSinate) a rapporté des résultats encourageants sur la réduction de l'épaisseur cutanée et l'amélioration de la fonction pulmonaire²⁰⁴.

L'essai de phase III sur une plus large cohorte contre placebo (210 participants, 75 sites de recrutement, 20 pays) n'a pas atteint l'objectif principal (amélioration du mRSS à 48 semaines)²⁰⁴. Cependant, il semble que le tocilizumab puisse préserver la fonction pulmonaire dans les formes diffuses et précoces de ScS²⁰⁵. En mars 2021, la FDA a ainsi approuvé le tocilizumab par voie sous-cutanée et intraveineuse pour ralentir le rythme du déclin de la fonction pulmonaire chez les adultes atteints d'une PID associée à la ScS.

Une quinzaine d'autres thérapies ciblées et biothérapies ont été évaluées ou sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase I/II chez les patients sclérodermiques :

- **Inebilizumab**

Les résultats d'un essai randomisé de phase I évaluant cet anticorps monoclonal anti-CD19 ont montré des résultats encourageants sur la fibrose cutanée sans amélioration de la fibrose pulmonaire²⁰⁶.

- **Dabigatran**

Le dabigatran est un inhibiteur direct de la thrombine testé chez les patients sclérodermiques ayant développé une PID. L'essai de phase I a révélé l'amélioration du mRSS sans bénéfice sur les tests fonctionnels pulmonaires²⁰⁷.

- **C-82**

Cette molécule induisant une inhibition des gènes activés par la voie Wnt a été évaluée par voie topique dans les formes précoces de d-ScS. Bien qu'aucun bénéfice clinique direct n'ait pu être observé après 4 semaines de traitement, des biopsies cutanées régulières chez ses patients ont montré une amélioration de l'adipogenèse chez ses patients²⁰⁸.

- **Rilonacept**

Le rilonacept est une protéine de fusion ciblant l'IL-1, aussi connue sous le nom de « IL-1 trap ». Une étude de phase I/II randomisée contre placebo a été menée sur des patients atteints de ScS car il semble que l'activation de la voie de l'IL-1 soit impliquée dans le développement de la fibrose. Les résultats n'ont pas montré de supériorité du rilonacept *versus* placebo²⁰⁹.

- **Romilkimab**

Le romilkimab est un Ac bispécifique ciblant les interleukines 4 et 13, deux interleukines Th2-dépendante, élevées dans les sérums et biopsies cutanées de patients sclérodermiques²¹⁰. Le mRSS, le score de qualité de vie et la CVF se sont significativement améliorés dans les formes précoces de d-ScS traités par romilkimab *versus* placebo. Cet essai clinique encourageant incite à la mise d'un essai de phase III sur une cohorte plus grande afin de confirmer ces résultats²¹¹.

- **Tofacitinib**

C'est un inhibiteur des voies JAK/STAT, voies impliquées dans la fibrose cutanée et pulmonaire. La tolérance et l'efficacité du tofacitinib ont été évaluées dans un essai de phase I/II contre placebo et rapportent une bonne tolérance du traitement et une tendance à l'amélioration clinique des patients²¹².

- **Fresolimumab**

Une étude pilote ouverte objective une amélioration rapide de la fibrose cutanée dans les formes rapidement progressives avec cet Ac anti-TGFβ²¹³.

- **Pirfenidone**

Cette molécule, déjà autorisée par la FDA pour le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique, a été évaluée dans la PID des patients sclérodermiques dans un essai randomisé. Bien que la pirféridone ait été globalement bien tolérée, aucune conclusion quant à son efficacité n'a pu être tirée²¹⁴.

- **Lenabasum**

Le lenabasum est un agoniste du récepteur cannabinoïde de type 2 dont l'activation réduit l'inflammation et la fibrose tissulaire. Un essai de phase II évaluant le lenabasum a montré un profil de sécurité et de tolérance acceptable ainsi qu'une efficacité potentielle sur plusieurs critères d'évaluation.

Cependant, cet essai présentait plusieurs limites méthodologiques (fusion des doses, étude à court terme, taille modeste de l'échantillon)²¹⁵. Les résultats de l'étude de phase III en double aveugle, randomisée, contrôlée contre placebo, évaluant l'efficacité et la sécurité du lenabasum chez les patients avec formes cutanées diffuses, n'ont pas encore été publiés²¹⁶.

- **Abatacept**

Il s'agit d'une protéine de fusion recombinante soluble qui inhibe l'activation des cellules T en se liant spécifiquement au CD80 et CD86. Un essai contrôlé randomisé de phase II testant l'efficacité de l'abatacept contre placebo dans les formes diffuses de ScS suggère une bonne tolérance de l'approche sans amélioration significative du mRSS à 12 mois²¹⁷ ni à 18 mois²¹⁸.

- **Belimumab**

Un essai randomisé associant le belimumab (Ac anti-BAFF) et le MMF a mis en évidence un bénéfice de cette association sur la réduction du mRSS chez tous les participants sans différence significative entre les deux bras (MMF seul et MMF + belimumab)²¹⁹.

- **Riociguat**

Il s'agit d'une molécule qui stimule la guanylate cyclase soluble et qui est déjà indiquée dans certaines formes d'HTAP associée à des connectivites²²⁰. Le riociguat a été évalué dans les formes cutanées diffuses de ScS présentant un fort risque de progression de la fibrose cutanée dans un essai randomisé de phase IIb. Les résultats de l'étude n'ont pas mis en évidence de différence significative entre le mRSS moyen des deux groupes²²¹.

- **SAR100842**

C'est un antagoniste oral du récepteur de l'acide lysophosphatidique, récepteur qui stimule la production de MEC. Bien que le mRSS des patients traités par SAR100842 ne se soit pas amélioré significativement durant une étude contre placebo, l'analyse de biopsies cutanées confirme l'implication cette voie dans la pathogenèse de la ScS²²².

- **Les antagonistes du (ou des) récepteur(s) à l'ET-1**

Ils ont déjà fait leur preuve dans le traitement des UD (bosentan) et sont actuellement à l'essai dans d'autres manifestations associées à la ScS (HTAP, CRS).

Bien que de nombreuses molécules émergent ou soient à l'essai dans la prise en charge de la ScS, aucune de ces thérapies n'a pu démontrer un bénéfice significatif sur les manifestations fibrotiques associées à la ScS. La régression de la fibrose (ou *a minima* l'arrêt de progression) représente un véritable challenge qu'aucune des molécules actuellement disponibles dans l'arsenal thérapeutique de la ScS n'a relevé à ce jour.

Au total, les experts s'accordent à dire que la combinaison de thérapies représente l'option la plus prometteuse afin d'agir sur les différentes composantes pathogéniques de la ScS et ainsi stopper, voire guérir, les manifestations cliniques qui y sont associées.

1.6.4. Autogreffe de cellules souches hématoïétiques

L'autogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (auto-CSH) est la seule intervention thérapeutique ayant démontrée un bénéfice significatif sur la survie globale des patients atteints de formes sévères de ScS au cours de ces dernières années. Plus de 4500 procédures d'auto-CSH ont été réalisées pour traiter des patients atteints de pathologies auto-immunes sévères²²³.

1.6.4.1. Rationnel mécanistique

L'efficacité de l'auto-CSH chez des patients atteints de maladies auto-immunes telles que la ScS repose sur une abrogation non spécifique de l'auto-réactivité (reset immunologique), suivie de la reconstitution d'un système immunitaire « naïf », plus tolérant après la réinjection de CSH^{224,225}. Idéalement, les facteurs environnementaux déclencheurs de la ScS ne seront plus suffisamment présents pour activer la cascade pathogénique²²⁶.

Certaines études mettent en évidence un large spectre d'actions de l'approche par auto-CSH sur l'immunité contrairement aux traitements immunomodulateurs conventionnels qui ciblent spécifiquement certains acteurs du système immunitaire²²⁷.

L'analyse de la reconstitution immunologique après l'auto-CSH est en faveur d'un *reset* de la réponse immune suivie de l'induction d'une tolérance *de novo via* la réémergence de LyT et LyB régulateurs présentant un nouveau répertoire immunologique. La reconstitution de l'immunité innée précède celle du système adaptatif : les cellules *Natural Killer* (NK) circulantes différenciées à partir de progéniteurs hématoïétiques CD34+ rejoignent les valeurs normales un mois après la greffe. S'en suit la récupération des LyT puis des LyB dans les 6 mois²²⁵. La mise en place d'un répertoire T diversifié ainsi que la restauration des propriétés immunosuppressives des LyT régulateurs (LyT reg) prennent quant à elles jusqu'à deux ans²²⁸.

En 2016, une étude a analysé les taux circulants de cytokines inflammatoires, pro-fibrotiques, pro-angiogéniques dans le suivi d'auto-CSH chez 20 patients sclérodermiques patients autogreffés²²⁹. Celle-ci rapporte des taux significativement plus élevés d'IL-6, IL-8, IL-10, Interferon γ (INF γ) et de MCP-1 dans le bilan pré-greffe des patients sclérodermiques en comparaison aux sérums de donneurs sains ; preuve d'un état pro-inflammatoire chez ces patients. Rapidement après l'auto-CSH (à 6 mois), les taux d'IL-2, IL-8, TGF β et PDGF diminuent transitoirement. Le taux sérique de MCP-1, molécule ayant une puissante action chimio-attractrice, semble être associé à l'efficacité clinique avec une réduction progressive et significative des niveaux de MCP-1 à 4 ans post auto-CSH.

1.6.4.2. Principales étapes

L'auto-CSH consiste à recueillir et à conserver des CSH chez un patient puis à les lui réinjecter après un traitement dit de « conditionnement ». La greffe se décline classiquement en plusieurs étapes successives : la mobilisation des CSH dans le sang périphérique, la collecte et cryopréservation des CSH, le conditionnement et la greffe (Figure 11).

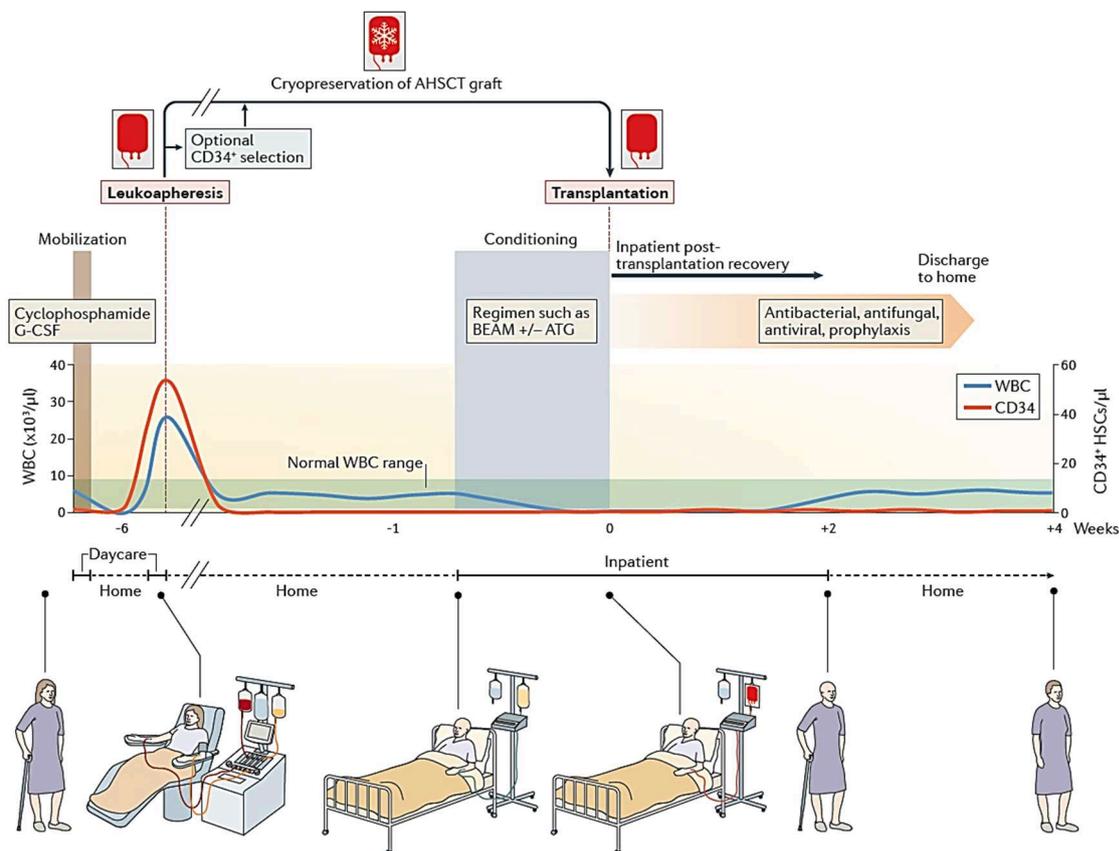


Figure 11 : Protocole d'autogreffes de CSH d'après Muraro *et al.*²³⁰

1.6.4.3. Un traitement validé suite à des essais cliniques randomisés

La ScS est la première maladie auto-immune pour laquelle l'auto-CSH a été associée à un bénéfice significatif sur la survie sans événement au long terme. La validation de cette indication repose sur les résultats d'essais cliniques robustes, et principalement sur 3 d'entre eux : l'essai ASSIST (*American Scleroderma Stem Cell versus Immune Suppression*), l'essai ASTIS (*Autologous Stem Cell Transplantation International Scleroderma*) et l'essai SCOT (*Scleroderma : Cyclophosphamide or Transplantation*).

- **Essai ASSIST**

L'essai ASSIST est le premier essai randomisé évaluant l'efficacité de l'auto-CSH après conditionnement non myéloablatif dans la ScS. Il s'agit d'un essai ouvert, de phase II, monocentrique sur 19 patients atteints de formes diffuses de ScS. Le bras contrôle consiste en l'injection mensuelle par voie intraveineuse de CYC pendant 6 mois. Il s'agit du seul essai randomisé évaluant la greffe de CSH non manipulées (sans tri préalable des cellules CD34+) parmi les trois essais exposés dans ce travail. Les résultats montrent une amélioration de la CVF et une amélioration du mRSS à 2 ans²³¹.

- **Essai ASTIS**

L'essai ASTIS est une étude ouverte multicentrique de phase III randomisée sur 156 patients atteints de formes précoces de ScS diffuses et traités, pour un tiers d'entre eux, par des équipes hospitalières françaises. Ce projet collaboratif a été conduit pendant plus de 12 ans sur 10 pays et 29 sites. Après inclusion dans l'étude, les patients ont été répartis aléatoirement en deux groupes : le premier groupe de patients traités par autogreffe de cellules CD34+ triées après conditionnement non myéloablatif ; le second groupe de patients traités mensuellement par une injection intraveineuse de CYC pendant 1 an. Les résultats ont montré un bénéfice significatif de la procédure d'auto-CSH sur le critère principal de jugement (survie sans évènement à deux ans) ainsi que sur la survie globale. Aussi, la procédure d'autogreffe s'est montrée plus efficace sur l'amélioration des scores cutanés, sur la qualité de vie et sur la fonction pulmonaire, particulièrement chez les patients n'ayant jamais fumé. Cependant, la mortalité liée au traitement était plus importante que celle du bras contrôle pendant la première année post-greffe²³² (Figure 12).

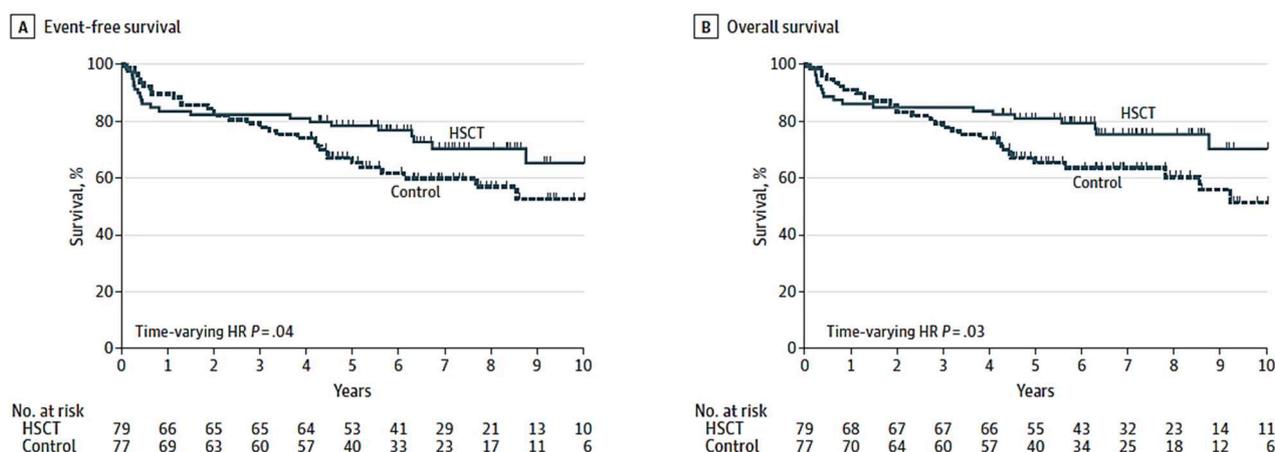


Figure 12 : Courbes de survie au cours de l'essai ASTIS d'après Laar *et al.*²³²

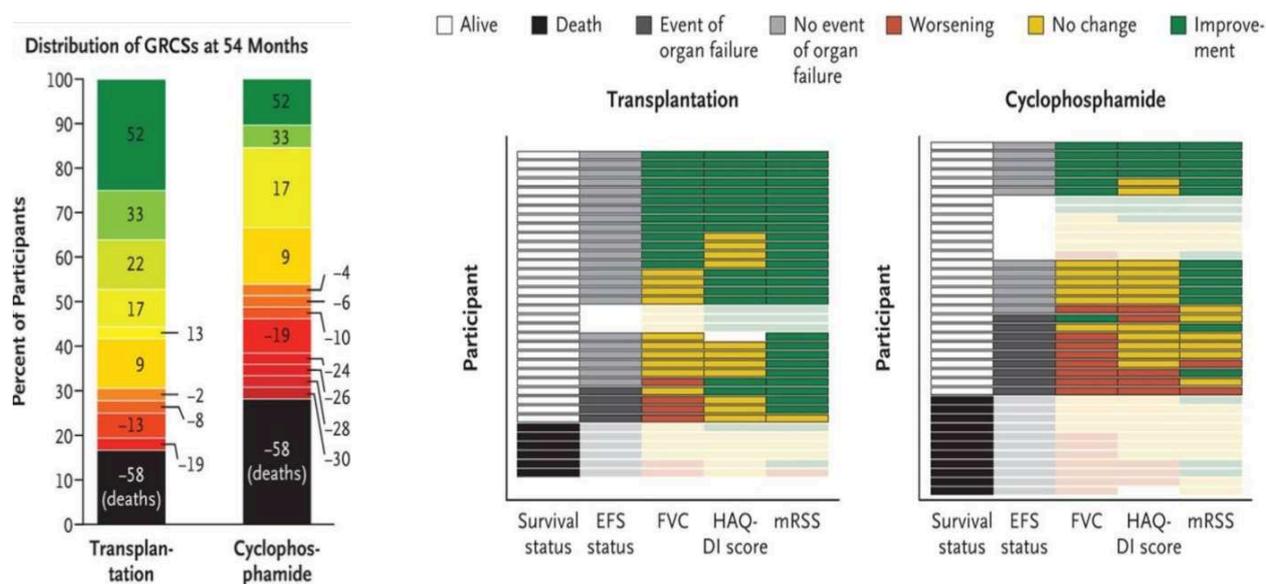
- **Essai SCOT**

Il s'agit d'un essai randomisé évaluant l'auto-CSH *versus* le CYC de phase II, ouvert et multicentrique (26 sites) sur 75 patients sclérodermiques atteints de formes diffuses avec atteinte pulmonaire et rénale. Cette étude comparait deux approches thérapeutiques :

- Une myéloablation majeure suivie d'une administration de cellules CD34+ triées autologues (n= 36)
- Une cure mensuelle de CYC haute dose (1 dose 500mg/m² puis 11 doses de 750 mg/m²) par voie intraveineuse (n=39).

Le critère principal était un score composite nommé GRCS pour *Global Rank Composite Score*, évalué à 54 mois post-randomisation, qui reflète la manière dont les participants se positionnent les uns par rapport aux autres en fonction de plusieurs paramètres tels que la survie sans évènement, la CVF, l'indice d'invalidité, le décès du participant et le mRSS. Notons toutefois que ce score ne mesure en aucun cas l'activité de la maladie ou sa sévérité.

Les résultats, publiés dans le journal *New England Journal of Medicine* en 2018 montrent une supériorité significative de la stratégie d'auto-CSH à 54 mois²³³ (Figure 13).



EFS: Event-free survival, FVC: forced vital capacity, HAQ-DI: Disability Index of Health Assessment Questionnaire

Figure 13 : Evaluation du *Global Rank Composite Score* à 54 mois (essai SCOT) d'après Sullivan *et al.*²³³

L'analyse des courbes de Kaplan-Meier révèle que les courbes de survie des deux groupes se séparent autour de 2 ans post-randomisation. Toutefois, le pourcentage de participants

présentant des effets indésirables sévères était plus faible dans le groupe CYC (51% *versus* 74% dans le groupe transplantation).

Les taux d'infection par personne par année (tout grade confondu) étaient similaires entre les deux groupes ; mais la survenue d'infections au minimum de grade 3 était plus importante dans le groupe transplantation. L'auteur de l'étude, Keith M. Sullivan, conclut ainsi que « *les résultats indiquent qu'avoir une autogreffe de cellules souches en cas de sclérodémie sévère pose plus de risques à court terme, mais offre des gains plus importants à long terme que le traitement par le CYC* ».

Les différences observées entre ces 3 essais peuvent, en partie, s'expliquer par la variabilité des critères d'inclusion. En effet, aucun des participants de l'essai SCOT ne souffrait d'atteinte cardiaque ou d'HTAP et la proportion de fumeurs était plus faible que dans l'essai ASTIS. Par ailleurs, seul l'essai SCOT incluait une irradiation corporelle totale dans le conditionnement (conditionnement myéloablatif), ce qui pourrait contribuer à une meilleure durabilité des rémissions comparée à celle observée dans l'essai ASTIS.

1.6.4.4. Enjeux actuels

- **Meilleur screening des patients**

L'auto-CSH appliquée aux maladies auto-immunes est un véritable challenge car il s'agit de combiner l'emploi d'une thérapeutique relativement ancienne à une indication innovante. Cette complexité est, en grande partie, résolue grâce au réseau Maladies Auto-immunes et Thérapie Cellulaire (MATHEC), à l'initiative de RCP bimensuelle réunissant des professionnels de l'autogreffe et de la ScS afin de prendre une décision collégiale quant aux patients éligibles à l'autogreffe. Contrairement aux patients autogreffés pour des hémopathies malignes chez qui la masse tumorale domine le pronostic, l'indication d'auto-CSH chez les patients atteints de ScS repose sur un faisceau d'arguments : absence de comorbidités, degré des atteintes viscérales, évolutivité de la maladie, lignes de traitement antérieures.

- **Optimisation du protocole thérapeutique**

À ce jour, la réduction de la morbi-mortalité associée au protocole d'autogreffe est un défi pour les professionnels de santé. Le risque de toxicité est principalement lié au traitement de conditionnement préalable à la réinjection des CSH. Malgré l'absence de consensus actuel sur les modalités du conditionnement, la majorité des régimes de conditionnement employés est semblable à celui de l'essai ASTIS (conditionnement non myéloablatif). Néanmoins des améliorations dans la tolérance du conditionnement sont en cours d'évaluation. Parmi elles, l'étude ASSIST IIb compare le régime de conditionnement réalisé dans ASSIST à un conditionnement d'intensité réduite (respectivement 200 mg/kg/jour de CYC contre 120 mg/kg/jour) pour tenter d'en réduire la toxicité.

Par ailleurs, l'intérêt d'une manipulation des cellules collectées *ex vivo*, par exemple avec un tri immunomagnétique des cellules CD34+, reste débattu. Cette approche représente une piste d'amélioration intéressante dans la procédure d'autogreffe car elle permet de purifier le produit en CSH et d'éliminer les potentielles cellules T auto-réactives présentes dans le greffon.

Cependant, en 2016, le groupe de travail sur les maladies auto-immunes de l'*European Society for Blood and Marrow Transplant Society* (EBMT) a publié une étude rétrospective comparant l'efficacité et la sécurité de l'auto-CSH avec et sans sélection de cellules CD34+ chez les patients sclérodermiques. La reconstitution hématopoïétique et immunitaire plus lente après administration d'un greffon purifié (cellules CD34+ triées) pourrait conduire à un risque infectieux accru. L'analyse multivariée des données n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre les deux groupes en termes de survie globale, d'incidence de rechute ou de progression de la maladie²³⁴. Enfin, de nouveaux scores ou paramètres évaluant la réponse, la progression et la rechute post-autogreffe nécessitent d'être validés afin de standardiser les résultats.

- **Immunomonitoring et biobanques**

Malgré des résultats satisfaisants de l'approche par auto-CSH dans les formes sévères de ScS, certains patients rechutent ou sont réfractaires à cette stratégie thérapeutique. C'est pourquoi, la mise en évidence de marqueurs biologiques ou génétiques prédictifs de la réponse serait nécessaire afin de mieux sélectionner les patients. Le *biobanking* d'échantillons de patients déjà greffés associé à la mise en place d'une évaluation clinico-biologique précise et globale permettrait de répondre à cette problématique.

Aussi, du fait de la complexité de la physiopathologie de la maladie, l'approche par auto-CSH dans la ScS demeure empirique et il est difficile d'identifier clairement les cibles cellulaires ou moléculaires de cette approche. Une collaboration multicentrique combinée à une analyse précise des données issues de registres partagés est indispensable pour évaluer l'efficacité des auto-CSH, améliorer les traitements et prévenir les complications.

Les autres approches de thérapie cellulaire, notamment celles dérivées du tissu adipeux, évaluées dans la prise en charge de la ScS, seront développées dans le second chapitre de la partie introductive.

2. Chapitre 2 : Approches thérapeutiques dérivées du tissu adipeux dans la sclérodermie systémique

La prise en charge thérapeutique de la ScS repose actuellement sur l'utilisation combinée de traitements immunosuppresseurs et symptomatiques. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de la ScS et très peu d'approches thérapeutiques sont significativement efficaces pour réduire les lésions de fibrose associées à la maladie. Par ailleurs, l'emploi de traitements au long cours expose les patients à une potentielle toxicité, impactant directement la morbi-mortalité de la maladie.

Dans ce contexte, le développement de thérapies innovantes issues de stratégies d'ingénierie cellulaire représente un enjeu majeur dans la prise en charge de la maladie. Nous proposons dans ce chapitre une revue des différentes stratégies évaluées dans la ScS et plus particulièrement, celles dérivées du Tissu Adipeux (TA), tissu riche en cellules progénitrices.

2.1. Les Cellules Souches/Stromales Mésoenchymateuses

2.1.1. Historique et définition des CSM

La découverte des Cellules Souches/stromales Mésoenchymateuses (CSM) date des années 1970 lorsque l'équipe de Friedenstein découvre une population cellulaire dans la Moelle Osseuse (MO). Ces cellules d'origine non hématopoïétique sont capables de former de l'os et de soutenir l'hématopoïèse dans des études de transplantations allogéniques de MO²³⁵. Ce pionnier fut également le premier à les isoler depuis la moelle, mettant en évidence des cellules d'aspect fibroblastique, adhérentes au plastique et, capables de former des colonies *in vitro* (Colony Forming Unit-Fibroblasts= CFU-F)^{235,236}. De plus, il montre au cours de ces études, qu'au-delà de leur capacité à se différencier en ostéocytes, elles peuvent également se différencier en chondrocytes et en adipocytes²³⁶ (Figure 14).

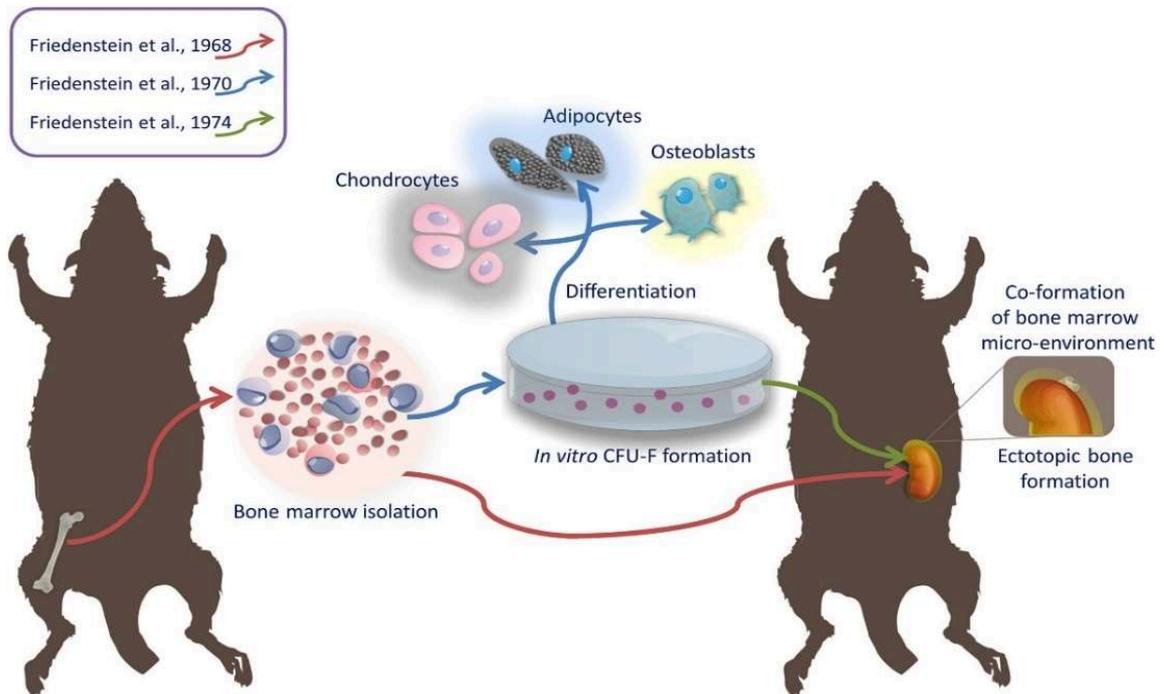


Figure 14: Travaux pionniers sur les CSM d'après Andrzejewska *et al.*²³⁷

Plus tard, Caplan leur donnera le nom de « cellules souches mésenchymateuses »²³⁸. Cette appellation reste très populaire aujourd'hui, bien que d'autres termes puissent être utilisés : « cellules stromales multipotentes », « cellules stromales de moelle », « cellules souches mésodermiques », « cellules stromales mésenchymateuses », etc...

Pour pallier cette nomenclature hétérogène, en 2007, l'*International Society for Cellular Therapy* (ISCT) définit les CSM comme des cellules multipotentes isolées à partir de nombreux tissus (MO, TA, placenta...) et qui répondent à ces trois critères²³⁹ (Figure 15) :

- Leur adhérence au plastique dans des conditions de culture standard ;
- Leur phénotype membranaire déterminé par cytométrie en flux : au moins 95% de cellules positives pour CD105, CD73 et CD90 et au moins 98% des cellules négatives pour les marqueurs CD45 ; CD34 ; CD14 ou CD11b ; CD79 α ou CD19 et HLA-DR ;
- Leur capacité à se différencier *in vitro* en cellules du tri-lignage mésodermique : ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes.

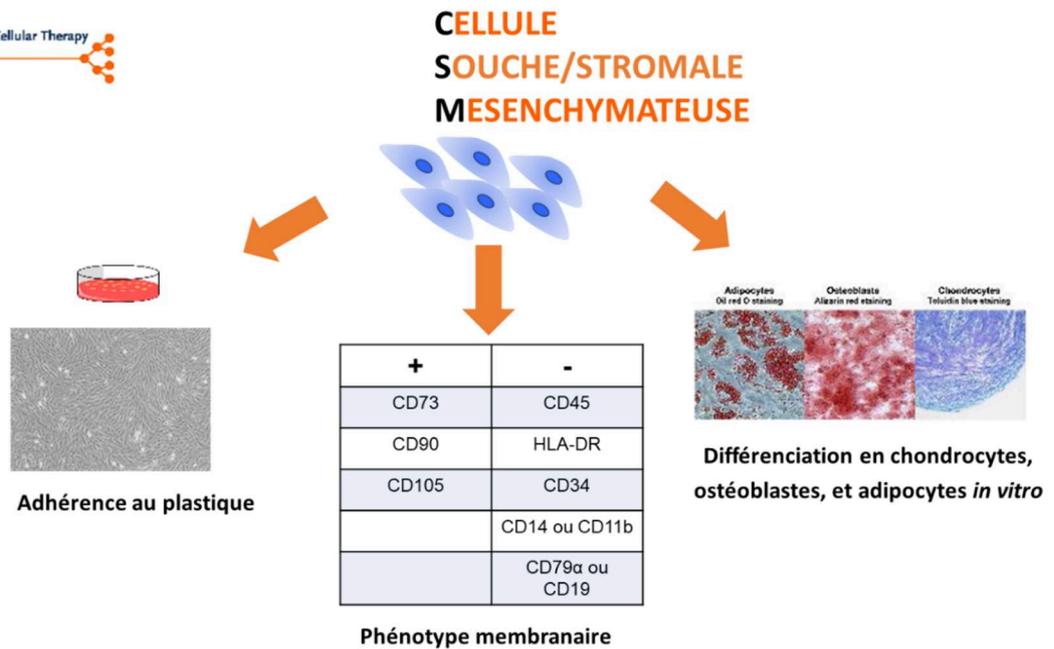


Figure 15 : Critères de définition des CSM d'après l'ISCT²³⁹

Néanmoins, les confusions autour des critères d'identité des CSM continuent d'alimenter les débats scientifiques puisqu'en 2019, l'ISCT propose une clarification de l'acronyme « CSM » et distingue les cellules souches des cellules stromales²⁴⁰.

Depuis leur découverte dans la MO, des réservoirs alternatifs de CSM ont été mis en évidence. Parmi eux, le TA, le placenta et le cordon ombilical représentent les sources les plus utilisées. Les CSM du TA ou en anglais *Adipose-derived Stromal/Stem Cells* (ASC) peuvent être isolées et expansées facilement depuis un prélèvement de TA par des techniques de liposuction, utilisées en routine en chirurgie plastique.

Malgré certaines différences fonctionnelles ou phénotypiques, l'établissement de critères de définition des CSM a permis une homogénéisation des pratiques et une comparaison plus aisée des études. L'engouement pour les CSM dans les études ou les essais cliniques se justifie par un accès relativement aisé chez l'homme (surtout pour celles isolées depuis le TA), un fort potentiel d'expansion *in vitro* garantissant l'obtention d'un nombre suffisant de cellules ainsi que par des propriétés multiples leur conférant un potentiel thérapeutique dans diverses pathologies²⁴¹.

Sur le plan réglementaire, les CSM expansées répondent au statut de Médicament de Thérapie Innovante (MTI ou en anglais *Advanced Therapy Medicinal Product*, ATMP). Le règlement européen CE 1394/2007 définit comme MTI, un produit qui répond à l'un de ces deux critères :

- La production nécessite une modification substantielle des cellules ou des tissus
- **Et/ou** les cellules ou tissus sont destinés à être administrés pour un usage non homologue.

Ce règlement autorise une exemption hospitalière qui permet aux structures telles que des hôpitaux d'accéder à l'innovation. Plus tard, la loi française n°2011-302 introduit nationalement le statut de « Médicament de Thérapie Innovante – Ponctuellement Préparé » (MTI-PP) qui autorise l'exemption hospitalière.

2.1.2. Propriétés des CSM

Les CSM, comme toute cellule souche, sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation cellulaire en plusieurs types cellulaires. Néanmoins, il est désormais admis, que l'efficacité des CSM repose sur le relargage de nombreuses molécules bioactives (cytokines, facteurs de croissance) ainsi que sur la production de vésicules extracellulaires riches en ARNm, miRNA et protéines²⁴²⁻²⁴⁵.

Ce chapitre présente de manière générale les propriétés des CSM les mieux documentées dans la littérature et les plus pertinentes dans la ScS. Cependant, notons que les propriétés biologiques associées aux CSM sont également fonction de la source de CSM considérée (moelle osseuse, tissu adipeux, dérivés du cordon ombilical etc...)²⁴⁶⁻²⁴⁹.

2.1.2.1. Renouvellement cellulaire et effet anti-apoptotique

Initialement, le potentiel régénératif des CSM a été attribué à leur capacité de migration et de différenciation en plusieurs types cellulaires d'origine mésodermique (chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes). Cependant, les résultats de nombreuses études animales conduites au cours de ces dernières années ont remis en question ce paradigme²⁴⁵. Aussi, d'autres études ont montré leur capacité à se différencier *in vitro* en lignées d'origine non mésodermiques telles qu'en cellules épithéliales, hépatiques ou encore gastro-intestinales²⁵⁰. Dans des conditions strictes et contrôlées de culture cellulaire, les CSM semblent donc capables de se différencier en une multitude de tissus matures, issus des trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme).

De façon intéressante, les CSM sont susceptibles de migrer sur un site particulier dans l'objectif de régénérer un tissu ou organe lésé. Ce processus, appelé migration ou en anglais *homing*, permet aux CSM de rejoindre le site inflammatoire/endommagé selon un gradient de chimiokines et facteurs de croissance (par exemple le PDGF, le TGF β ou le TNF α), sécrétés par les cellules endommagées ou les CSM elles-mêmes²⁵¹. Parfois, un mécanisme de fusion entre CSM et cellules cibles peut participer à la régénération tissulaire²⁵². Cependant la faible fréquence de différenciation *in vivo*²⁵³ et la courte durée de détectabilité des CSM après administration²⁵⁴ suggèrent fortement que cet effet ne représente qu'une partie mineure du potentiel thérapeutique des CSM.

Par ailleurs, les CSM et/ou leurs milieux conditionnés limitent l'apoptose de différents types cellulaires tels que les cardiomyocytes, les cellules musculaires ou encore les cellules épithéliales rénales²⁵⁵⁻²⁵⁷. Plusieurs facteurs semblent médier ce potentiel anti-apoptotique

comme le VEGF, le TGF β 1, l' *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), le FGF ou encore l' *Insulin-like Growth Factor-1* IGF-1^{257,258}. De façon intéressante pour la ScS, les CSM limitent également l'apoptose des cellules endothéliales²⁵⁸.

2.1.2.2. Effet pro-angiogénique

L'effet pro-angiogénique des CSM repose à la fois sur un puissant effet paracrine^{258,259} et sur une capacité de différenciation en cellules endothéliales²⁶⁰. En 2004, Planat-Bernard *et al.* mettent en évidence la capacité des ASC à se différencier en cellules endothéliales spontanément ainsi qu'à former des structures vasculaires dans un modèle de Matrigel® (matrice biologiquement active permettant la migration et l'invasion cellulaire)²⁶⁰. La combinaison d'un traitement par le VEGF et d'un *shear stress* (contraintes de cisaillement), mimant l'environnement vasculaire, favorise la différenciation en cellules endothéliales²⁶¹.

Cependant, le principal mécanisme par lequel les CSM exercent une action pro-angiogénique est d'ordre paracrine²⁴³. En effet, les CSM sécrètent un large panel de molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF, MCP-1, FGF-2 et HGF qui interviennent aux différentes étapes de l'angiogénèse : depuis le recrutement de cellules endothéliales sur les sites ischémiés jusqu'à la stabilisation des néovaisseaux. Le Tableau 4 ci-dessous liste les principaux facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les CSM ainsi que leur fonction au cours de la régénération vasculaire²⁴³.

Angiogenic factor	Full-name	Function
Angiogenin	Angiogenin	Cell migration, invasion, proliferation and tube formation
Ang-1	Angiopoietin-1	Vessel stabilization, EC survival, recruitment of pericytes
Ang-2	Angiopoietin-2	EC migration and sprouting
Cyr61	Cysteine-rich 61	Cell adhesion and EC migration
FGF-2	Fibroblast growth factor-2	EC proliferation, migration, remodeling of the extracellular matrix
HGF	Hepatocyte growth factor	EC and SMC proliferation, migration
IGF-1	Insulin-like-growth factor-1	EC proliferation, survival, induction VEGF and plasminogen activators
IL6	Interleukin-6	EC proliferation and migration
IL8	Interleukin-8	EC proliferation, survival, migration and tube formation
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1	EC migration
MIG	Monokine induced by interferon-gamma	Chemoattractant of T-cells, inhibition of angiogenesis
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1alpha	Proinflammation, chemoattractants of immune cells
MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein-1beta	Proinflammation, chemoattractants of immune cells
NAP-2 (CXCL7)	Neutrophil activating protein 2	Neutrophil recruitment, EC migration, release of VEGF and MMP
PLGF	Placental growth factor (PLGF)	Induction of vessel formation
TGF-beta	Tumor growth factor-beta	Tube formation, vessel stabilization, ECM synthesis
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1	Inhibitor of metalloproteinases
TIMP-2	Tissue inhibitor of metalloproteinase-2	Inhibitor of metalloproteinases
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Increase vessel permeability, ECM degradation, EC proliferation, migration, tube formation and survival

Tableau 4 : Facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les CSM d'après Bronckaers *et al.*²⁴³

La stimulation de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les CSM peut être amplifiée dans certaines conditions comme l'exposition des CSM au *Transforming Growth Factor α* (TGF α)²⁶² ou lors de cultures en hypoxie²⁶³. De même, l'exposition de CSM au LPS

(lipopolysaccharide), endotoxine sécrétée par les bactéries Gram négatif, favorise la sécrétion de VEGF, FGF-2, HGF, et IGF-1²⁶³. Ces résultats sont en faveur de la capacité des CSM à répondre positivement à différents stress ou stimuli.

Les CSM agissent à chaque étape de l'angiogenèse puisqu'elles favorisent l'activation et la migration des cellules endothéliales, la production de protéases nécessaires à la dégradation de la matrice environnante et également la stabilisation du vaisseau néoformé par le recrutement de cellules murales périvasculaires²⁴³. Concernant les étapes précoces de prolifération de cellules endothéliales, les effets observés varient en fonction de la source de CSM. En effet, le milieu conditionné d'ASC favorise la croissance des cellules endothéliales²⁵⁸ alors que les résultats sur les CSM de moelle osseuse (CSM-MO) sont plus contradictoires^{264,265}. De plus, Duffy *et al.* ont montré que les CSM-MO favorisent la persistance de structures vasculaires néoformés dans des co-cultures avec des cellules endothéliales, suggérant que les CSM-MO agissent sur la stabilisation et maturation des vaisseaux²⁶⁶. Ceci a été confirmé dans un modèle de vaisseau sanguin issu d'ingénierie tissulaire et supporte la capacité des CSM à agir comme des cellules péricytaire²⁶⁷.

Enfin, le rôle crucial des CSM dans la promotion de l'angiogenèse a été démontré dans plusieurs modèles animaux d'ischémie de la patte et cérébrale ou encore d'infarctus du myocarde avec des résultats très encourageants²⁶⁸⁻²⁷¹. Cependant le nombre réduit de modèles précliniques représentatifs de la vasculopathie sclérodermique limite l'évaluation du potentiel pro-angiogénique des CSM dans cette indication.

2.1.2.3. Effet antifibrotique

La mise en évidence du potentiel antifibrotique des CSM repose quasi-exclusivement sur des études *in vivo*. Ainsi, l'administration de CSM-MO permet une amélioration des lésions de fibrose sur différents organes : poumons²⁷², rein²⁷³ et peau²⁷⁴. De plus, les études testant l'efficacité des CSM-MO dans un modèle de fibrose cutanée (modèle induit à la bléomycine ou fibrose radio-induite) ont montré un bénéfice net de l'injection de CSM^{274,275}. En effet, les animaux traités présentaient une diminution de l'infiltrat leucocytaire inflammatoire, une augmentation du remodelage matriciel par les MMP et un nombre réduit de cellules α SMA positives. Chen *et al.* ont obtenu des résultats concordants dans un modèle murin induit à la bléomycine avec une diminution de l'épaisseur de la peau après administration d'ASC²⁷⁶. De même, l'effet antifibrotique des ASC a été confirmé dans deux modèles précliniques de ScS (modèle induit à la bléomycine et modèle de maladie du greffon contre l'hôte sclérodermique)²⁷⁷. Ces études montrent que des injections d'ASC par voie intraveineuse permettent de réduire les infiltrats inflammatoires (riches en LyT CD4+, CD8+ et en macrophages) ainsi que les marqueurs de fibrose tels que le collagène.

Maria *et al.* rapportent également l'efficacité de CSM de MO et de TA dans un modèle préclinique de ScS induit à l'acide hypochloreux (HOCl)^{278,279}. Dans ces travaux, l'analyse histologique montre que les administrations de CSM dérivées du TA réduisent les lésions de

fibrose. De plus, la peau et les poumons des souris traitées par les CSM présentent des niveaux réduits de marqueurs inflammatoires (TNF α et IL-1 β) ainsi qu'un remodelage matriciel accru. Les auteurs montrent une disparition des CSM sept jours après l'injection alors que le pic d'action était à 3 semaines post-traitement, suggérant que l'efficacité des CSM ne repose pas uniquement sur des mécanismes de migration et différenciation cellulaire. Au total, les CSM semblent pouvoir agir à chaque étape du développement de la fibrose²⁸⁰ : elles limitent l'inflammation précoce induite par l'HOCl puis réduisent les dépôts de MEC lors de l'établissement de la fibrose et enfin favorisent le remodelage matriciel par les MMP lors de la résolution des lésions. Ces résultats confortent la plasticité des CSM et leur capacité à répondre positivement à différents stimuli pathogènes.

D'autres produits dérivés des ASC sont en cours d'évaluation dans la prise en charge de la fibrose associée à la ScS. Parmi eux, les vésicules extracellulaires représentent une stratégie attractive. Les vésicules extracellulaires agissent comme des médiateurs inter-cellulaires et renferment des molécules bioactives issues de la cellule dont elles sont issues.

Dans un modèle *in vitro* de myofibroblastes induits au TGF β , les auteurs rapportent une efficacité supérieure de la stimulation par des vésicules extracellulaires issues d'ASC saines comparativement aux co-cultures avec ASC. Ceci était objectivé par une réduction significative des marqueurs de fibrose ainsi qu'une activation accrue du remodelage de la MEC²⁸¹. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont mis en évidence un effet bénéfique des exosomes (vésicules extracellulaires de plus petite taille) dérivés de CSM de MO ou de sang de cordon dans un modèle *in vitro* de myofibroblastes TGF β -induits^{282,283}. De même, l'évaluation dans un modèle préclinique de ScS conforte la capacité des vésicules extracellulaires de CSM-MO murines et d'ASC humaines à freiner la progression de la fibrose cutanée et pulmonaire²⁸⁴. De plus, l'exposition préalable des CSM à l'interféron γ (IFN γ) améliorerait le potentiel antifibrotique des vésicules extracellulaires, particulièrement sur la fibrose pulmonaire²⁸⁵.

2.1.2.4. Effet immunomodulateur et anti-inflammatoire

La découverte du potentiel immunomodulateur des CSM date des travaux sur l'administration de CSM chez les patients atteints de GvHD. En effet, Leblanc *et al.* ont montré une augmentation significative de la survie globale et une réduction de la mortalité liée à la greffe après administration de CSM haplo-identiques chez les patients atteints de GvHD sévères cortico-résistantes²⁸⁶. Ce sont les tests *in vitro* nommés *Mixed Lymphocyte Reaction* (MLR), qui ont confirmé l'effet immunomodulateur des CSM avec la mise en évidence d'un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules immunitaires activées dans des modèles de co-cultures avec les CSM²⁸⁷.

L'action des CSM sur le système immunitaire est double, reposant à la fois sur une interaction directe avec les cellules immunitaires ainsi que sur un effet paracrine des CSM. Les CSM interagissent avec tous les acteurs du système immunitaire inné (cellules NK,

macrophages, cellules dendritiques) et adaptatif (LyT et LyB), aboutissant à une modulation globale de l'immunité²⁸⁸ (Figure 16).

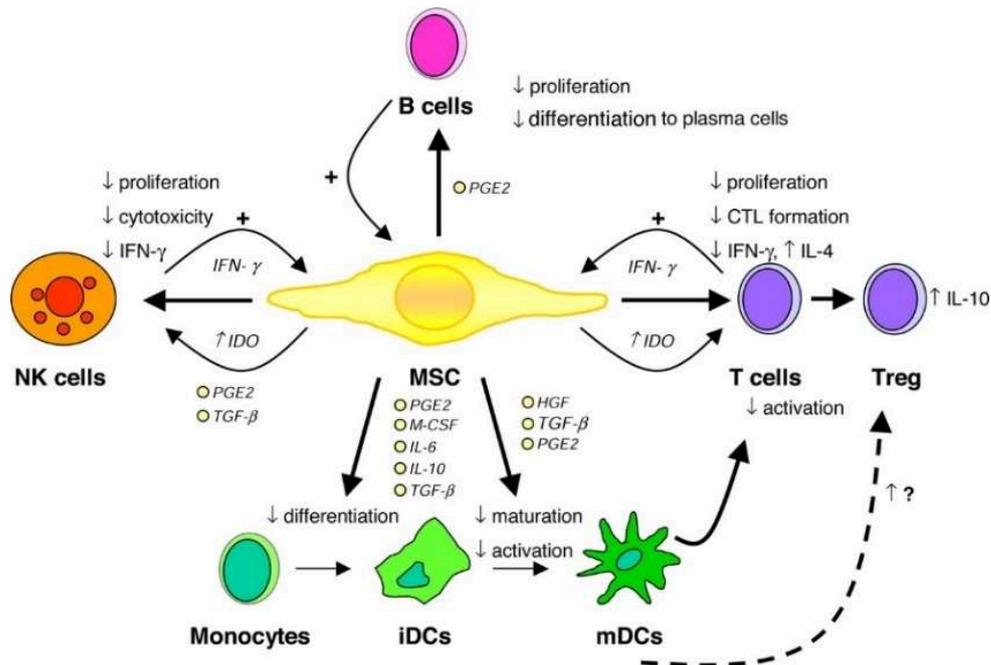


Figure 16 : Fonctions immunomodulatrices des CSM d'après Nauta et Fibbe²⁸⁸.

D'abord, les CSM freinent l'activation, la maturation et la différenciation des cellules dendritiques. Les CSM limitent également leur capacité à présenter des antigènes par diminution de l'expression du CMH de classe II à leur surface²⁸⁹⁻²⁹¹. De plus, les CSM entraînent une anergie des LyB, LyT et des LyNK par la sécrétion de plusieurs molécules telles que la prostaglandine E2 (PGE2), l'Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO), l'IFN γ ^{288,292}. L'IDO est une enzyme responsable de l'accumulation de produits toxiques ; créant un effet cytotoxique sur les différentes populations lymphocytaires²⁹³⁻²⁹⁵.

Par ailleurs, les CSM modifient les profils de sécrétion des cytokines par les cellules immunes afin d'induire un profil anti-inflammatoire et plus immunotolérant²⁹⁶. Ainsi, les CSM inhibent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF α , l'IFN γ par les LyT et induisent la sécrétion de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-10. Aussi, elles induisent l'apoptose des cellules T inflammatoires par des mécanismes contact-dépendant à travers l'activation de la voie Fas-Fas Ligand²⁹⁷. Les LyT apoptotiques induisent alors le recrutement de LyT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ *forkhead box P3* (FoxP3) ⁺.

L'action des CSM sur les LyNK repose sur une inhibition de l'activation et de la prolifération cellulaire à l'origine d'une réduction de la cytotoxicité NK-dépendante²⁹⁴. De plus, elle bloque la prolifération des LyB, leur différenciation en plasmocytes et, à terme, la production d'anticorps²⁹⁰. Ceci est conforté par des études *in vivo* où l'administration de CSM réduisait la quantité d'auto-Ac anti-Scl70 dans un modèle de ScS induit à l'HOC^{278,279}. Di Nicola *et al.* ont également confirmé le capacité des CSM à inhiber la prolifération des LyT dans un modèle de

co-culture indirecte avec insert entre CSM et LyT²⁹⁸. Des expériences utilisant des anticorps monoclonaux neutralisants ont permis d'identifier le TGFβ et l'HGF comme principaux médiateurs de cet effet. Ces résultats confortent l'hypothèse que l'effet immunomodulateur des CSM repose majoritairement sur des mécanismes paracrines^{288,299}. De même, la capacité des CSM à recruter les LyTreg est médiée par plusieurs molécules comme HLA-G5 soluble³⁰⁰, l'IL-10 et l'antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1 (IL-1RA) conduisant à une modulation de la balance Th17/Treg³⁰¹.

Il est admis que les CSM n'exercent pas intrinsèquement un potentiel immunorégulateur mais qu'elles nécessitent une étape « d'éducation », également appelé *licensing* ou *priming* pour exercer cet effet. En effet, la capacité de régulation des réactions immunitaires par les CSM est potentialisée par l'exposition à différentes cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNγ, le TNFα ou l'IL-1α ou β^{302,303}. Ceci est documenté par une modification du phénotype des CSM, après exposition à l'IFNγ³⁰⁴ (Tableau 5).

FACS phenotype	Resting	IFNγ activated
CD40	–	++
CD80	–	–
CD86	–	–
HLA-ABC	++	++++
HLA-DR	–	+++
CD274 (PD-L1)	+	++++
CD54 (ICAM-1)	+	++++

Tableau 5: Phénotype des CSM quiescentes et des CSM après activation par l'IFNγ d'après Galipeau *et al.*³⁰⁴

Ce *licensing* cellulaire récapitule le micro-environnement inflammatoire et immunitaire dans lequel les CSM vont être intégrées lors du traitement de pathologies où les systèmes immunitaires et inflammatoires sont suractivés telles que la GvHD et les pathologies auto-immunes comme la ScS. Certains auteurs évoquent même une polarisation possible des CSM avec deux profils de CSM différents (sur le principe de celui décrit pour les macrophages) à savoir un phénotype « CSM 1 » pro-inflammatoire et un phénotype « CSM 2 » plutôt immunomodulateur³⁰⁵. Les CSM adopteraient un profil « CSM 2 » en réponse à un environnement riche en molécules inflammatoires telles que l'IFNγ et le TNFα. Cette polarisation des CSM conduirait à des profils de sécrétion cytokinique distincts.

Des études récentes ont démontré le rôle majeur des vésicules extracellulaires dans l'effet anti-inflammatoire du sécrétome de CSM. Ces dernières sont de véritables vecteurs de communication inter-cellulaire. Elles agissent par interaction puis fusion avec la membranaire libérant son contenu (ARN, miRNA et des protéines) dans la cellule cible. Ainsi, les vésicules

extracellulaires issues de CSM exercent un effet inhibiteur sur la différenciation et la prolifération des LyT et stimulent la sécrétion d'IL-10 ainsi que le recrutement de LyTreg²⁴². La comparaison du potentiel immunomodulateur des CSM-MO et de leurs vésicules extracellulaires dans des modèles précliniques d'arthrose et d'arthrite suggèrent une supériorité d'effet des vésicules extracellulaires, notamment celles extraites de CSM pré-stimulées par l'IFN γ ³⁰⁶.

D'autres mécanismes ont récemment été associés aux propriétés immunosuppressives des CSM. Parmi eux, le transfert mitochondrial des CSM augmente la capacité phagocytaire des macrophages potentialisant la clairance bactérienne dans le sepsis³⁰⁷. Les CSM favorisent également l'efferocytose : processus physiologique caractérisé par la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages à travers la sécrétion de la PGE2 et de IL-10³⁰⁸. Enfin, l'immunogénicité de CSM est très réduite (faible expression des molécules de HLA type I et l'absence de HLA de type II sur les CSM quiescentes³⁰⁹), permettant ainsi d'envisager le développement d'approches allogéniques.

La découverte des propriétés immunomodulatrices des CSM a permis de faire passer progressivement la thérapie cellulaire fondée sur les CSM du domaine de la médecine régénérative à celui de l'auto-immunité. Dans ce contexte, l'ISCT a publié en 2016 des lignes directrices qui dictent la caractérisation des propriétés immunomodulatrices des CSM³⁰⁴.

2.1.3. Potentiel thérapeutique des CSM dans la ScS

L'identification de nouvelles cibles pathogéniques au cours de la ScS a conduit au développement de nouvelles approches de thérapie cellulaire. Grâce à leur potentiel à la fois immunomodulateur, trophique et pro-angiogénique, les CSM peuvent être employées à visée régénérative mais également dans des approches d'immunomodulation. Ainsi, les CSM représentent un candidat de choix dans la prise en charge de la ScS (Figure 17).

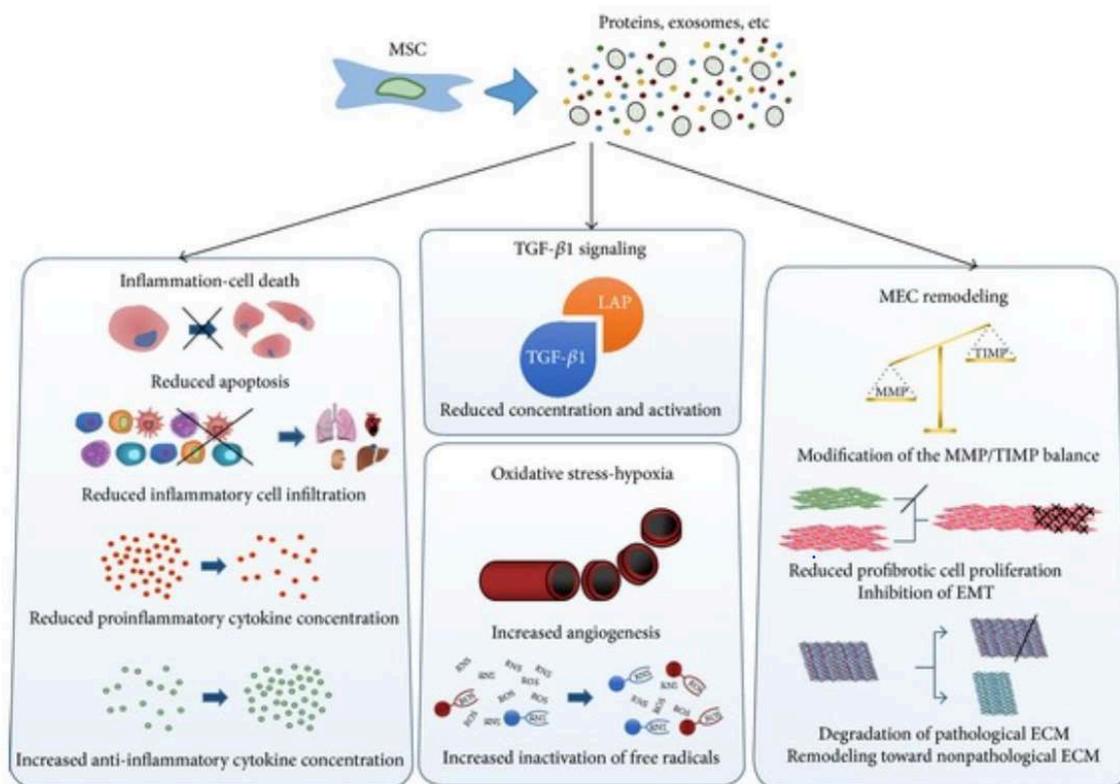


Figure 17 : Propriétés des CSM sous-tendant le rationnel thérapeutique dans la ScS d'après Usunier *et al.*³¹⁰

2.1.3.1. Administration intraveineuse de CSM

Ce chapitre présente les différentes études qui rapportent l'administration intraveineuse de CSM chez des patients sclérodermiques, quelque soit la source de CSM utilisée. A ce jour, aucune administration parentérale de CSM dérivées du TA n'a été rapportée dans la prise en charge de la ScS. L'utilisation en clinique des CSM par voie intraveineuse dans la ScS a été initialement décrite dans deux rapports de cas et une série de cas³¹¹⁻³¹³ pour un total de 7 patients (6 greffes allogéniques et 1 autologue). Les patients souffraient d'une nécrose

cutanée étendue et/ou d'une fibrose pulmonaire et cardiaque. Les trois rapports ont noté une cicatrisation importante des ulcères et des zones nécrotiques de la peau après l'administration intraveineuse de CSM. La diminution du mRSS a également été rapportée et les résultats de l'angiographie ont indiqué une néovascularisation. Ces résultats encourageants ont abouti à la mise en place de deux essais de plus grande échelle évaluant l'injection systémique de CSM allogéniques par voie intraveineuse dans la ScS.

Un premier essai, réalisé en Chine, a inclus 14 patients atteints de formes diffuses de ScS³¹⁴. Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'efficacité et la sécurité de l'approche combinée de plasmaphérèses et d'injections de CSM. Le protocole consistait en la réalisation de 3 plasmaphérèses à J1, J3 et J5 suivies d'une injection de CYC. Puis, les patients recevaient à J8 une injection unique de 1×10^6 CSM allogéniques/kg de poids du receveur. Il s'agissait de CSM expansées à partir de cordon ombilical. Le rationnel des plasmaphérèses dans la ScS repose sur les résultats de quelques études qui ont montré une amélioration du mRSS et une diminution des marqueurs inflammatoires chez les patients sclérodermiques^{315,316}. Les résultats de cette approche combinée ont révélé une amélioration significative du mRSS (diminution moyenne du score de 6.2 points) ainsi qu'une réduction de marqueurs sériques de la maladie : TGF β , auto-Ac anti-Scl70³¹⁴. De façon intéressante, le VEGF sérique était également diminué significativement à 1, 3 et 6 mois post-traitement chez ces patients témoignant d'une modulation des processus angiogéniques.

Le second essai évaluant l'administration systémique de CSM allogéniques chez les patients sclérodermiques est un essai français. Le principal objectif de cette étude non randomisée monocentrique réalisée à l'hôpital Saint Louis à Paris était d'évaluer la tolérance de l'administration intraveineuse de CSM allogéniques issues de MO dans le traitement des formes sévères de ScS (formes rapidement évolutives ou réfractaires au CYC contre-indiquées à une auto-CSH). Les résultats, publiés en 2022 dans le journal *The Lancet Rheumatology*, fournissent les premières preuves de l'innocuité et de la faisabilité de l'administration de CSM allogéniques de MO puisqu'aucun effet indésirable grave n'a été signalé au cours de la période d'observation³¹⁷. Des données préliminaires encourageantes d'efficacité ont été observées, avec notamment un effet précoce sur la régression de la sclérose cutanée, susceptible de se maintenir au moins un an après l'injection.

L'analyse rétrospective de la sécurité des injections intraveineuses de CSM allogéniques dans les maladies auto-immunes réalisée sur plus de 400 patients montre une excellente tolérance de cette approche³¹⁸. En effet, seulement 15,8% des patients ont présenté des effets indésirables dans les 30 jours suivant l'injection, dont les plus fréquents étaient de la fièvre, des insomnies, des palpitations et des céphalées. Le taux global de survenue d'infection s'élevait à 29,5% dont 13% d'infections sévères et le risque de développement d'un cancer était de 1,2%. Enfin, les données issues des registres de l'EBMT ont montré une mortalité induite par le traitement de l'ordre de 8,7% pour l'approche par auto-CSH³¹⁹ versus 0,2% pour les injections intraveineuses de CSM allogéniques³¹⁸.

2.1.3.2. Administration locale de CSM

En 2013, une première étude a évalué l'effet de l'administration de CSM issues du TA chez six patients présentant une forme de sclérodémie localisée (morphée en plaque, morphée généralisée, sclérodémie linéaire, sclérodémie « en coup de sabre »), non évolutive depuis 6 mois³²⁰. Après trois semaines d'expansion en culture cellulaire *in vitro*, l'injection des CSM autologues re-suspendues dans une solution d'acide hyaluronique était réalisée au niveau des zones les plus accessibles selon la demande du patient. Les zones traitées étaient le visage, les membres et les pieds. Les patients étaient suivis sur une durée de 1 an et la tolérance fut excellente. Les patients ont tous jugé « satisfaisant » le résultat obtenu. Les auteurs ont noté l'arrêt de la progression locale de la maladie dans 100% des cas, une amélioration de la souplesse de la peau (83% des patients), une régression de la dyschromie (67% des patients) et la réduction de l'érythème (17% des patients).

Une autre étude italienne a évalué l'administration locale d'ASC dans la prise en charge du handicap du visage chez 10 patients présentant des atteintes péri-orales³²¹. Cet essai comparait l'efficacité d'injections locales d'ASC à celles de TA purifié. Les deux procédures ont amélioré de façon significative le *Mouth Handicap in Systemic Sclerosis Scale* (MHSS), la capacité d'ouverture maximale de la bouche à 1 an post-intervention sans qu'aucune des deux techniques ne montre une efficacité supérieure comparée à l'autre.

De plus, un essai de phase II multicentrique contrôlé compare l'efficacité et la sécurité à 16 semaines des injections digitales d'ASC versus placebo pour la cicatrisation des UD réfractaires ischémiques actifs chez des patients atteints de ScS (essai ADUSE). Les résultats de cet essai ne sont pas disponibles à ce jour.

Enfin, les CSM issues de la MO sont aussi à l'étude dans des applications locales chez des patients sclérodémiques. Un essai contrôlé, randomisé contre placebo, en double aveugle évaluant l'injection intramusculaire de CSM de MO dans les UD est en cours chez 20 patients sclérodémiques³²². La quantité totale de CSM injectée est de $50 \cdot 10^6$, divisée en 8 sites d'injection au niveau de la paume, du dos de la main et de l'avant-bras. Le critère principal de cet essai dont l'acronyme est MANUS (*Mesenchymal stromal cells for Angiogenesis and Neovascularization in digital Ulcers of Systemic Sclerosis*) est la toxicité à 12 semaines post-injection et les critères secondaires sont le délai de cicatrisation des UD, le handicap de la main, la qualité de vie et l'activité de la maladie.

2.1.4. Hétérogénéité, challenges et perspectives autour des CSM

De par leurs multiples propriétés biologiques, les CSM font l'objet d'un nombre exponentiel d'études précliniques et cliniques. En effet, le nombre d'études sur les CSM recensées en 2020 sur *Clinicaltrial.gov* était d'environ 1200³²³. Cependant, un nombre extrêmement limité de médicaments contenant des CSM est à ce jour disponible sur le marché.

En 2012, Prochymal® (Osiris Therapeutics), un médicament composé de CSM allogéniques de MO adultes a été autorisé au Canada dans le traitement de la GvHD aigüe. De même, Temcell® (JCR Pharmaceutica), composé d'un *pool* de CSM de MO de plusieurs donneurs, indiqué également dans la GvHD est autorisé et remboursé au Japon. En Europe, Obnitix® (Medac) constitué d'un ensemble de CSM de MO allogéniques, a reçu en 2018 la désignation de « médicament orphelin » pour la GvHD. Aussi, l'EMA a approuvé Alofisel® (Takeda) en 2018, le premier MTI contenant des ASC allogéniques dans la prise en charge des fistules de la maladie de Crohn (EMA/H/C/004258). Enfin, en Corée deux MTI composés de CSM sont autorisés : (i) Cartistem® (Medipost), concentré de CSM expansées depuis le sang de cordon et autorisé dans l'arthrose dégénérative et (ii) Cupistem® (Anterogen), des ASC autologues dans le traitement des fistules de la maladie de Crohn.

Ce chapitre ne tend pas à être exhaustif mais à soulever quelques perspectives ou challenges à dépasser pour accélérer le développement d'approches thérapeutiques innovantes reposant sur l'utilisation des CSM.

2.1.4.1. Fabrication et cryopréservation des CSM à usage thérapeutique

D'abord, les conditions de culture et d'amplification des CSM *ex vivo* sont très hétérogènes entre les équipes et conduisent à des populations cellulaires parfois peu comparables sur les plans phénotypiques ou fonctionnels³²⁴. Le nombre de passages, les densités d'ensemencement, la composition des milieux sont autant de variables susceptibles d'impacter les propriétés des cellules.

Dans l'objectif de s'affranchir des délais associés aux étapes d'expansion cellulaire, une étude s'est intéressée à la caractérisation de CSM faiblement amplifiées (2 heures de culture) comparativement à des cultures de 9 jours. Les deux types de cellules amélioraient les lésions pulmonaires inflammatoires et fibrotiques progressives. De façon intéressante, les CSM issues des courtes durées de culture présentaient des niveaux plus élevés de marqueurs de cellules souches ainsi qu'une expression réduite de procollagène de type I, d' α SMA et de TGF β ³²⁵.

A ce jour, il n'existe aucune standardisation dans les conditions d'isolement et d'expansion des CSM.

Par ailleurs, plusieurs sources de CSM humaines adultes sont disponibles. Bien que la MO soit la source historiquement étudiée, le TA représente aujourd'hui le réservoir de CSM le plus accessible chez l'Homme. Cependant, des différences phénotypiques et parfois fonctionnelles ont été décrites dans la littérature. Ainsi, le choix de la source de cellules est un élément important à considérer dans le développement d'une thérapie cellulaire.

La possible altération du potentiel thérapeutique des CSM après cryoconservation est un autre défi important dans le développement de CSM en clinique. La préparation de la plupart des approches thérapeutiques à base de CSM implique des étapes d'expansion des cellules *ex vivo*, leur stockage cryogénique jusqu'à ce qu'elles soient administrées au patient. Cependant l'impact de la cryopréservation sur les propriétés des cellules doit être plus amplement étudié lors du développement de thérapies cellulaires. Par exemple, François M *et al.* rapportent une altération des propriétés immunomodulatrices des cellules décongelées/lavées *versus* des CSM fraîches³²⁶. Cependant, une revue systématique publiée en 2022 conclue à l'absence d'effet toxique significatif de la cryopréservation des CSM sur le potentiel thérapeutique des CSM dans de nombreux modèles précliniques³²⁷.

Les conditions d'administration sont un autre élément critique dans le développement de thérapies cellulaires puisqu'il faut déterminer la voie d'administration, la dose et/ou la récurrence des administrations qui conduiront au bénéfice le plus élevé chez le patient.

Si les propriétés des CSM et leurs conditions de fabrication sont des paramètres extrêmement critiques pour l'efficacité des thérapies, les facteurs liés à l'hôte sont également importants. Il a été démontré que les variations de la réponse cytotoxique de l'hôte, l'état d'inflammation et le micro-environnement recevant les cellules sont autant de facteurs susceptibles d'impacter l'efficacité des approches par CSM³²⁸.

2.1.4.2. Potency assay, marqueurs prédictifs d'efficacité et approches autologues

Un débat subsiste aujourd'hui sur la pertinence d'approches de thérapies cellulaires autologues reposant sur les CSM, notamment dans les contextes de maladies immunitaires et/ou inflammatoires³²⁹. En effet, le contexte autologue pathologique peut impacter négativement les propriétés de régénération des cellules et modifier le profil de sécrétion. [L'impact de la ScS sur les CSM est discuté à la fin de la partie introductive de travail (cf. partie 2.4.)]. Cependant, les CSM sont des cellules extrêmement plastiques, capables d'être « éduquées » en réponse à différents stimuli avec la mise en place de réponses compensatoires à certains mécanismes physiopathologiques.

Pour répondre à cette problématique, le développement de tests appelés en anglais *potency assay* est indispensable. Il s'agit de tests fonctionnels capables de quantifier une ou des propriété(s) biologique(s) associée(s) à l'efficacité thérapeutique d'un médicament. Idéalement, un *potency assay* doit également pouvoir prédire les patients qui seront bons

répondeurs à la thérapie. Ils permettraient d'améliorer les stratégies thérapeutiques basées sur les CSM mais également de mieux identifier les patients qui seront répondeurs.

Par exemple, l'étude récente évaluant la tolérance et l'efficacité de l'administration intraveineuse de CSM-MO allogéniques suggère qu'un schéma de trois facteurs corégulés (faible activité de l'IDO, la production de MCP-1 et l'expression de HLA-DR) était associé à une moins bonne réponse clinique³¹⁷. De même, les patients non répondeurs présentaient des niveaux plus élevés de TGFβ circulant. De nombreuses études visent à mettre au point des tests d'activité *in vitro*, capables de corrélérer avec précision les propriétés biologiques des CSM avec leur efficacité thérapeutique³³⁰⁻³³². Actuellement, le *potency assay* le plus largement utilisé est basé sur l'inhibition *in vitro* de la prolifération des cellules T par les CSM^{333,334}.

Le développement de *potency assay* évaluant les approches dérivées du TA chez les patients sclérodermiques est complexe puisque plusieurs paramètres sont à considérer. Idéalement, les tests fonctionnels développés devront permettre d'évaluer les trois propriétés attendues : le potentiel de régénération vasculaire, l'effet antifibrotique et la capacité immunomodulatrice. Néanmoins, une importance relative à chacune de ses propriétés devra être accordée selon la symptomatologie du patient, la voie d'administration utilisée et l'effet recherché. Par exemple, dans une approche de thérapie cellulaire à visée locale, les effets positifs sur la vascularisation et la fibrose seront particulièrement évalués alors que dans les approches par voie parentérale, le potentiel immunomodulateur sera déterminant. Enfin, la forte hétérogénéité inter-patients au cours de la ScS incite fortement à développer des tests de *screening* pour identifier les patients les plus aptes à recevoir ces stratégies innovantes.

2.1.4.3. Modifications des propriétés biologiques des CSM

Des stratégies sont également en cours d'évaluation pour générer des CSM « potentialisées », en quantité suffisante, pour des essais cliniques de grande envergure. Dans ce cadre, plusieurs stratégies de *priming/licensing* ou d'autres approches plus complexes d'ingénierie cellulaire ont été utilisées pour optimiser les propriétés biologiques des CSM.

Par exemple, l'exposition des CSM à certaines molécules (oncostatine M, N-acetylcysteine) augmente le potentiel trophique ou immunomodulateur. Les mécanismes sous-tendant cette modulation sont d'ordre paracrines^{335,336}. De même, la modification des conditions de culture telles que des cultures en hypoxie conduit à l'activation des CSM dont les vésicules extracellulaires présentent un potentiel angiogénique dose-dépendante³³⁷.

Aussi, des approches plus complexes telles que la modification du génome par la technologie CRISPR-Cas9, le développement d'objets en 3 dimensions ou encore l'encapsulation des CSM permettent une modulation significative des propriétés biologiques des cellules et ouvrent ainsi la voie à de nouvelles indications^{338,339}.

La Figure 18 présente les différentes sources de variabilité qui accompagnent le développement clinique de CSM.

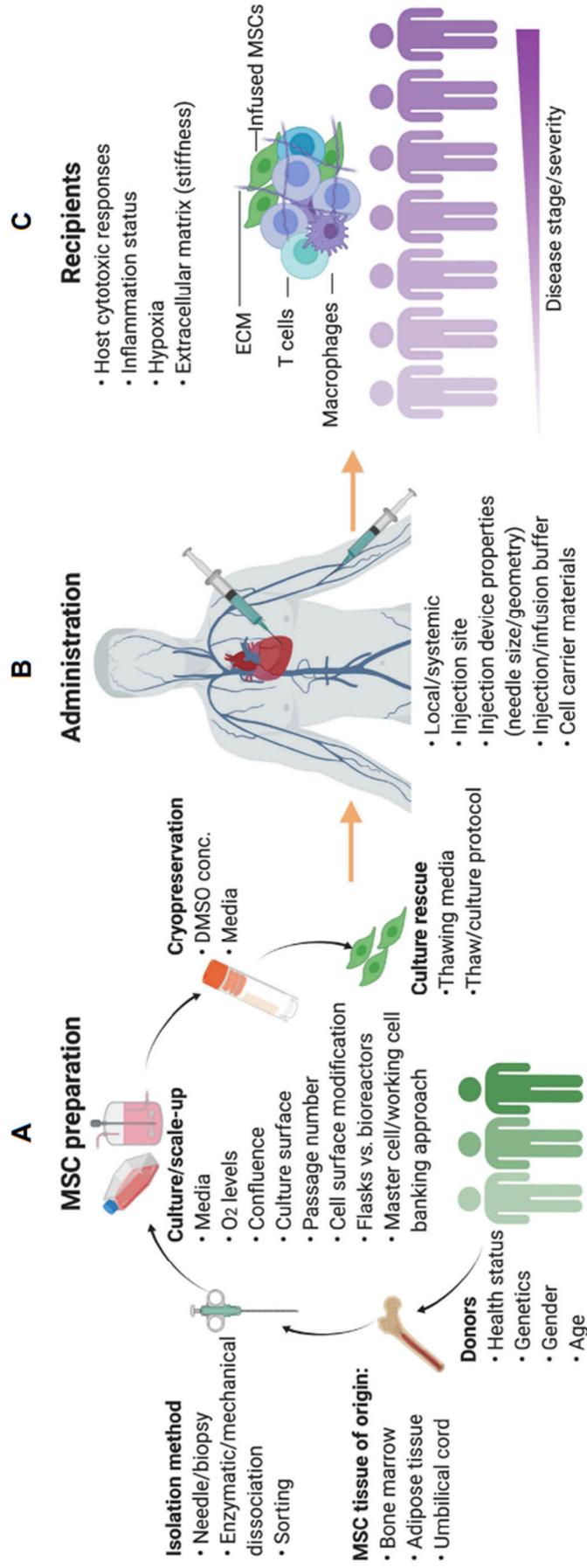


Figure 18 : Challenges associés au développement de médicaments de thérapie innovante composés de CSM d'après Levy *et al.*³⁴⁶

2.2. Le Tissu Adipeux

Le Tissu Adipeux (TA) est un tissu conjonctif lâche. Il a été historiquement étudié pour ses fonctions d'isolant thermique, de protection contre des chocs mécaniques et surtout pour son rôle dans la gestion des réserves énergétiques lipidiques³⁴⁰. Le TA est un tissu différencié sur le plan morphologique, physiologique, capable d'une grande plasticité. L'hétérogénéité structurale et fonctionnelle du TA permet d'en différencier deux types : le TA blanc et le TA brun dont les rôles métaboliques sont distincts et complémentaires (Figure 19).

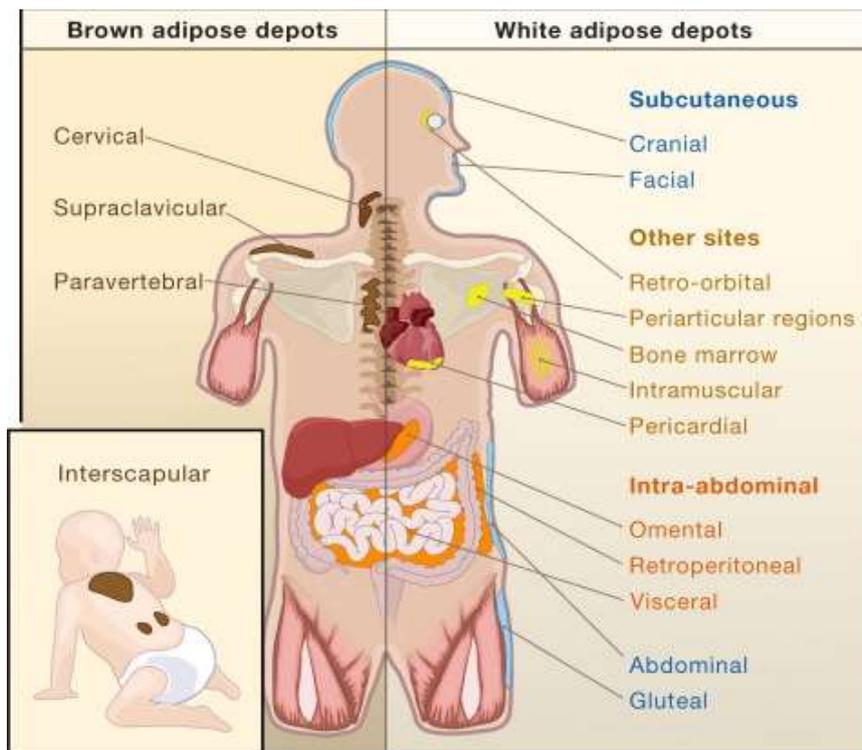


Figure 19: Répartition des principaux dépôts de tissu adipeux d'après Gesta *et al.*³⁴¹

2.2.1. Le tissu adipeux brun et la thermogénèse adaptative

Le TA brun doit sa couleur à une irrigation plus dense ainsi qu'au grand nombre de mitochondries contenues dans les adipocytes bruns. Il est particulièrement impliqué dans la thermogénèse adaptative puisque les adipocytes bruns produisent de la chaleur en réponse à une exposition au froid. Les parois internes des mitochondries présentent une concentration élevée en *Uncoupling Protein 1* (UCP-1), protéine centrale dans la régulation de la température corporelle. Son fonctionnement est similaire à un canal à protons et permet d'assurer une fonction oxydative, empêchant ainsi la production d'Adénosine Triphosphate (ATP) par l'ATPase. L'énergie résiduelle est alors libérée sous forme de chaleur³⁴².

Les humains, comme les rongeurs, possèdent des dépôts de TA brun ; notamment chez les fœtus et les nouveaux-nés dans les régions axillaires, cervicales, périrénales et surrénaliennes³⁴². Contrairement aux rongeurs chez lesquels le TA brun persiste toute la vie, il semble s'atrophier au fil des années chez l'Homme jusqu'à devenir négligeable à l'âge adulte³⁴³.

2.2.2. Le tissu adipeux blanc

Le TA représente en moyenne 15 à 20% de la masse corporelle chez l'homme et 20 à 25% chez la femme en bonne santé (Indice de Masse Corporelle (IMC) < 25 unités) et peut constituer près de 50% d'un individu souffrant d'obésité morbide. Longtemps considéré comme un simple tissu de stockage des lipides, le TA secrète de multiples hormones et autres protéines (adipokines) indispensables à l'équilibre énergétique, lui conférant des fonctions additionnelles.

2.2.2.1. Fonctions

- **Tissu adipeux de structure**

Le TA blanc de structure offre un support adaptatif au corps contre diverses contraintes mécaniques pour les nombreux organes qu'il entoure tels que les reins et les ganglions lymphatiques. Il assure ainsi un rôle de protection ou de répartition des charges. Il peut également représenter un tissu de comblement transitoire dans des organes ou tissus soumis à remaniements. C'est un tissu peu sensible aux conditions nutritionnelles, même dans des conditions d'amaigrissement extrême où il ne disparaît jamais totalement.

- **Stockage et métabolisme lipidique**

Le rôle fonctionnel initialement décrit du TA blanc est une fonction de stockage d'énergie en période d'abondance calorique et de rendu d'énergie lors de restrictions caloriques. Le TA blanc gère ainsi les réserves énergétiques de l'organisme selon les besoins et les approvisionnements³⁴⁰. Le stockage des acides gras est réalisé sous la forme de triglycérides au sein de gouttelettes lipidiques contenues dans les adipocytes blancs. Les triglycérides sont constitués de trois acides gras estérifiés reliés à une molécule de glycérol, ce qui en fait des molécules de choix pour emmagasiner l'énergie. En plus de leur nature hydrophobe, ils possèdent une haute densité calorique et sont très peu hydratés, comparativement au glycogène ou aux protéines, lesquelles nécessitent jusqu'à cinq fois leur poids en eau associée. Les triglycérides contiennent donc davantage d'énergie tout en occupant un volume et un poids moindres. Lorsque les dépenses énergétiques sont supérieures aux apports (jeûne, exercice physique prolongé), les adipocytes blancs mobilisent leurs stocks de triglycérides en les hydrolysant, on parle de lipolyse. Ces propriétés métaboliques reflètent la plasticité du TA blanc, capables d'adapter ses fonctions à son micro-environnement.

Le TA de réserve occupe principalement les zones sous-cutanées ainsi que la cavité abdominale. Contrairement au TA de structure, c'est un tissu particulièrement sensible aux conditions métaboliques et donc soumis à de fortes variations. L'excès du TA de réserve, notamment au niveau viscéral, est responsable de complications métaboliques telles que l'obésité et le diabète³⁴⁴. La lipogenèse et la lipolyse sont toutes deux soumises à des signaux extracellulaires tels que l'insuline, le cortisol, les hormones de croissance, les acides gras libres, les cytokines^{345,346}.

Les adipocytes participent également au métabolisme du glucose car ils ont la capacité d'exprimer et de réguler le transporteur de glucose dépendant à l'insuline (en anglais *Glucose Transporter 4*, GLUT4). L'entrée de glucose dans la cellule adipeuse permet la synthèse *de novo* d'acides gras et de glycérol (lipogenèse) par la voie glycolytique³⁴⁵.

- **Fonctions endocrines**

Longtemps considéré comme un organe inerte de stockage et de libération des lipides en fonction des besoins métaboliques, le TA apparaît aujourd'hui comme un véritable organe endocrinien. C'est la découverte de la leptine, hormone régulant entre autres la satiété dans le corps et sécrétée par le TA³⁴⁷, puis de l'adiponectine³⁴⁸, qui a changé la vision que l'on avait de ce tissu conjonctif. Capable d'intégrer des signaux hormonaux, le TA sécrète en réponse de multiples molécules et peptides de signalisation (adipokines)³⁴⁹. Ces dernières sont principalement sécrétées par les adipocytes, tandis que les autres facteurs issus du TA peuvent être sécrétés par des cellules non adipocytaires. L'ensemble de ces facteurs remplissent des fonctions de communication inter-tissulaire par voie autocrine ou paracrine, mais également par voie systémique.

Parmi les adipokines, l'adiponectine est connue pour sensibiliser les tissus à l'insuline. Ainsi, une souris déficiente en adiponectine développera une insulino-résistance³⁵⁰. Par ailleurs, cette molécule possède des propriétés anti-inflammatoires³⁵¹. L'omentine est une autre adipokine sécrétée par le TA, probablement impliquée dans l'homéostasie du glucose³⁵². L'apeline, adipokine moins connue, régule néanmoins de nombreuses fonctions et fait l'objet d'une analyse plus poussée dans la suite de ce travail. Parallèlement à la production d'adipokines, le TA sécrète d'autres molécules telles que des facteurs impliqués dans l'hémostase avec la production de facteur tissulaire et d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (en anglais *Plasminogen Activator Inhibitor -1*, PAI-1) ainsi que des molécules impliquées dans les processus angiogéniques³⁵³⁻³⁵⁵. Enfin, bien que le TA ne synthétise pas d'hormones *de novo*, il exprime certaines enzymes impliquées dans la conversion des glucocorticoïdes et des hormones sexuelles^{356,357}.

En conditions pathologiques, le dysfonctionnement du TA est associé à une modification du profil de sécrétion³⁵³. Ainsi, les adipokines pourraient servir de marqueurs pour le diagnostic précoce de maladies métaboliques, cardiovasculaires, inflammatoires ou malignes.

- **Fonctions vasculaires**

Pour accomplir l'ensemble de ses fonctions, le TA se doit d'être doté d'un réseau vasculaire capable de s'adapter à sa propre plasticité³⁵⁸. Son développement est donc étroitement relié à celui du réseau vasculaire qui le compose. Ceci a été démontré *in vivo*, où l'utilisation d'inhibiteurs de l'angiogenèse dans des modèles murins aboutissaient à une altération de l'adipogenèse³⁵⁹⁻³⁶¹. Il existe également une communication entre les cellules endothéliales contenues dans les vaisseaux sanguins et les adipocytes au sein du TA. Celle-ci repose sur une signalisation paracrine impliquant des facteurs sécrétés ainsi que sur des mécanismes cellulaires encore par l'intermédiaire de contacts cellule-cellule. Pour ne citer que quelques-unes de ces interactions, le TA produit plusieurs molécules aux effets mitogéniques et angiogéniques comme la leptine et le VEGF alors que les cellules endothéliales sécrètent des facteurs de croissance comme le PDGF et des éléments matriciels (laminine, collagène de type IV, fibronectine) qui stimulent la prolifération et la différenciation des pré-adipocytes³⁶²⁻³⁶⁴.

- **Acteurs moléculaires**

Ainsi, le TA sécrète de nombreuses molécules dont plusieurs présentent un potentiel angiogénique. Les principales molécules impliquées dans les fonctions vasculaires du TA sont présentées dans le Tableau 6 ci-dessous.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	<ul style="list-style-type: none"> • Produit par les cellules de la fraction stromale vasculaire ainsi que par les adipocytes matures^{365,366,258} • Le VEGF-A, isoforme le mieux caractérisé, est majoritairement responsable du potentiel angiogénique du TA³⁶⁷ • Active la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales³⁶⁸
Leptine	<ul style="list-style-type: none"> • Petite adipokine produite principalement par les adipocytes du TA blanc • Régule l'apport alimentaire ainsi que la prise de poids par une action centrale sur l'hypothalamus³⁶⁹ • Action paracrine sur les cellules endothéliales, aboutissant à l'activation des voies signalétiques JAK/STAT impliquées dans l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaire • Promotion de la production de VEGF, de MMP-2 et MMP-9^{370,371} et de FGF-2, qui, combinés, augmentent la néovascularisation <i>in vivo</i>³⁷²
Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1)	<ul style="list-style-type: none"> • Sécrété par les cellules endothéliales, les adipocytes matures, les pré-adipocytes et les cellules stromales^{373,374} • Régule la dégradation de la MEC et donc la migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de capillaires³⁷⁵

Angiopoïétines 1 et 2 (Ang-1 et Ang-2)	<ul style="list-style-type: none"> • Ang-1 est sécrétée par les adipocytes et les cellules stromales du TA³⁷⁶, les cellules musculaires lisses et autres cellules périvasculaires^{376,377} • Ang-1, par sa liaison au récepteur Tie2, induit le remodelage et la stabilisation des vaisseaux nouvellement formés • Ang-1 permet la stabilisation des vaisseaux par son action sur les jonctions cellulaires³⁷⁸ en favorisant le contact des cellules endothéliales avec les cellules murales (cellules musculaires lisses et péricytes)³⁷⁹ • Ang-2 agit de manière autocrine et est presque exclusivement sécrétée par les cellules endothéliales³⁸⁰ • La liaison d'Ang-2 sur le récepteur Tie2 conduit à la déstabilisation des vaisseaux existants pour permettre le remodelage et la migration des cellules endothéliales³⁸¹
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	<ul style="list-style-type: none"> • Sécrété par les adipocytes matures, les cellules stromales, les pré-adipocytes^{258,382} ainsi que par les cellules endothéliales³⁸³ • Stimule la migration et la prolifération des cellules endothéliales³⁸³ • Augmente le potentiel angiogénique du VEGF <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>³⁸⁴
Fibroblast-Growth-Factor 2 (FGF-2)	<ul style="list-style-type: none"> • Produit par les pré-adipocytes³⁸⁵ • Stimule la prolifération des cellules endothéliales³⁸⁶ • Favorise la migration des cellules endothéliales et la formation de structure pseudotubulaires³⁸⁶
Apeline	<ul style="list-style-type: none"> • Ligand peptidique endogène du récepteur couplé à la protéine G : APJ³⁸⁷ • Sécrété par les cellules endothéliales • Les cellules endothéliales expriment intensément le récepteur APJ³⁸⁸ • Impliquée dans la régulation de la fonction cardiaque, l'angiogenèse, le métabolisme et l'homéostasie des fluides corporels³⁸⁹ • Régule la structuration vasculaire au stade embryonnaire^{390,391}

Tableau 6 : Principales molécules impliquées dans les fonctions vasculaires du tissu adipeux

• **Acteurs cellulaires**

Le potentiel de régénération vasculaire du TA repose également sur sa richesse en progéniteurs endothéliaux (PE). La détermination de l'origine tissulaire ainsi que des réservoirs des progéniteurs endothéliaux « vrais » de type ECFC chez l'adulte a fait l'objet de nombreux travaux. Il est maintenant démontré que ces cellules n'appartiennent pas au lignage hématopoïétique³⁹².

L'hypothèse d'ECFC présents au sein de la paroi vasculaire a été confirmée par l'équipe de Ingram qui retrouvait environ 20% de PE à haut potentiel prolifératif parmi les cellules endothéliales aortiques au niveau de l'intima^{393,394}. Depuis, plusieurs études ont conforté la présence de PE dans le mur vasculaire³⁹⁴⁻³⁹⁶. Par ailleurs, des précurseurs endothéliaux doués d'activité clonogénique dans l'adventice et la média des vaisseaux semblent également contribuer à la formation de néovaisseaux³⁹⁷. Yoder *et al.* ont également identifié une sous-population endothéliale dérivée de la paroi vasculaire en culture, dotée d'une forte capacité de prolifération. Ils ont montré que ces cellules contribuaient à la formation de néovaisseaux dans un modèle d'implant en collagène *in vivo*. Ces résultats suggèrent que des progéniteurs de type ECFC sont présents dans les vaisseaux sanguins *in situ* et peuvent être recrutés sur des sites vasculaires endommagés pour contribuer à la re-vascularisation^{392,397,398} (Figure 20).

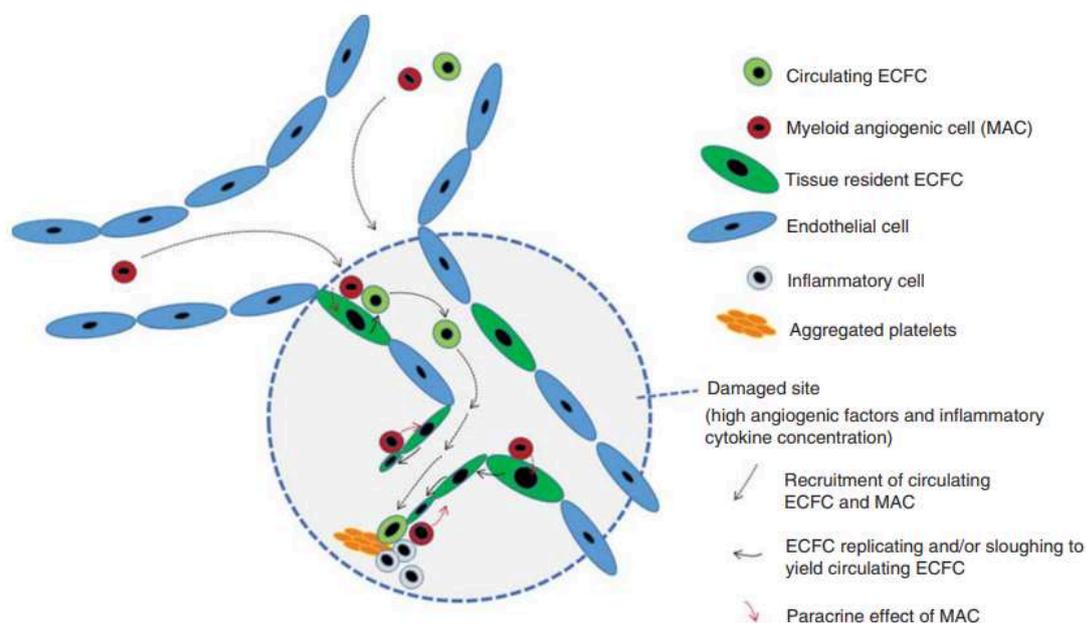


Figure 20 : Localisation des progéniteurs endothéliaux de type « ECFC » dans la paroi vasculaire et recrutement sur les sites endommagés d'après Banno et Yoder³⁹⁸

Au total, le TA, richement vascularisé, exerce son potentiel vasculogénique par voie paracrine mais également par voie cellulaire grâce aux ECFC présents dans le mur vasculaire.

2.2.2.2. Origine et composition du tissu adipeux

L'adipogenèse est le processus par lequel les cellules progénitrices restreignent leur destin à la lignée adipocytaire, accumulent des nutriments et deviennent des adipocytes matures remplis de triglycérides.

Chez l'Homme, l'adipogenèse est initiée dès le second trimestre de gestation où les premières cellules adipocytaires se développent selon un gradient antérieur vers postérieur,

céphalique vers caudal et dorsal vers ventral^{399,400}. L'adipogenèse est donc un processus qui commence lors de l'embryogenèse et qui se poursuit toute la vie avec un nombre d'adipocytes relativement constant à l'âge adulte. L'adipogenèse est essentielle pour assurer le renouvellement et l'intégrité du TA. Chez un adulte, on estime que 10% des cellules adipeuses se renouvellent annuellement⁴⁰¹.

L'adipogenèse peut se décrire comme un phénomène en deux étapes³⁴⁴. Dans un premier temps, un précurseur multipotent mésenchymateux restreint sa capacité de différenciation à la lignée adipocytaire sous l'influence des protéines *Bone Morphogenetic Protein*⁴⁰². Cette première étape, appelée « engagement » conduit à un précurseur morphologiquement inchangé qui exprime le facteur de transcription Zfp423, facteur nécessaire au développement fœtal de TA sous-cutané^{403,404}. S'en suit un processus de différenciation au cours duquel la croissance cellulaire cesse et les pré-adipocytes accumulent des lipides intracellulaires. De plus, ils expriment des marqueurs adipocytaires spécifiques tels que *Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ* (PPAR γ) et le transporteur du glucose GLUT4 (Figure 21).

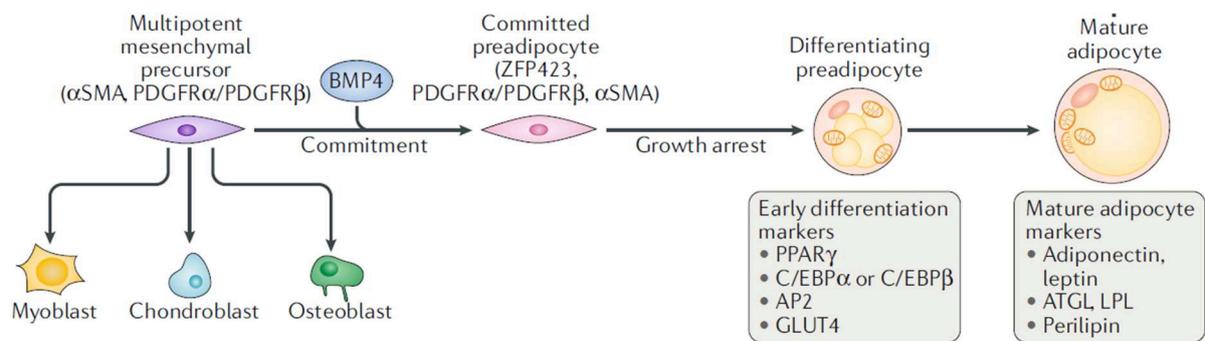


Figure 21 : Principales étapes soutenant l'adipogenèse d'après Ghaben *et al.* ³⁴⁴

PPAR γ est considéré comme le régulateur central de l'adipogenèse puisqu'il est indispensable à la différenciation adipocytaire *in vitro*⁴⁰⁵ et *in vivo*⁴⁰⁶. Il n'existe à ce jour aucun marqueur unique identifié des pré-adipocytes, reflet de leur hétérogénéité. Enfin, lors des étapes finales de différenciation, les adipocytes matures présentent une taille supérieure, une large vacuole lipidique et sécrètent des adipokines comme la leptine et l'adiponectine³⁴⁴.

Longtemps considérée comme une différenciation irréversible, de récentes données suggèrent que les adipocytes seraient capables de se dédifférencier. En effet, des études de traçage des lignées chez l'animal ont retrouvé des cellules d'origine adipocytaire mises en jeu lors de certains processus physio- pathologiques (cicatrisation, fibrose, lactation ...) ^{407,408}.

Bien que les principaux sites de production d'adipocytes matures soient le TA sous-cutané et viscéral, d'autres niches capables d'adipogenèse ont été mises en évidence comme le derme, les muscles squelettiques ou encore la MO. Chaque niche serait contrôlée par des stimuli particuliers et présenterait des phénotypes de pré-adipocytes spécifiques. Par

exemple, lors des processus de cicatrisation, les adipocytes présents dans le derme se différencient, reprennent une forme fibroblastique et subissent une transition adipocyte-myofibroblaste pour favoriser la réparation cutanée⁴⁰⁸.

La participation des cellules endothéliales au contrôle de l'adipogenèse fait l'objet de plusieurs travaux. Au-delà du rôle joué dans l'expansion du TA en augmentant la vascularisation nécessaire à ce développement, le lit vasculaire du TA a été proposé comme source potentielle de cellules progénitrices capables de former des adipocytes après différenciation^{409,410}. Ces travaux renforcent l'étroitesse du lien entre adipogenèse et angiogenèse.

Enfin, des études embryologiques suggèrent que les adipocytes bruns et blancs sont issus de progéniteurs différents et que les adipocytes bruns seraient, en partie, issus d'un progéniteur musculaire⁴¹¹.

Le TA blanc est organisé en lobules d'une taille moyenne de 5mm, au cœur desquels se trouvent les adipocytes. Ces lobules sont entourés d'un tissu conjonctif relativement dense qui supporte les circulations sanguines et lymphatiques ainsi que les terminaisons nerveuses. Le TA blanc contient également des cellules non adipocytaires regroupées sous le terme de « fraction vasculaire stromale », dont la composition et les propriétés sont détaillées dans le chapitre 2.3. du manuscrit.

L'adipocyte est une cellule différenciée sphérique pouvant atteindre 120 µm chez les sujets obèses⁴¹² contenant dans son cytoplasme des gouttelettes lipidiques plus ou moins volumineuses qui repoussent les autres organelles et son noyau contre la membrane plasmique. Les lipides contenus dans les adipocytes peuvent représenter jusqu'à 90% de la masse cellulaire adipocytaire.

L'adipogenèse est un processus continu au cours duquel des pré-adipocytes sont recrutés proportionnellement aux adipocytes matures morts par apoptose. La mort des adipocytes conduit à la libération du contenu cellulaire des adipocytes dans le milieu extracellulaire, où il induit une réponse inflammatoire et le recrutement de macrophages. La dérégulation de ces mécanismes serait impliquée dans la physiopathologie de l'obésité.

2.2.3. Potentiel thérapeutique du tissu adipeux dans la ScS

L'histoire du transfert de TA autologue date de la fin du XIX^e siècle où il fut utilisé initialement pour « combler » des plaies. Depuis, les idées et les techniques évoluèrent considérablement passant de l'époque « à ciel ouvert » à l'époque dite « purifiée et atraumatique » à la fin du XX^e siècle. C'est le Dr. Coleman qui, en 1994, codifie rigoureusement la technique de « Lipostructure® » ; depuis le prélèvement jusqu'à la réinjection du TA.

Différentes stratégies utilisant le TA ou ses dérivés ont été évaluées dans la prise en charge du handicap de la main ou du visage des patients atteints de ScS.

2.2.3.1. Handicap de la main

La greffe de TA autologue, aussi appelée *lipofilling*, est l'une des procédures les plus répandues en chirurgie plastique et réparatrice. Néanmoins, son application dans la ScS est récente puisque c'est en 2014 que le TA a été testé dans la prise en charge du syndrome de Raynaud⁴¹³. Cette étude monocentrique a inclus 13 patients présentant un phénomène de Raynaud réfractaire dont 9 patients atteints de ScS. Le TA, préparé selon la méthode de Coleman (centrifugation du TA pendant 3 minutes à 3000 rpm) était injecté localement au niveau de la paume et du dos de la main. Cette étude a montré une excellente tolérance de la procédure et une réduction significative de la douleur ainsi que du nombre, de la durée et de la gravité des crises induites par le froid.

En 2015, Del Papa *et al.* rapportent l'efficacité de l'injection autologue de TA purifié dans les doigts des patients sclérodermiques pour le traitement des UD réfractaires⁴¹⁴ et confirmer ainsi les résultats d'une première étude sur 9 patients sclérodermiques⁴¹⁵. Le TA était récolté après lipoaspiration sous anesthésie locale, puis centrifugé. Les phases contenant l'huile et les adipocytes matures ainsi que les résidus de sanguins ont été éliminés et seule la couche intermédiaire appelée par les auteurs « ATDC », pour *Adipose Tissue Derived Cell*, a été injectée. La guérison de l'ulcère était observée chez tous les patients et aucun ulcère n'est réapparu. Une réduction significative de la douleur a été observée après quelques semaines sans aucun effet indésirable soulevé. Une évaluation par capillaroscopie a permis de détecter une croissance et une augmentation très significative du nombre de capillaires. Une diminution significative de la résistance artérielle évaluée par échographie Doppler a également été notée après 1, 3 et 6 mois, comparativement à l'état initial. Un essai randomisé contre placebo (solution saline) mené par la même équipe en 2018 confirme l'efficacité et la sécurité de la procédure avec une guérison à 8 semaines des ulcères chez 23 des 25 patients qui ont reçu le TA *versus* 1/13 dans le groupe placebo⁴¹⁶ (Figure 22).



Figure 22 : Guérison progressive à 4 et 8 semaines des ulcères digitaux après injection de TA autologue d'après Del Papa *et al.*⁴¹⁶

2.2.3.2. Handicap du visage

L'atteinte du visage au cours de la ScS est un handicap fréquent des patients non seulement sur le plan esthétique (télangiectasies, plis radiaires péri-buccaux, amincissement des lèvres, perte de la mimique faciale), mais aussi sur le plan fonctionnel (limitation de l'ouverture buccale, problèmes gingivo-dentaires, syndrome sec, douleur aux articulations temporo-mandibulaires).

Il semble que dans les formes cutanées localisées de sclérodémie, le transfert de TA autologue conduise à de bons résultats, persistants plusieurs années après la procédure^{417,418}.

L'injection de TA purifié a été évaluée dans la région péri-orale pour la première fois en 2015 chez 20 patients atteints de formes diffuses de ScS. Une amélioration significative de l'ouverture de la bouche et de la néovascularisation de la peau (objectivée par capillaroscopie et densité vasculaire) ont été rapportées⁴¹⁹. En 2016, Sautereau *et al.* ont protocolisé une approche simple de réinjection de TA purifiée à l'aide d'un système Puregraft® chez 14 patients⁴²⁰. Une diminution moyenne de 10,7 points du score MHISS (score d'évaluation du handicap spécifique à la bouche conçue pour les patients atteints de ScS) a été observée à 6 mois. Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude réalisée chez 16 patients présentant une sclérose faciale associée à une capacité d'ouverture limitée de la bouche⁴²¹.

Plus récemment, l'approche par lipotransfert dans la fibrose de la face a été évaluée dans une cohorte de 62 patients sclérodermiques⁴²². Celle-ci rapporte une amélioration significative du MHISS d'environ 7 points ainsi que des scores psychologiques évaluant, entre autres, l'anxiété des patients. Des analyses *in vitro* complémentaires à cette étude ont montré une *down-regulation* des gènes de fibrose dans les fibroblastes de patients après co-cultures avec des ASC. Cet effet était principalement médié par un effet paracrine.

Aussi, Berl *et al.* rapportent les résultats d'administrations répétées de TA autologue dans le visage de 17 patients (14 femmes et 3 hommes)⁴²³. L'originalité de cette étude repose sur l'administration de TA dans différentes zones anatomiques de la face en fonction des atteintes propres à chaque patient (front, région temporale, joues, lèvres, nez...). Aussi, 9 patients sur 17 ont reçu au moins une seconde injection de TA dans le visage 1 an après la première procédure. Les résultats montrent une amélioration significative de l'ouverture de la bouche d'en moyenne 0,85cm et une satisfaction globale des patients traités.

Strong *et al.* suggèrent l'efficacité et l'innocuité d'injections de TA purifié préparé selon la méthode Coleman au niveau des mains et du visage dans une petite série de cas (10 patients sclérodermiques)⁴²⁴. Aussi, une étude ouverte prospective rapporte en 2020 l'efficacité et l'innocuité de trois greffes successives de TA autologue tous les six mois pour le traitement des complications de la face et des doigts chez 25 patients atteints de ScS. Les résultats à six mois après la dernière injection montrent des résultats encourageants avec une amélioration de la sécheresse buccale, de l'épaisseur cutanée et des phénomènes de Raynaud⁴²⁵.

Enfin, le premier essai contrôlé randomisé évaluant l'approche par injection de TA purifié dans la prise en charge de l'atteinte oro-faciale chez 50 patients sclérodermiques est en cours⁴²⁶.

Par ailleurs, des approches combinant le TA à d'autres produits de médecine régénérative ont été évaluées dans la ScS. Par exemple, le Plasma Riche en Plaquettes (PRP), concentré plaquettaire issu du sang périphérique obtenu facilement et rapidement, a été associé au transfert de TA dans deux études pour la prise en charge du handicap du visage chez les patients sclérodermiques.

Virzì *et al.* ont ainsi traité six patientes par l'administration séquentielle de PRP puis de TA au niveau du visage (aires malaires et péri-orales). Les résultats montrent une augmentation significative de l'élasticité cutanée entraînant une nette amélioration de l'ouverture buccale⁴²⁷. Notre équipe a également rapporté l'efficacité de l'association TA et PRP dans des petites cohortes de patientes atteintes de ScS^{428,429}. Contrairement à l'étude de Virzì, les produits étaient mélangés extemporanément lors de l'injection. Les résultats suggèrent une diminution du handicap de la face (évaluée par le score de MHISS) et une capacité d'ouverture buccale plus importante 12 mois après la procédure. Les patients ont déclaré être très satisfaits d'un point de vue fonctionnel et esthétique, jusqu'à leur dernier suivi à 12 mois. Cependant, l'apport réel de PRP mérite d'être évalué dans des essais comparatifs de plus grande échelle.

2.3. La Fraction Vasculaire Stromale du tissu adipeux

2.3.1. Définition et réglementation

C'est la démocratisation des techniques de lipotransfert qui a conduit les chirurgiens à constater un effet trophique associé aux transferts du TA. En 2001 et grâce aux travaux de Zuk, cet effet est attribué à la présence de progéniteurs multipotents⁴³⁰. Dans cette étude, il est démontré que le TA contient des cellules souches multipotentes dont les propriétés sont similaires à celles des CSM de la MO (*décrites précédemment dans ce travail*).

Bien que les adipocytes constituent plus de 90% du volume du TA, ils représentent moins de 50 % de son contenu cellulaire⁴³¹ ; les autres cellules constituant la Fraction Vasculaire Stromale (FVS). La FVS est constituée d'un mélange de cellules parmi lesquelles sont présentes deux sous-populations aux propriétés régénératives : les cellules souches/stromales mésenchymateuses et les progéniteurs endothéliaux.

D'un point de vue réglementaire, la production de FVS répond aux critères de MTI en Europe. Des procédés mécaniques et enzymatiques existent pour l'extraction de la FVS du TA⁴³². Cependant, la digestion enzymatique constitue la méthode de référence pour la préparation de ce produit. Pour cela, le TA lavé est digéré à 37°C pendant un temps variable selon les équipes (45 minutes dans notre équipe) grâce à l'emploi d'une enzyme, le plus souvent la collagénase. Celle-ci détruit les fibres de collagène de la MEC du TA et désolidarise les cellules contenues dans le TA. S'en suit une étape de centrifugation qui permet d'éliminer les adipocytes matures et la phase huileuse (Figure 23).

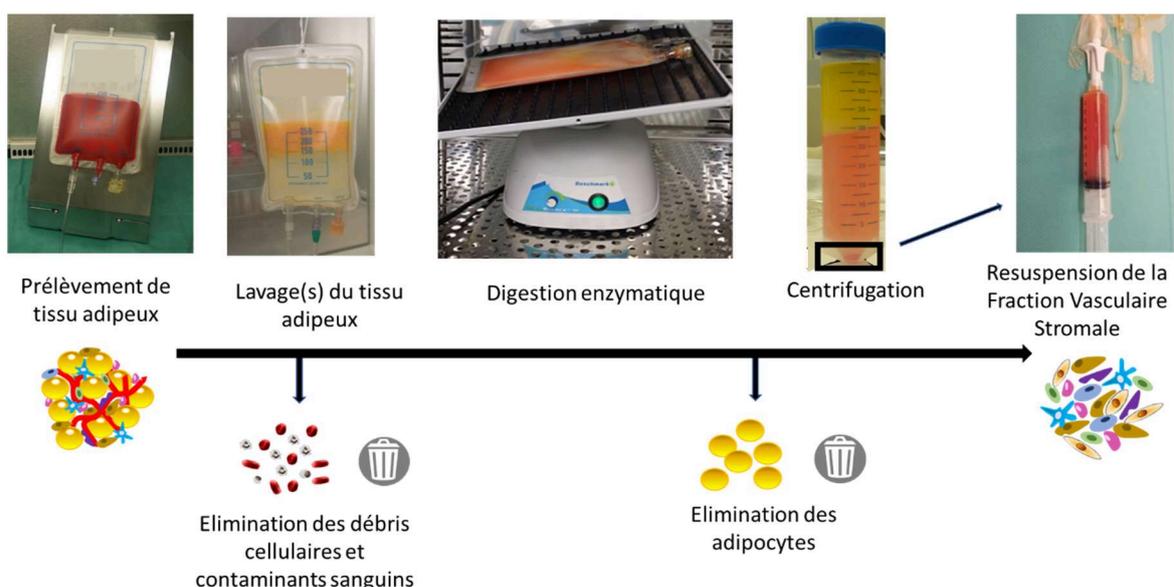


Figure 23 : Etapes d'obtention de la FVS par digestion enzymatique et centrifugation d'un prélèvement de tissu adipeux

2.3.2. Composition de la FVS

La caractérisation cellulaire de la FVS repose sur des approches multiparamétriques de cytométrie en flux. Plusieurs variables peuvent impacter la répartition cellulaire de la FVS telles que le site de prélèvement du TA et la méthode d'extraction de la FVS. L'*International Federation for Adipose Therapeutics and Science* (IFATS) et l'ISCT ont proposé une répartition des cellules nucléées viables contenues dans la FVS comme suit⁴³³ :

- 25 à 45% de cellules d'origine hématopoïétique
- 15 à 30% de cellules stromales incluant les CSM
- 10 à 20% de cellules endothéliales et progéniteurs endothéliaux
- 3 à 5% de péricytes

En lien avec cette stratégie, notre équipe a mis au point une approche de cytométrie en flux permettant d'identifier les principales populations cellulaires sur la combinaison de cinq marqueurs : DRAQ5 (marqueur nucléaire), NucBlue (marqueur de viabilité) CD45, CD34, CD146 représentée ci-dessous⁴³⁴ (Figure 24).

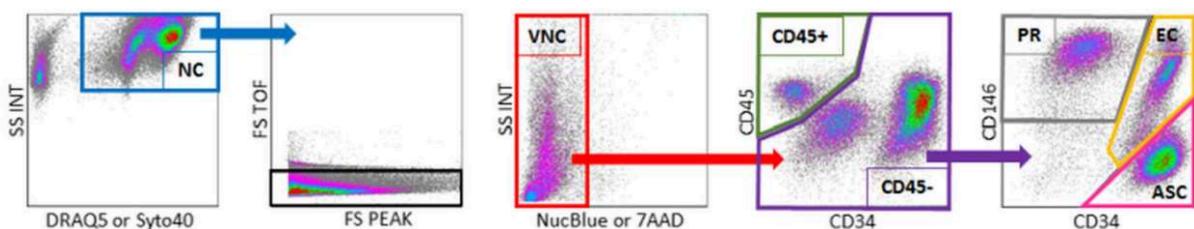


Figure 24 : Stratégie de cytométrie en flux pour l'analyse de la répartition cellulaire de la FVS du TA d'après François *et al.*⁴³⁴

2.3.2.1. Populations endothéliales

La présence de progéniteurs endothéliaux « vrais » de type *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC) dans la paroi vasculaire a déjà été discutée dans ce travail (cf. partie 2.2.2.1.). Le TA sous-cutané, facilement accessible en situation autologue et richement vascularisé, constitue un réservoir alternatif d'ECFC^{435,436}. Actuellement, aucun marqueur de surface ne permet de différencier les cellules endothéliales matures des ECFC. Ainsi, lorsque le contingent endothélial est caractérisé par cytométrie en flux au sein de la FVS, il regroupe à la fois des cellules endothéliales microvasculaires matures et des cellules progénitrices.

L'isolement des ECFC depuis la FVS (surtout en contexte pathologique) reste délicat et peu documenté dans la littérature actuelle. Szöke *et al.* ont comparé la morphologie, les profils phénotypiques et l'expression de gènes d'intérêt des ECFC du sang périphérique et du tissu adipeux⁴³⁵. Ils montrent que les ECFC du TA peuvent être isolés puis expansés après séparation

immunomagnétique^{435,437}. Les ECFC isolés du sang périphérique et du TA ont une morphologie semblable (pavimenteuse) ainsi que des profils phénotypiques similaires sur une vingtaine de marqueurs de surface. Cependant, l'analyse par clustering hiérarchique des puces à ADN permet de distinguer les ECFC du sang périphérique de ceux du TA avec plus de 200 gènes différentiellement exprimés. Par ailleurs, l'activité vasculogénique des ECFC du TA évaluée dans des tests de Matrigel® *in vitro* et *in vivo* chez des souris immunodéficientes ne diffère pas de celle des ECFC du sang périphérique^{436,437}. Récemment Saito *et al.* soulignent la difficulté d'isolement des ECFC depuis la FVS et suggèrent la réalisation de tris immunomagnétiques successifs, notamment pour éviter toute contamination par les cellules mésenchymateuses contenues dans la FVS⁴³⁸.

2.3.2.2. Cellules Souches/stromales Mésenchymateuses

La trophicité du TA est attribuée à la présence de cellules souches multipotentes grâce à une étude pionnière réalisée par l'équipe de Zuk⁴³⁰. L'isolement de cette population cellulaire a été possible par mise en culture de la FVS (obtenue par digestion enzymatique). Après quelques jours de culture, les auteurs décrivent une population homogène d'allure fibroblastique appelée initialement « *Processed Lipoaspirate* » (PLA). Le PLA est ainsi présenté comme une alternative à l'utilisation thérapeutique des CSM de MO, présentant l'avantage d'un prélèvement moins invasif et de fournir des CSM en plus grande quantité comparativement à la MO ; jusqu'à dix fois plus que dans la MO d'après Zhu *et al.*⁴³⁹.

La FVS contient un pourcentage plus élevé de cellules stromales comparativement à la fraction mononucléée de la MO (BM-NC : *Bone Marrow-Nucleated Cells*). De même, la clonogénicité des cellules stromales déterminée par le test *in vitro* CFU-F suggère un potentiel clonogénique plus important des CSM contenues dans le TA^{433,439}. Initialement décrites comme CD34 négatives, les CSM non expansées présentes dans la FVS (et dans une moindre mesure dans la MO) expriment à la surface le marqueur CD34^{433,440,441}. Les principales différences phénotypiques et fonctionnelles des cellules mononucléées de la FVS et de la moelle osseuse ainsi que des CSM-MO et ASC sont résumées dans le Tableau 7 ci-dessous.

	SVF	BM-NC	ASC	MSC
CD34	+	±	±	-
CD45	+	++	-	-
CD13	±	++	++	++
CD73	±	±	++	++
CD90	±	±	++	++
CD105	±	±	++	++
CD10			++	±
CD36			+	-
CD106			±	+
CFU-F	>1%	>0.001%	>5%	>5%

Tableau 7 : Différences phénotypiques et clonogéniques entre les cellules mononucléées de la moelle osseuse et de la FVS d'après Bourin *et al.*⁴³³

Décrites dans la partie 2.1.2. de ce travail, les propriétés des CSM sont nombreuses : renouvellement cellulaire, pro-angiogénique, antifibrotique et anti-apoptotiques ; entre autres. Les analyses transcriptomiques et protéomiques sur les ASC et CSM issues de la MO montrent des profils différents sur respectivement 13% et 18% des cibles analysées⁴⁴². De même, certains auteurs décrivent des propriétés biologiques similaires entre les CSM des deux sources^{247,443} ; d'autres suggèrent que les ASC ont un potentiel immunomodulateur accru⁴⁴⁴.

2.3.2.3. Péricytes et cellules transitionnelles

Les péricytes désignent des cellules vasculaires murales contenues dans la FVS⁴⁴⁵. Ce sont les équivalents, au sein des microvaisseaux, des cellules musculaires lisses de plus gros vaisseaux. Cette localisation particulière leur permet une communication privilégiée avec l'endothélium^{445,446} et leur confère un rôle central dans la formation des nouveaux microvaisseaux.

Lors des étapes précoces d'angiogenèse, les cellules endothéliales bourgeonnantes sécrètent du PDGF β qui, par interaction avec le PDGF-R exprimé sur les péricytes, provoque le recrutement et l'adhésion des cellules murales aux cellules endothéliales⁴⁴⁷. D'autres voies moléculaires sont impliquées dans l'interaction entre l'endothélium et les péricytes telles que la voie des angiopoïétines et du VEGF^{447,448}.

Aussi, les péricytes maintiennent l'intégrité et la stabilité des structures vasculaires. Ils contribuent également à la contractilité des microvaisseaux, particulièrement les péricytes exprimant l' α SMA. Le potentiel de différenciation des péricytes est très proche de celui de CSM (chondrocytes, adipocytes)⁴⁴⁹. De par la présence de marqueurs de surface communs^{446,450}, leur localisation périvasculaire et une multipotence proche, les péricytes et les ASC sont deux populations difficiles à distinguer clairement.

2.3.2.4. Pré-adipocytes

Les pré-adipocytes sont les précurseurs des adipocytes matures. Les étapes par lesquelles les cellules progénitrices se différencient en cellules matures repose sur une étape d'engagement suivie d'une différenciation cellulaire. Zimmerlin *et al.* ont identifié une population de cellules périvasculaires dans la FVS définie par le phénotype CD45- CD31- CD146- CD34+ qu'ils nomment «cellules stromales adipeuses supra-adventitielles»⁴⁵¹. Cette population, fortement positive pour les marqueurs classiquement exprimés par les CSM, représenterait près de 60% des cellules contenues dans la FVS. La confusion entre pré-adipocytes et CSM est toujours présente et il n'existe à ce jour aucun marqueur ou combinaison de marqueurs capable de les identifier distinctement.

2.3.2.5. Leucocytes

Le contingent leucocytaire CD45+ représente 20 à 40% des cellules de la FVS du TA sous-cutané. Les populations leucocytaires de la FVS regroupent les monocytes/macrophages, les

lymphocytes et les polynucléaires neutrophiles. Bien que le contingent CD45+ de la FVS soit beaucoup moins documenté dans la littérature que la fraction régénérative CD45-, quelques études ont caractérisé les populations hématopoïétiques contenues dans la FVS.

Les monocytes/macrophages (cellules CD14+) représentent classiquement la population leucocytaire majoritaire au sein de la FVS, soit environ $10.9 \pm 9.6\%$ ^{452,453}. Deux niveaux d'activation des macrophages sont décrits : un phénotype M1 pro-inflammatoire et un profil M2 anti-inflammatoire⁴⁵⁴. Plus de 90 % des macrophages présents dans le TA sont polarisés sur un profil M2. Ils se situent au niveau péri-endothélial et dans les espaces interstitiels entre les adipocytes. De plus, une sous-population de macrophages M2 (CD45+ CD34+ CD14+ CD206+) a été mise en évidence dans le TA et serait capable d'exercer des propriétés proches de celle des CSM telles que l'adhérence en culture ainsi qu'une capacité de différenciation dans les trois principales lignées mésodermiques⁴⁵⁵. Aussi, il a été démontré que les monocytes CD14+ présents dans la FVS contribuent à la vascularisation des tissus par la sécrétion de cytokines telles que le VEGF et le FGF-2⁴⁵⁶.

Les études s'intéressant aux lymphocytes et neutrophiles contenus dans le TA sont rares mais soulignent toutefois l'impact d'un contexte pathologique sur la composition de la FVS. Par exemple, les FVS de patients obèses ou infectés par le virus de l'immunodéficience humaine présentent une élévation de la concentration en LyTCD8+ et du ratio LyTCD8+/LyTCD4+ dans le TA⁴⁵⁷. Ces résultats questionnent sur les conséquences d'une thérapie autologue par administration de FVS dans les contextes inflammatoires ou de dysimmunité tels que la ScS.

Ainsi, la présence de cellules inflammatoires au sein du TA pourrait avoir un impact sur les propriétés régénératives de la FVS et suscite l'intérêt de comprendre l'empreinte du contexte pathologique sur les populations CD45+ de la FVS autologue, dans le cadre de thérapies ciblant la fibrose ou l'inflammation.

Au total, la caractérisation de la composition de la FVS reste débattue puisqu'il existe des confusions et des caractéristiques communes entre les différentes populations cellulaires. Les deux principales limites à une caractérisation optimale de ce produit cellulaire complexe sont l'absence de stratégie de cytométrie en flux standardisée et l'incapacité à identifier des marqueurs uniques pour chaque population, comme en témoigne le Tableau 8 ci-dessous.

	Mesenchymal stem cells (ADSCs)	Pericytes	Endothelial progenitor cells	Supra-adventitial adipose stromal cells (Preadipocytes)	Transitional cell	Macrophages/monocytes
Bourin <i>et al.</i> , 2013 [2]	CD45 ⁺ CD31 ⁻ CD13 ⁺ CD73 ⁺ CD90 ⁺ CD105 ⁺ CD34 ⁺ (unstable)					
CD45 ⁺ (< 50%) CD31 ⁻ (< 20%) [CD13 ⁺ CD29 ⁻ CD44 ⁺ CD73 ⁺ CD90 ⁺ (> 40%)] CD34 ⁺ (> 40%)						
Zimmerlin <i>et al.</i> , 2013 [14]		CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD146 ⁺	CD45 ⁻ CD31 ⁺ CD34 ⁺	CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD146 ⁻ CD34 ⁺	CD146 ⁺ CD31 ⁻ CD34 ⁺	
Hager <i>et al.</i> , 2013 [25]			CD133 ⁺ CD146 ⁺ CD34 ⁺ CD31 ⁺			
Bianchi <i>et al.</i> , 2013 [65]	CD90 ⁺ CD29 ⁺ CD34 ⁻	CD146 ⁺ CD90 ⁺ CD34 ⁻			CD146 ⁺ CD34 ⁺	
Corselli <i>et al.</i> , 2013 [24]		CD146 ⁺ CD34 ⁻ CD45 ⁻ CD56 ⁻	CD34 ⁺ CD146 ⁺ CD31 ⁺	CD34 ⁺ CD31 ⁻ CD146 ⁻		
Traktuev <i>et al.</i> , 2008 [66]	CD34 ⁺ CD31 ⁻ CD45 ⁻ CD144 ⁻			CD34 ⁺ CD45 ⁻ CD31 ⁻		
Eto <i>et al.</i> , 2013 [12]						CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD34 ⁺ CD206 ⁺

Positivity (+) is defined as greater than 80% unless otherwise noted. Negativity (-) is defined as less than 5% unless otherwise noted.

Tableau 8 : Principales populations cellulaires décrites dans la FVS et les phénotypes associés d'après la revue de Guo *et al.*⁴⁵⁸

2.3.3. Propriétés de la FVS

La FVS exerce une multitude d'effets biologiques qui reposent principalement sur la présence de progéniteurs endothéliaux et mésenchymateux.

2.3.3.1. Régénération tissulaire

Les cellules souches représentent une option de choix dans la régénération tissulaire en raison de leur aptitude à se différencier en des cellules matures. Le potentiel de régénération de la FVS repose donc principalement sur la présence de CSM, progéniteurs multipotents capables de se différencier en grand nombre de lignées cellulaires.

Fu *et al.* ont réalisé des études de traçage de la FVS par marquage à la *Green Fluorescent Protein* (GFP) permettant d'illustrer les changements cellulaires dynamiques qui se produisent chez les souris traitées par lipotransfert⁴⁵⁹. Bien que la majorité des cellules disparaissent dans les quatorze jours suivant la greffe, des cellules marquées ont pu être observées jusqu'à presque 2 mois post-greffe (reliquat de 17.3% comparativement au 1^{er} jour post-greffe). L'identité des cellules GFP positives persistantes chez l'animal n'a pas été réalisée dans cette

étude. Néanmoins, des processus d'adipogenèse et d'angiogenèse ont été décrits sur la base de co-marquage de la GFP avec, la périlipine et le CD31 respectivement.

Parallèlement, la FVS exerce un effet inducteur sur la prolifération de cellules cibles après injection. Par exemple, l'administration de FVS au niveau des ulcères de pied diabétique active les processus de cicatrisation, en partie grâce à la stimulation des cellules receveuses⁴⁶⁰. Des résultats similaires ont été décrits dans la prise en charge des brûlures au cours desquelles la FVS contribuait à l'amélioration de l'activité et de la prolifération fibroblastique⁴⁶¹. Aussi, l'exposition de cardiomyocytes endommagés à des milieux conditionnés de la FVS a conduit à une amélioration fonctionnelle des cellules cardiaques dans un modèle *in vitro* d'ischémie cardiaque⁴⁶². Cet effet cardioprotecteur était principalement médié par deux facteurs de croissance : l'HGF et l'IGF-1. Plus récemment, une étude a montré que le traitement de chondrocytes TNF α -stimulés avec un milieu conditionné de cellules de FVS permettait d'activer la prolifération des chondrocytes tout en réduisant les niveaux de médiateurs inflammatoires comme l'IL-1 β ⁴⁶³. Ces résultats suggèrent que la FVS exerce un effet prolifératif et anti-inflammatoire par des mécanismes paracrines sur certaines cellules cibles.

Au total, le potentiel de régénération cellulaire de la FVS est porté par une forte composante paracrine mais également par la multipotence des cellules souches qu'elle contient.

2.3.3.2. Effet pro-angiogénique

En lien direct avec sa composition, il a été attribué à la FVS des propriétés angiogéniques. En effet, les cellules de la FVS sont capables d'auto-assemblage en une structure vasculaire hiérarchisée et robuste. Ramakrishnan *et al.* ont mis en évidence la formation spontanée d'un réseau vasculaire après injection sous-cutanée d'une matrice de collagène chargée en cellules de FVS dans un modèle *in vivo*⁴⁶⁴.

Par ailleurs, l'ensemencement de FVS au sein d'une matrice de Matrigel® aboutissait à la formation de pseudo-tubes selon la cinétique suivante : agrégation, formation de clusters cellulaires puis bourgeonnement des *tip cells*, suivies par les *stalk cells* qui supportent la création de pseudo-capillaires et enfin stabilisation des réseaux⁴⁶⁵. Les cellules endothéliales supportent majoritairement l'activité pro-angiogénique de la FVS. Ceci est objectivé dans des modèles de déplétion de la FVS en cellules endothéliales qui conduisent à une vascularisation significativement diminuée^{466,467}.

Bien qu'indispensables, les cellules endothéliales ne sont pas les seules à contribuer au potentiel angiogénique de la FVS. En effet, il est désormais admis qu'il existe une synergie d'action entre les ASC, les cellules endothéliales et les péricytes sur la croissance et/ou la régénération vasculaire.

Cette synergie cellulaire a été démontrée *in vivo* puisque les implants contenant une association de progéniteurs endothéliaux et d'ASC présentent une plus grande néovascularisation comparativement à des implants chargés en progéniteurs endothéliaux ou ASC indépendamment⁴⁴⁰ (Figure 25).

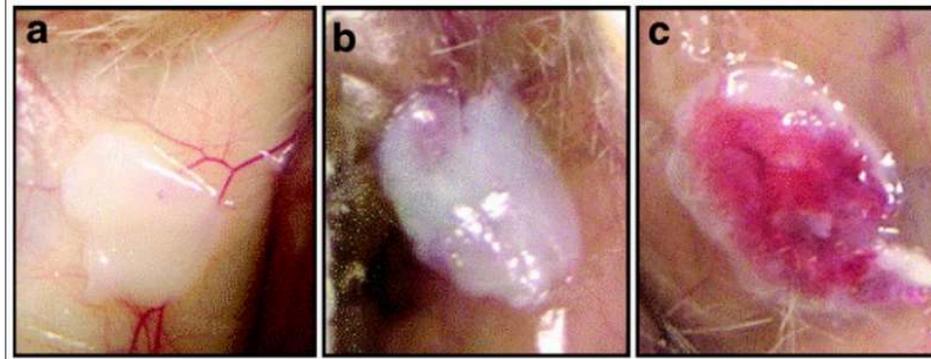


Figure 25 : Photos représentatives d'implants de collagène chargés en progéniteurs endothéliaux (a), en ASC (b) ou en une combinaison des deux types cellulaires (c) à 14 jours post-implantation sous-cutanée chez la souris NOD/SCID d'après Traktuev *et al.*⁴⁴⁰

De plus, Traktuev *et al.* ont suggéré l'établissement d'un cercle paracrine vertueux entre les populations cellulaires contenues dans la FVS. Ce dernier repose sur la sécrétion de VEGF par les ASC qui favorise la migration et la survie des cellules endothéliales et réciproquement, le PDGF-BB et le FGF-2 sécrétés par les cellules endothéliales augmentent la prolifération des ASC⁴⁴⁰. Cette hypothèse est confortée par les travaux de Harada *et al.* qui ont montré un potentiel angiogénique accru de la FVS comparativement à celui des ASC dans un modèle d'ischémie de la patte chez le rat⁴⁶⁸.

Ainsi, une double communication s'établit entre les ASC et les progéniteurs endothéliaux au sein de la FVS. Ces interactions paracrines et cellulaires représentent un véritable *crosstalk* intercellulaire et sont illustrées ci-dessous (Figure 26).

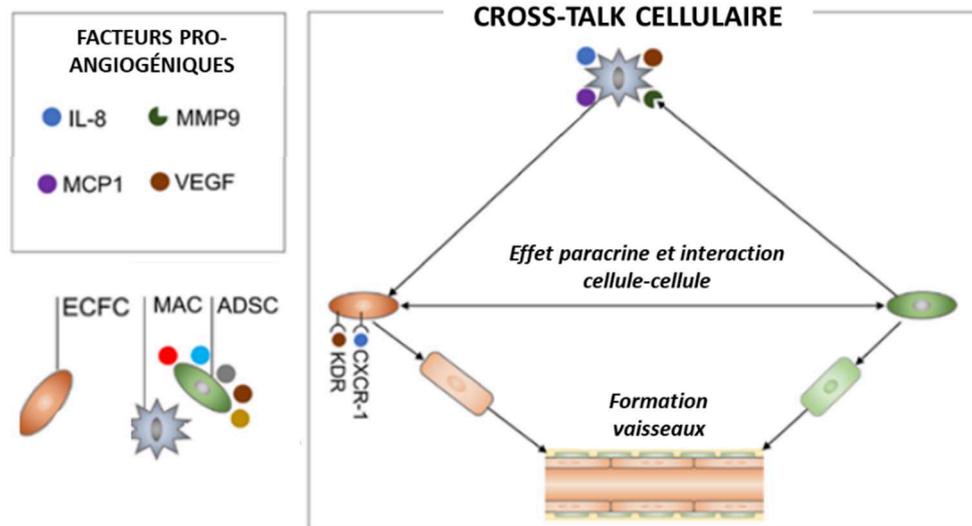


Figure 26 : Crosstalk entre CSM et progéniteurs endothéliaux dans les FVS d'après Bora et Majumdar⁴⁶⁹

D'autres voies moléculaires sont également impliquées dans le potentiel de régénération vasculaire de la FVS. Par exemple, l'exposition d'ECFC à des milieux conditionnés de CSM augmente la capacité de formation des vaisseaux et implique la surexpression de la sphingosine kinase 1 (SphK1)⁴⁷⁰. Des études de blocage de la voie de la SphK1 ont confirmé la nécessité de cette molécule dans l'interaction entre cellules endothéliales et mésenchymateuses.

Par ailleurs, les macrophages sont de plus en plus étudiés dans le potentiel angiogénique de la FVS. La déplétion des macrophages de phénotype anti-inflammatoire de type M2 conduit à une angiogenèse plus fragile et, à terme, à une prise de greffe réduite⁴⁷¹. Aussi, les populations monocytaires/macrophagiques présentes dans le TA peuvent acquérir un phénotype endothélial KDR+ Tie2+ et certaines études en Matrigel plug *in vivo* suggèrent également que les cellules CD14+ ont la capacité de se différencier en cellules endothéliales⁴⁵⁶.

L'ensemble de ces travaux supporte l'importance de l'hétérogénéité cellulaire de la FVS et la complexité des mécanismes moléculaires associés au potentiel angiogénique.

2.3.3.3. Propriétés immunomodulatrices

Les cellules de la FVS possèdent également des propriétés immunomodulatrices. Elles permettent de limiter les dommages tissulaires par la sécrétion de facteurs anti-apoptotiques et anti-inflammatoires⁴⁵⁸. Ainsi, la FVS module les réponses immunes par différents mécanismes tels que la sécrétion de molécules immunosuppressives, l'inhibition de la prolifération des LyT, l'activation de la maturation des cellules dendritiques et le recrutement de LyT régulateurs (LyTreg)⁴⁵⁸.

En conditions physiologiques, les macrophages du TA présentent majoritairement un phénotype M2 anti-inflammatoire participant au potentiel immunomodulateur de la FVS. Néanmoins, dans certaines conditions pathologiques comme l'obésité, les macrophages acquièrent un phénotype pro-inflammatoire M1 dont les conséquences sur le potentiel thérapeutique de la FVS sont mal étudiées. De façon intéressante, les LyTreg du TA secrètent jusqu'à 130 fois plus d'IL-10 (cytokine immunomodulatrice) que les LyTreg présents dans les ganglions, en faveur d'un fort potentiel anti-inflammatoire de la FVS⁴⁷².

Enfin, dans un modèle *in vivo* de sclérose en plaque (modèle d'encéphalite auto-immune), l'administration de FVS par voie intrapéritonéale était plus efficace que les ASC sur la réduction d'IFN γ et d'IL-12, deux cytokines impliquées dans la pathogénèse de la maladie⁴⁷³.

2.3.3.4. Potentiel antifibrotique

Les démonstrations de l'effet antifibrotique de la FVS sont peu nombreuses dans la littérature.

En 2016, Domergue *et al.* ont comparé le potentiel antifibrotique des ASC expansées à celui des cellules de la FVS (dose normalisée sur la quantité d'ASC) dans un modèle de cicatrice hypertrophique après greffe de peau humanisée chez des souris *Nude*⁴⁷⁴. Les résultats histologiques suggéraient que les administrations locales d'ASC et de FVS conduisaient à une atténuation de la cicatrice hypertrophique objectivée par une réduction de l'épaisseur cutanée et du contenu en collagène. Bien que les deux produits cellulaires testés (ASC et FVS) aient montré une amélioration *versus* placebo, les ASC semblaient plus efficaces sur la réduction de l'épaisseur cutanée à 9 semaines (Figure 27).

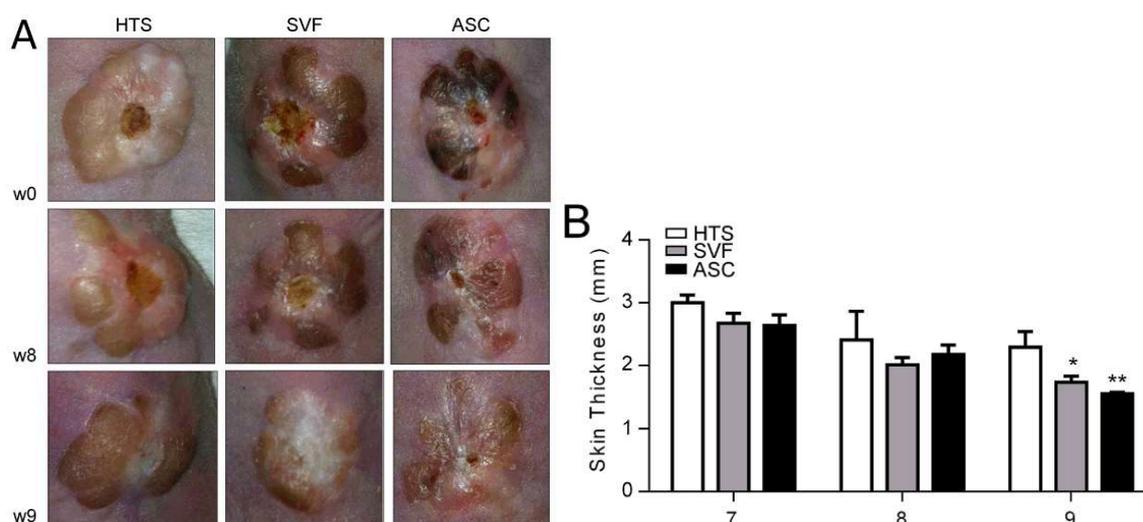


Figure 27 : Réduction de la cicatrice hypertrophique après l'administration de FVS et d'ASC (A) images représentatives des plaies (B) mesure de l'épaisseur cutanée à 7, 8 et 9 semaines d'après Domergue *et al.* ⁴⁷⁴

Par ailleurs, l'analyse de transcrits au niveau de la cicatrice 2 semaines après les injections d'ASC ou de FVS est en faveur de mécanismes antifibrotiques distincts. En effet, l'administration d'ASC conduisait à une *up-regulation* du TGF β 3, médiateur antifibrotique et à une élévation du ratio MMP-2/TIMP-2, témoin d'un remodelage de la MEC. Comparativement, l'efficacité de la FVS semblait médiée par une *down-régulation* du TGF β 1.

Aussi, notre équipe a documenté l'effet antifibrotique et pro-angiogénique de la FVS dans un modèle murin de fibrose cutanée induit par des injections quotidiennes sous-cutanée de bléomycine⁴⁷⁵. L'efficacité de plusieurs produits d'ingénierie cellulaire (micrograisse, FVS, concentrés plaquettaires) a été évaluée dans ce modèle. Les résultats montrent que toutes ces stratégies thérapeutiques possèdent un potentiel antifibrotique. De façon intéressante, l'administration de FVS conduisait localement à une augmentation significative de la vascularisation.

2.3.4. Potentiel thérapeutique de la FVS dans la ScS

L'utilisation en clinique de la FVS voit le jour en 2007 dans le cadre de reconstruction mammaire chez des patientes traitées par radiothérapie pour un cancer du sein⁴⁷⁶. Les avantages de la FVS sont nombreux : pléiotropie d'effets, caractère autologue, accessibilité du TA, richesse en cellules souches, faible délai d'obtention (quelques heures) et absence d'expansion *in vitro*. L'ensemble de ses atouts a conduit à l'évaluation de la FVS dans un très grand nombre d'indications cliniques. Cependant, les résultats disponibles se limitent majoritairement à des séries de cas ou des essais de phase précoce.

Le premier essai évaluant l'intérêt de la FVS dans la ScS a été réalisé par notre équipe. En raison d'un risque important d'ischémie lié à l'injection de TA dans les doigts, nous avons émis l'hypothèse que l'effet trophique lié à l'injection de cellules de la FVS serait bénéfique dans la prise en charge globale du handicap de la main sclérodermique. Ainsi, l'essai SCLERADEC, réalisé en 2013, était la première étude évaluant l'administration locale de la FVS autologue dans la prise en charge du handicap fonctionnel de la main de patients atteints de ScS⁴⁷⁷. L'objectif de cet essai était d'évaluer la tolérance et l'effet de l'injection sous-cutanée de FVS préparée de façon automatisée avec le dispositif Celution® 800/CRS (Cytori Therapeutics) au niveau des doigts des patients.

Douze patientes sclérodermiques avec un handicap de la main (score fonctionnel de la main de Cochin supérieur à 20/90) ont été incluses dans cet essai de phase I, monocentrique. Le TA récolté était directement transféré en circuit fermé dans un sac de recueil stérile et immédiatement transporté dans l'unité de thérapie cellulaire autorisée pour la production de FVS. Après environ 3 heures de production, les patientes recevaient dans les deux faces latérales de chaque doigt 0,5 ml de FVS. Quatre événements mineurs liés à la procédure ont été rapportés : deux ecchymoses abdominales, une paresthésie transitoire sur le côté d'un doigt et une douleur située sur le côté latéral du pouce gauche. Tous ces événements indésirables étaient transitoires et ont guéri spontanément. De plus, aucune complication ischémique ou infectieuse n'a été observée.

Les résultats ont été très encourageants avec une amélioration significative du score fonctionnel de Cochin, du score de Raynaud, du *Scleroderma Health Assessment Questionnaire* (SHAQ) à 6 mois ainsi qu'une réduction du nombre d'ulcères à 12 mois⁴⁷⁸. Aucune corrélation entre les caractéristiques de la FVS et l'efficacité clinique n'a été mise en évidence. L'évaluation à 24 mois montre un bénéfice durable de la FVS sur les différents paramètres analysés (Figure 28)⁴⁷⁹.

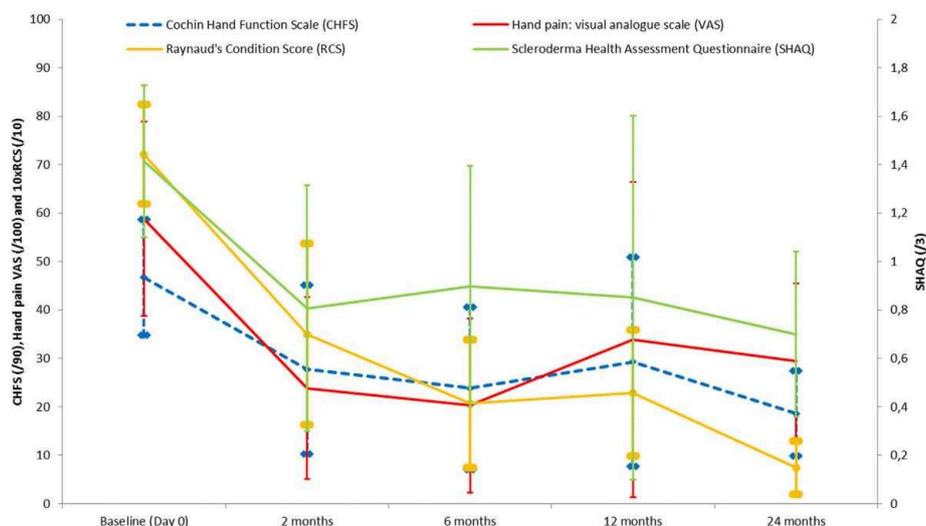


Figure 28: Résultats de l'essai SCLERADEC évaluant l'injection de FVS autologue au niveau des doigts des patients sclérodermiques d'après Daumas *et al.*⁴⁷⁹

En 2020, Park *et al.* ont conduit un essai ouvert évaluant l'efficacité et la sécurité d'une administration de FVS dans les doigts chez 20 patients sclérodermiques⁴⁸⁰. Les FVS étaient produites par digestion enzymatique de façon automatisée en système clos (SmartX®, DONGKOO). Les résultats à 24 mois montrent une excellente tolérance de l'approche ainsi qu'une amélioration significative de la fibrose cutanée, des œdèmes au niveau des mains et de la qualité de vie. De plus, environ un tiers des ulcères digitaux étaient guéris.

Les résultats prometteurs de ces premiers essais ont conduit au développement de deux essais multicentriques randomisés contrôlés *versus* placebo afin de valider l'efficacité de l'injection de FVS dans le handicap fonctionnel des mains chez les patients sclérodermiques :

- l'essai américain STAR
- l'essai français SCLERADEC II

L'essai STAR, réalisé aux Etats-Unis et dont le promoteur était la société Cytori Therapeutics a recruté et évalué 88 patients atteints de ScS : 51 atteints de forme cutanée diffuse et 37 atteints de forme cutanée limitée. L'objectif principal de l'étude (amélioration du handicap de la main évaluée par le score de Cochin), n'a pas été atteint à 24 ou 48 semaines⁴⁸¹. Cependant, l'analyse en sous-groupes des patients atteints de forme cutanée diffuse montrait des améliorations significatives du score de Cochin et de l'indice d'évaluation du handicap : *Health Assessment Questionnaire–Disability Index* (HAQ-DI), paramètre secondaire évaluant l'incapacité fonctionnelle des patients.

L'essai SCLERADEC II, dont l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille était promoteur, a inclus une cohorte de 40 patients (20 patients traités par FVS selon la procédure décrite dans SCLERADEC et 20 patients par le placebo). Trois centres participaient à cette étude : Marseille, Rouen et Paris et le critère principal de jugement était l'amélioration du score de Cochin à trois mois. Les résultats montrent que le score fonctionnel de la main s'est amélioré dans les deux groupes, sans différence significative entre les deux groupes à 3 mois et à 6 mois⁴⁸² (Figure 29).

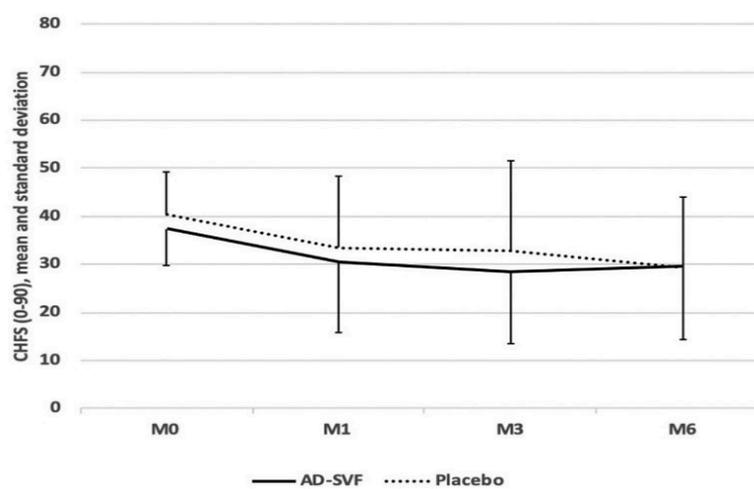


Figure 29 : Evolution du score de la main de Cochin (*Cochin Hand Function Scale* : CHFS) au cours de l'essai SCLERADEC II d'après Daumas *et al.*⁴⁸²

Dans un objectif de standardisation de la libération des lots de FVS, une étude rétrospective réalisée sur près de 400 lots de FVS de grade clinique a identifié plusieurs critères essentiels⁴³⁴ :

- une viabilité de la FVS fraîche égale ou supérieure à 80%
- un rendement cellulaire après extraction d'au moins $1,50 \times 10^5$ cellules nucléées viables/ml de TA net collecté
- une proportion d'ASC dans le produit final doit être au moins égale à 20%
- une proportion de leucocytes dans le produit final inférieure à 50%
- la stérilité du produit injecté contenant la FVS

L'établissement de ces critères de libération pour la FVS vise à standardiser la qualité des produits délivrés ainsi qu'à faciliter la comparaison des essais. Ceci conduira, à terme, à une validation accélérée des indications pertinentes quant à l'efficacité de FVS.

2.4. Impact de la ScS sur les progéniteurs endothéliaux et mésenchymateux

2.4.1. Impact sur les progéniteurs endothéliaux circulants

Les altérations quantitatives et/ou fonctionnelles des Progéniteurs Endothéliaux Circulants (PEC) au cours de la ScS restent à ce jour débattues. Des premières études ont identifié une baisse du nombre de PEC chez les patients sclérodermiques^{483–487} alors que d'autres ont décrit à l'inverse un recrutement de PEC en réponse aux dommages vasculaires dans les stades précoces et actifs de la maladie^{42,488,489}.

Ces conclusions contradictoires sont le résultat d'une incapacité à définir une population unique de PEC mais également de la forte hétérogénéité des formes cliniques de ScS. Le Tableau 9 ci-dessous récapitule les variations quantitatives (recrutement ou réduction) de PEC au cours de la ScS et les potentielles manifestations cliniques associées.

Surface markers detected by FACS analysis	Alterations in EPC number	Association with SSc clinical features
CD34+/CD133+/VEGFR2+	Decreased	Active digital ulcers and pitting scars
CD34+/CD133+	Increased in the early phase, decreased in the late phase	None
CD34+/CD133+/VEGFR2+	Increased in the early phase, decreased in the late phase	None
CD34+/CD133+	Increased	European disease activity score
CD34+/CD133+; CD34+/CD133+/VEGFR2+ CD34+/VEGFR2+	Decreased	None
CD34+/VEGFR2+ CD133+/VEGFR2+	Increased in the early phase, decreased in the late phase	Severity of peripheral vascular manifestations in the early, severe organ involvement in the late
CD34+/VEGFR2+ CD133+/VEGFR2+	Decreased	None
Lin-/7AAD/CD34+/CD133+/VEGFR2+	Increased	Inverse correlation with Medsger's severity score and Digital Ulcers
CD34+/CD133+/VEGFR2+ CD34+/VEGFR2+ CD133+/VEGFR2+	Decreased	None
CD133+/VEGFR2+	Decreased	ND

Tableau 9: Vue d'ensemble des variations quantitatives de progéniteurs endothéliaux circulants décrites au cours de la ScS d'après Del Papa et Pignataro⁴⁹⁰

Dans ce contexte, le groupe de travail de l'EUSTAR a proposé des recommandations pour l'expansion *in vitro* et la quantification des PEC dans le contexte de la ScS⁴⁹¹. Les principales conclusions de ce travail sont rapportées dans le Tableau 10 ci-dessous :

Key recommendations for research on EPCs	
General issues	<ul style="list-style-type: none"> • Detailed described of the methods and materials used • Detailed summary of cardiovascular risk factors and medications
FACS issues	<ul style="list-style-type: none"> • Determination of CD133, VEGFR2 and CD34 in combination with a viability marker in a multiparameter flow cytometer • Collection of a large number of events • Blockade of Fc receptors • Experienced investigator
Culture issues	<ul style="list-style-type: none"> • Use of EGM-2 medium • Coating with laminin and type IV collagen • Confirmation of the phenotype at the end of the culture period

Tableau 10 : Recommandations pour l'étude des progéniteurs endothéliaux circulants dans la ScS d'après Distler *et al.*⁴⁹¹

Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que, malgré un profil phénotypique inchangé, les PEC isolés chez des patients atteints de ScS présentaient une capacité altérée de différenciation en cellules endothéliales matures^{483,492}. De plus, Kuwana *et al.* rapportent une capacité de néovascularisation réduite des PEC CD133+ de patients sclérodermiques dans un modèle *in vivo* de vascularisation tumorale⁴⁹³. Aussi, Zhu *et al.* ont mis en évidence un apoptose accrue des PEC isolés chez des patients sclérodermiques médiée par les immunoglobulines, suggérant une destruction possible de ces cellules par les Ac sériques anti-cellules endothéliales⁴⁸⁵.

Certaines voies moléculaires sont dérégulées dans les PEC au cours de la ScS. Par exemple, la Pentraxine 3 (PTX3) est une autre molécule impliquée dans la dérégulation des PEC au cours de la ScS. En effet, cette protéine induite par des médiateurs inflammatoires joue également un rôle dans le remodelage tissulaire et les processus angiogéniques. Les niveaux plasmatiques de PTX3 sont significativement plus élevés chez des patients atteints de ScS et négativement corrélés aux taux de PEC. De façon intéressante, les taux de PTX3 étaient corrélés à des manifestations vasculaires telles que des UD et une hypertension pulmonaire⁴⁹⁴. De même, notre équipe a identifié une corrélation positive entre la fractalkine soluble et les taux de PEC CD45- CD34+⁴². Ces observations suggèrent un rôle potentiel de PTX3 et la fractalkine soluble dans la régulation de l'homéostasie vasculaire dans la ScS.

Enfin, des études sur les cellules endothéliales matures dérivées de PEC de patients atteints de ScS ont révélé que, comparativement aux cellules endothéliales microvasculaires dermiques d'individus témoins, ces cellules présentent des altérations dans l'expression des principaux régulateurs de l'intégrité vasculaire et de l'angiogenèse tels que l'*Epidermal Growth Factor-Like domain 7* (EGFL7), la neuropiline-1 (co-récepteur au VEGF) et le facteur de transcription Fli1^{192,495}.

2.4.2. Impact sur les progéniteurs mésenchymateux

2.4.2.1. CSM de la moelle osseuse

L'impact de la ScS sur les CSM a d'abord été étudié sur les CSM issues de la MO (CSM-MO). Le phénotype, la capacité clonogénique (évaluée par un test *in vitro* CFU-F) et le potentiel de différenciation en adipocytes et ostéoblastes des CSM-MO de patients sclérodermiques ne semblent pas impactés par la ScS⁴⁹⁶⁻⁴⁹⁸. De plus, malgré une sénescence précoce, les CSM-MO issus de patients atteints de ScS maintiennent un fort potentiel immunomodulateur et une capacité normale à recruter des LyTreg^{496,499,500}, confirmant les résultats de Bocelli-Tyndall sur les CSM issues de patients atteints d'autres maladies auto-immunes⁵⁰¹.

Cependant, leur capacité de différenciation en cellules endothéliales semble altérée *in vitro* dans des conditions de culture adaptées⁴⁹⁷, questionnant leur implication dans la vasculopathie sclérodermique. Comme déjà discuté dans la première partie de ce travail, une altération du *crossstalk* entre cellules endothéliales et cellules périvasculaires a été mise en évidence⁷². En effet, les marqueurs de fibrose (TGF β et α SMA) des CSM-MO (saines ou pathologiques) sont surexprimés au contact de cellules endothéliales de patients sclérodermiques dans des modèles de co-cultures *in vitro*.

L'analyse de la voie du TGF β dans les CSM-MO patients atteints de ScS montre une surexpression du récepteur de type II au TGF β (TGF β RII)⁵⁰². Ces résultats sont confortés par une autre étude qui met en évidence une redistribution du TGF β RII en surface au niveau des jonctions cellulaires en réponse à des stimuli comme le VEGF ou le SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor-1*)⁴⁹⁸. De même, les CSM-MO isolées de patients atteints de ScS présentent une surexpression de l' α SMA, témoin de l'acquisition d'un phénotype contractile⁵⁰³. De plus, au cours de la ScS, le TGF β semble interférer avec les effets PDGF-BB-induits tels que la migration et l'invasion. En effet, les CSM-MO seraient plus à même d'acquérir un phénotype myofibroblastique (TGF β -induit), à l'origine d'une altération de leur capacité à stabiliser les vaisseaux en réponse au PDGF-BB. Néanmoins, cette même étude montre qu'après co-culture avec des cellules endothéliales, les CSM-MO de patients reversent leur phénotype contractile et s'orientent vers un comportement pro-angiogénique. Ceci conforte la plasticité des CSM en réponse à des stimuli environnementaux, et ce malgré le contexte sclérodermique.

De plus, le potentiel paracrine des CSM-MO a été évalué en contexte sclérodermique. L'expression basale du SDF-1 et du VEGF, molécules pro-angiogéniques, était significativement plus élevée dans les CSM-MO de patients sclérodermiques comparativement à des CSM-MO de donneurs sains⁴⁹⁸. Aussi, le milieu conditionné de CSM-MO de patients atteints de ScS présente un effet pro-angiogénique supérieur à celui de cellules saines. Des expériences utilisant des anticorps bloquants certaines cytokines sécrétées par les CSM suggèrent que l'effet pro-angiogénique observé reposait principalement sur des mécanismes paracrines.

Dans un objectif de validation d'approches allogéniques par administration de CSM-MO, Fonteneau *et al.* ont récemment étudié l'impact de sérums de patients sur les propriétés de CSM-MO saines⁵⁰⁴. Les niveaux élevés en molécules oxydantes présentes dans les sérums de patients sclérodermiques ont conduit à une sénescence et une apoptose accrues des CSM dans les jours suivant l'exposition. De plus, leur capacité immunosuppressive était légèrement réduite. Cependant, la capacité antioxydante des CSM-MO était augmentée, notamment grâce à l'*up-regulation* du gène antioxydant SOD2. En lien avec cette étude, l'exposition d'ASC issues de donneurs sains à des sérums de patients sclérodermiques conduisait à l'acquisition d'un profil myofibroblastique caractérisé par une augmentation d'expression des marqueurs de fibrose (α SMA, collagène de type 1) et des capacités contractiles⁵⁰⁵.

2.4.2.2. CSM du tissu adipeux

L'étude de l'impact du contexte sclérodermique sur les CSM du TA, encore appelées en anglais *Adipose-derived Stromal/stem Cells* (ASC) est plus récente. En 2013, Scuderi *et al.* rapportent un phénotype et une capacité de différenciation en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes des ASC de patients atteints de ScS similaires aux ASC saines⁵⁰⁶. Ces résultats sont confortés par les résultats de Griffin *et al.* en 2017⁵⁰⁷. Néanmoins, le taux de prolifération, la capacité de migration et d'invasion des ASC de patients sclérodermiques étaient significativement réduits⁵⁰⁷. Une étude comparant les profils phénotypiques d'ASC issues de patients atteints de différentes pathologies inflammatoires met en évidence une augmentation d'ASC co-exprimant deux molécules d'adhésion : *InterCellular Adhesion Molecule* (ICAM) et VCAM chez les patients sclérodermiques comparativement aux ASC saines et aux ASC issues de patients atteints de lupus érythémateux disséminé ou encore de spondylarthrite ankylosante⁵⁰⁸.

Bien que les capacités de différenciation en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes des CSM semblent maintenues en contexte sclérodermique, certaines anomalies de différenciation des ASC ont été mises en évidence (maturation incomplète des cellules adipo-progénitrices et ostéoprogénitrices)⁴²⁷.

Plus récemment, une étude s'est intéressée aux propriétés immunosuppressives et angiogéniques ASC de patients sclérodermiques⁵⁰⁹. L'analyse des tests d'inhibition de la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique ne rapporte pas de différence significative entre les ASC des patients sclérodermiques et ceux de témoins sains, en faveur du maintien du potentiel immunomodulateur des ASC. Dans cette même étude, la capacité de cellules endothéliales saines et sclérodermiques à former des structures pseudo-tubulaire en Matrigel® était significativement augmentée après co-culture avec des ASC sclérodermiques. De plus, cet effet était significativement plus important en conditions d'hypoxie. Les auteurs de ces études considéraient ces résultats encourageants quant à la possibilité d'utiliser des approches autologues avec les ASC en contexte sclérodermique.

Ces résultats sont à mettre en regard de ceux publiés par Virzì *et al.*⁴²⁷, dont une étude *in vitro* sur les ASC a été réalisée en parallèle de leur étude clinique sur l'utilisation combinée de

PRP et de TA dans la prise en charge du handicap du visage chez les patients sclérodermiques. Les auteurs rapportent une désorganisation nette du TA prélevé chez les patients sclérodermiques. Ils montrent également une modification des marqueurs de surface avec notamment une expression significativement plus faible du CD271, marqueur spécifique des CSM, dans la FVS de patients ScS par rapport à celle de donneurs sains.

Le rôle central de certaines protéines dans l'impact de ScS sur les propriétés des ASC a été mis en évidence. Par exemple, une réduction d'expression de la cavéoline 1 (régulateur de la fonction et du *turnover* des kinases dans plusieurs voies cellulaires) dans les ASC de patients sclérodermiques est associée à un phénotype plus fibrosant⁵¹⁰. En effet, le traitement d'ASC saines par des siRNA ciblant la cavéoline 1 conduit à la surexpression de marqueurs de fibrose.

Enfin, une étude récente caractérise les profils d'expression des microARN (miRs) des CSM de MO et de TA en contexte sclérodermique⁵¹¹. Ces résultats montrent des dérégulations d'expression respectivement de 10 et 14 miRs respectivement pour les CSM-MO et ASC issues de patients sclérodermiques. De façon intéressante, quelle que soit la source de CSM (MO ou TA), les miRs atteints sont impliqués dans la régulation des mécanismes de sénescence et de fibrose. Ces travaux ouvrent la voie à une étude plus approfondie sur les miRs pour déterminer dans quelle mesure ils sont impliqués dans la pathogénie de la maladie ou comment ils pourraient être utilisés comme des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques pertinents.

PARTIE 2 : REVUE DE LA LITTERATURE

**Combining systemic and locally applied cellular therapies
for the treatment of systemic sclerosis**

Mélanie Velier, Aurélie Daumas, Stéphanie Simoncini, Robin Arcani, Jérémy Magalon, Audrey Benyamine, Brigitte Granel, Françoise Dignat-George, Christian Chabannon, Florence Sabatier

Bone Marrow Transplantation, Octobre 2021

Les thérapies conventionnelles pour la prise en charge de la ScS reposent actuellement l'association de médicaments immunomodulateurs et de traitements symptomatiques. Malgré l'essor de nouvelles biothérapies, la ScS reste associée à une importante morbidité et une altération significative de la qualité de vie. Dans ce contexte, les approches de thérapie cellulaire représentent une alternative intéressante avec l'ambition d'agir sur le trépied physiopathologie de la maladie : le système immunitaire, la vasculopathie et les processus fibrotiques.

Cette partie présente une revue des différentes approches de thérapie cellulaire validées ou à l'étude dans la prise en charge de la ScS. Elle questionne l'intérêt de combiner des approches systémiques à visée immunomodulatrice à des approches locales, principalement dérivées du TA destinées à la régénération tissulaire.

REVIEW ARTICLE



Combining systemic and locally applied cellular therapies for the treatment of systemic sclerosis

Mélanie Velier^{1,2}✉, Aurélie Dumas^{1,3}, Stéphanie Simoncini¹, Robin Arcani^{1,3}, Jérémy Magalon^{1,2}, Audrey Benyamine^{1,4}, Brigitte Granel^{1,4}, Françoise Dignat George¹, Christian Chabannon^{1,5} and Florence Sabatier^{1,2}

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2021

Systemic sclerosis (SSc) is a complex autoimmune disease characterized by a functional and structural alteration of the microvascular network associated with cutaneous and visceral fibrosis lesions. Conventional therapies are based on the use of immunomodulatory molecules and symptomatic management but often prove to be insufficient, particularly for patients suffering from severe and rapidly progressive forms of the disease. In this context, cellular therapy approaches could represent a credible solution with the goal to act on the different components of the disease: the immune system, the vascular system and the extracellular matrix. The purpose of this review is to provide an overview of the cellular therapies available for the management of SSc. The first part will focus on systemically injected therapies, whose primary effect is based on immunomodulatory properties and immune system resetting, including autologous hematopoietic stem cell transplantation and intravenous injection of mesenchymal stem cells. The second part will discuss locally administered regenerative cell therapies, mainly derived from adipose tissue, developed for the management of local complications as hand and face disabilities.

Bone Marrow Transplantation; <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01492-7>

INTRODUCTION

Systemic Sclerosis (SSc) is a rare systemic Autoimmune Disease (AID) characterized by vasculopathy and progressive fibrosis affecting diverse tissues and organs. These processes interact and result in a heterogeneous association of clinical manifestations [1]. Despite recent advances, existing pharmacological treatments largely remain inefficient at reversing and stopping the evolution of the lesions. In this context, innovative cell-based therapies are currently being developed with the hope of long-term efficacy and improved safety profiles. Various cellular approaches have emerged using local or systemic administrations, in order to target both the immune dysregulation underlying SSc and local manifestations of the disease, mainly oro-facial and hand impairments (Fig. 1). The purpose of this review is to provide an overview of the cellular therapies available in the management of SSc.

SYSTEMIC CELLULAR THERAPIES

Autologous hematopoietic stem cells transplantation

In the past few decades, the main breakthrough in the SSc field has been the use of autologous Hematopoietic Stem Cells Transplantation (auto-HSCT), the only therapeutic intervention that has demonstrated a significant benefit on the overall survival of patients suffering from severe forms of SSc. The first data came from retrospective studies on which we could note a benefit of this intervention on the evolution of SSc in patients [2–5]. Subsequently, randomized clinical trials in severe forms of SSc

have shown a significant superiority of the autograft procedure compared to conventional therapies. Since then, more than 4000 auto-HSCT procedures have been performed worldwide to treat patients with severe AID [6]. A review of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) states that more than 3000 patients with severe AID were treated with auto-HSCT, in which approximately 650 had SSc [7]. Currently, auto-HSCT represents an integral and standard of care part of the treatment for severe forms of SSc [8, 9]. Auto-HSCT is a multi-step procedure: the collection and cryopreservation of the patient's hematopoietic stem cells, the treatment of the patient with an immunoablative conditioning regimen and then the infusion of thawed hematopoietic stem cells. The therapeutic rationale for treating AID such as SSc by auto-HSCT is based on a non-specific abrogation of auto-reactivity ("immunological reset"), followed by the reconstitution of a "naive", more tolerant immune system [10, 11]. Some studies suggest a broad spectrum of action for auto-HSCT, in contrast with conventional immunomodulatory agents that specifically target defined mechanisms of immunity [12, 13].

Clinical trials

ASSIST: The ASSIST trial was the first randomized clinical trial to assess the efficacy of auto-HSCT (unmanipulated graft) after a non-myeloablative conditioning in SSc [14]. This is an open, phase II, monocentric trial in 19 patients with diffuse forms of SSc. The control arm consists of the intravenous injection of cyclophosphamide (Cy) once a month for 6 months. All ten patients

¹C2VN, Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, Marseille, France. ²Laboratoire de Culture et Thérapie Cellulaire, Hôpital de la Conception, AP-HM, INSERM CIC BT 1409, Marseille, France. ³Service de Médecine Interne, Gériatrie et Thérapeutique, Hôpital La Timone, AP-HM, Marseille, France. ⁴Service de Médecine Interne, Hôpital Nord, pôle MICA, AP-HM, Marseille, France. ⁵Centre de Thérapie Cellulaire et INSERM CIC BT-1409, Institut Paoli-Calmettes Comprehensive Cancer Center, Marseille, France. ✉email: melanie.velier@ap-hm.fr

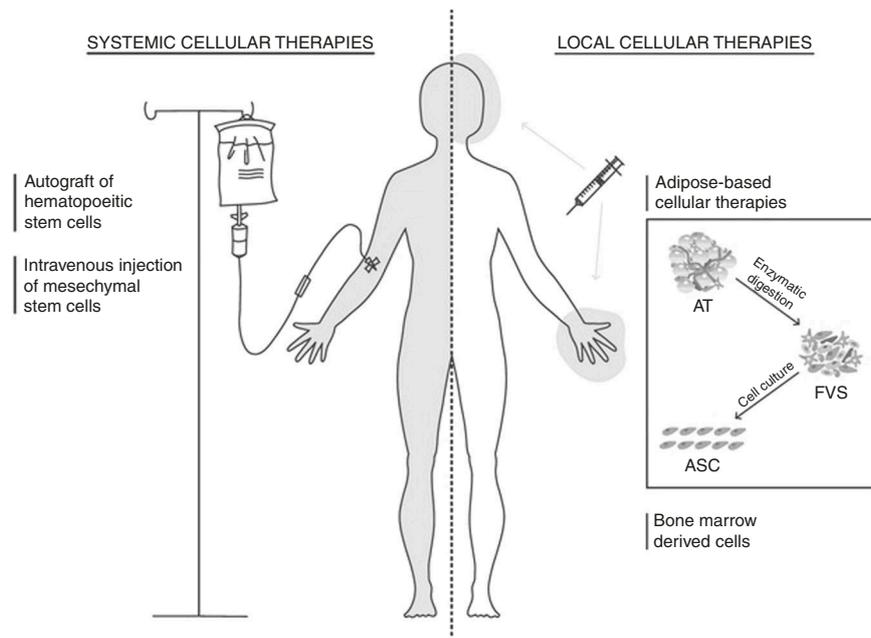


Fig. 1 Overview of the cell-based therapies available for the management of SSc. Cellular therapies using systemic administrations include autograft of hematopoietic stem cells and intravenous injection of mesenchymal stem cells. The two main approaches of local cellular therapies in SSc are adipose-based cellular therapies (AT adipose tissue, SVF stromal vascular fraction and ASC adipose-derived stromal/stem cells) and bone marrow derived cells.

allocated to receive auto-HSCT improved at 12 months' follow-up, compared with none of nine allocated to cyclophosphamide. The results showed a significant improvement at 2 years of the Forced Vital Capacity (FVC) and a reduction in the modified *Rodnan* Skin Score (mRSS) in autografted patients.

ASTIS: The ASTIS trial is a randomized, phase III, multicenter and open-label study that included 156 patients with early forms of diffuse SSc [15]. The patients were randomly divided into two groups: a first group of 79 patients treated by transplantation of autologous immunoselected CD34+ cells following non-myeloablative conditioning (a total of 200 mg/kg Cy intravenously over 4 consecutive days and rabbit anti-lymphocyte serum) and a second group of 77 patients treated with monthly intravenous injections of Cy (750 mg/m²) for 1 year. The results revealed a significant benefit of the auto-HSCT procedure on the primary endpoint (event-free survival at two years) and on overall survival, despite a higher treatment-related mortality (TRM) of the control arm during the first year post transplant. Besides, the autograft procedure has been shown to be more effective in improving skin scores, quality of life and lung function, particularly in patients who have never smoked.

SCOT: This open-label, multicenter, randomized clinical trial compared auto-HSCT versus Cy in 75 scleroderma patients suffering from diffuse and recent forms of pulmonary and renal disease [16]. The two therapeutic approaches were: (i) a major myeloablation (Cy, equine SAL and total body irradiation) followed by a graft of autologous CD34+ sorted cells ($n = 36$), (ii) a monthly high-dose of Cy (1 dose 500 mg/m² then 11 doses of 750 mg/m²) intravenously ($n = 39$). The main criterion was a composite score called GRCs for Global Rank Composite Score, evaluated at 54 months post-randomization, reflecting how participants position themselves relative to each other.

The results showed a significant superiority of the auto-HSCT strategy at 54 months. Among the 75 participants, 14 died during the study: 3 in the auto-HSCT group and 11 in the Cy group. Analysis of the Kaplan–Meier curves reveals that the survival

curves of the two groups separate around 2 years post-randomization.

Regarding the risk of infection associated with the protocols, the infection rate per person per year (all grades combined) was similar between the two groups; but the occurrence of infections of at least grade 3 is greater in the transplant group. Altogether, these results indicate that the autograft procedure induces more risks in the short term but allows better disease control than conventional Cy treatment in the long-term.

The differences observed between these three clinical trials can partly be explained by the criteria for inclusion of patients in the different trials. None of the participants in the SCOT trial had heart disease or pulmonary arterial hypertension and the proportion of smokers was lower than in the ASTIS trial. Furthermore, only the SCOT trial included total body irradiation in the conditioning regimen. These unconventional modalities are difficult to implement on a large scale and at multiple sites in real-world conditions, in particular in patients with pre-existing pulmonary defects.

Challenges

Better patient screening: Applying auto-HSCT to AID in real-world conditions involves combining the use of a relatively old therapy with innovative indications targeting new patient population suffering from severe AID characterized by an important clinical heterogeneity and morbidity cofactors.

TRM varies depending on a number of factors including the severity of the disease and the intensity of the conditioning regimen, highlighting the importance of patient selection through rigorous screening. Nevertheless, higher TRM has been attributed mainly to SSc-related cardiac dysfunction and the most recent multicenter EBMT Autoimmune Disease Working Party study reported a reduction of TRM to 6% [17] through the improvement of the cardiopulmonary screening measures [18] and better experience in transplant procedures [19]. Heterogeneity between studies precludes a clear conclusion but a trend toward a better outcome was observed in patients with shorter disease duration.

Besides, a systematic follow-up in an expert center makes it possible to assess the response to treatment and to detect early potential complications.

Optimization of the therapeutic protocol: The conditioning regimen is largely responsible for toxicities. Indeed, the randomized phase III trials have been very successful in terms of efficacy but revealed a significant conditioning regimen-related mortality. Of note, the allogeneic HSCT approach assessed in some case reports a decade ago was abandoned due to severe alloreactivity toxicities [20, 21]. There is no definitive consensus on the conditioning protocol; most described regimen derive from the ASTIS trial. Further improvements are under way; the ASSIST IIb study is comparing the conditioning regimen carried out in ASSIST with a reduced intensity (respectively 200 mg/kg/day of Cy versus 120 mg/kg/day). Whether *ex vivo* immunomagnetic selection of CD34+ cells from the collected cell product – such as used in the SCOT and ASTIS trials – can further improve transplant outcome through depletion of self-reactive T cells remains debated. A retrospective study from the EBMT Autoimmune Disease Working Party revealed no significant difference in terms of efficacy and safety, whether or not CD34+ cell selection was included in the transplant protocol for this particular disease [22]. Conversely, a prospective non-interventional study from the EBMT ADWP showed a superior response in patients with CD34+ selection [17]. In another setting, a randomized trial in 33 patients with severe rheumatoid arthritis showed no advantage associated with CD34+ cell selection [23].

Immunomonitoring and biobanks: Finally, better harmonized criteria and scores are needed to allow more objective assessments of response and improve comparisons across studies. These include not only clinical evaluations, but also biomarkers and imaging. Defining relevant biological monitoring in this context must rely on prospective validation studies and thus access to properly annotated samples obtained from patients pre- and post-transplant. In line with this, the EBMT provided guidelines for biobanking and laboratory immune monitoring in patients suffering from AID undergoing auto-HSCT [24].

Intravenous injection of MSC

Mesenchymal Stromal/Stem cells (MSC) are multipotent non-hematopoietic progenitors, originally described as supportive cells within the bone marrow, and widely studied since then [25].

Although initially studied for their pluripotency, the growing interest in MSC mainly resides in their paracrine effect. Indeed, MSC secrete many bioactive molecules (cytokines, growth factors) [26–28] and produce extracellular vesicles (ECVs) able to deliver mRNA, miRNA and proteins [29] with a recognized role in MSC-induced tissue protection and regeneration.

Thanks to their immunomodulatory, trophic and pro-angiogenic potential, MSC are developed in many clinical directions and represent potential candidates to counteract some of the pathological mechanisms that associate with SSc evolution.

MSC express low levels of Human Leukocyte Antigen II (HLA-II) [30], allowing both autologous and allogeneic use. However the possibility that the functional properties of MSC isolated from SSc patients, a systemic disease, could be altered is under debate and contradictory results are reported in the literature [31].

The clinical use of intravenous bone marrow-derived MSC in SSc was initially described in two case reports and a series of cases for a total of 7 patients (6 allogeneic and 1 autologous transplants) showing promising results [32–34]. A retrospective study focusing on safety looked at more than 400 patients with AID who received systemic MSCs between 2007 and 2016, and showed excellent tolerance [35]; the 0.2% TRM in this study must be compared with the 3% non-relapse mortality reported for auto HSCT applied to AID in the EBMT registry [19]. Two small size clinical trials

evaluating the systemic injection of allogeneic MSC in patients with SSc have been reported: a trial carried out in China combining plasmapheresis and allogeneic MSC infusion suggested an improvement of the mRSS at 12 months follow-up [36]; another trial is underway in France (NCT02213705).

LOCAL CELLULAR THERAPIES

Bone marrow and peripheral blood derived cells

In four uncontrolled trials that enrolled small cohorts of SSc patients (for a total of 24 patients), intramuscular injections of bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) mononuclear cells (MNC) were assessed in refractory skin ulcer [37–40]. All studies suggest interesting results, notably on neovascularization processes without major adverse events.

Moreover, a double-blind, randomized, placebo-controlled trial named MANUS (Mesenchymal stromal cells for Angiogenesis and Neovascularization in digital Ulcers of Systemic Sclerosis) evaluating the intramuscular injection of allogeneic bone marrow MSC in digital ulcers is underway in 20 scleroderma patients [41]. MSC (50×10^6 cells) will be distributed into 8 injection sites in the palm, back of the hand and forearm. The primary endpoint is toxicity at 12 weeks post-injection and the secondary endpoints are time to healing of digital ulcers, hand disability, quality of life and disease activity. Patients will be followed up to 52 weeks after the procedure.

Adipose-derived cellular therapies

The development of innovative therapies administrated locally for the management of hand or face disabilities is essential for SSc patients. The evidence that AT contains stem/progenitor cells has completely revolutionized the field of regenerative medicine. Indeed, initially used for its volumizing effect, AT has been identified as an advantageous source of cells with tissue repair capacity. Consequently, various modalities of local adipose-derived cellular therapies have been tested in SSc and some of them have shown encouraging results.

Adipose tissue. Autologous AT transplantation, also known as lipofilling, is one of the most widely used procedures in plastic surgery. The widespread use of this approach has highlighted additional properties beyond the volumizing effect, in particular trophic properties. This trophicity was then attributed to multipotent stem cells within the AT discovered in 2001 by Zuk et al. [42]. In this pioneering study, they demonstrated that AT contains a high frequency of adipose stromal/stem cells (ASC) whose properties were similar to that of MSC described in the bone marrow.

Hand disabilities. The first application of purified AT in SSc dates back to 2014 when 13 patients suffering from refractory Raynaud's syndrome, including 9 women with scleroderma, were reinjected into the hands with autologous fat tissue [43]. The procedure was well tolerated, significantly reduced the pain and severity of cold-induced crises, and promoted healing of digital ulcers. The efficacy of autologous injection of purified AT in refractory digital ulcers affecting patients with scleroderma was confirmed in another study [44]; healing of the ulcer was observed in all patients and no ulcer recurred. Subsequently, a randomized placebo-controlled trial conducted by the same team confirmed the efficacy and safety of this procedure with an 8-week healing of ulcers in 23 out of the 25 patients who received the AT versus 1/13 in the placebo group [45]. A recent open label study reported the efficacy and safety of successive autologous fat grafting (AFG) for the treatment of mouth and hand complications in 25 SSc patients [46]. The new approach included 3 successive procedures every 6 months. Finally, the first randomized controlled trial named "Sys-stem" is ongoing [47] and will assess AFG for oro-facial involvement in 50 SSc patients.

Facial manifestations. Facial involvement during SSc, including telangiectasia, limitation of the mouth opening, dry syndrome, is very frequent and significantly impacts patient's quality of life. The injection of purified AT was first evaluated in the perioral region in 20 patients suffering from diffuse forms of SSc. A significant improvement in the opening of the mouth and in the neovascularization of the skin (objectified by capillaroscopy and vascular density) were reported [48]. In 2016, Sautereau et al. have protocolized a simple approach to reinject purified AT using a Puregraft® system (Puregraft, San Diego, California) in 14 patients [49]. An average decrease of 10.7 points in the Mouth Handicap in Systemic Sclerosis Scale (MHSS) score - the first mouth-specific disability outcome measure designed for SSc patients - was observed at 6 months and at the end of follow-up, 75% of patients were satisfied. These results were confirmed in another study which enrolled 16 patients suffering from facial sclerosis and limited mouth opening capacity [50].

More recently, a cohort of 62 SSc patients with oro-facial fibrosis was assessed before and after lipotransfer treatment, which revealed a significant improvement of the MHSS and of all psychological measures [51].

Stromal vascular fraction (SVF). The adipocytes only represent 40–60% of the AT, the other cells constituting the Stromal Vascular Fraction (SVF). The SVF can be isolated in a few hours by enzymatic digestion (collagenase) of AT followed by centrifugation to remove the adipocytes. The SVF is a heterogeneous mix of cells including two populations with known regenerative properties: ASC and endothelial progenitor cells, but also other cell types such as pericytes, macrophages and leukocytes. The use of SVF displays many advantages for cell-based therapy as SVF concentrates native, unexpanded adult stem cells in a minimally manipulated and easily accessible autologous cell product. In addition, the diversity of cell types within SVF is thought to facilitate a dynamic cross talk between cells that results in a synergistic and multifaceted effect on the biological processes needed for tissue repair including stimulation of angiogenesis, control of inflammation and limitation of fibrosis [52].

Because of a significant risk of ischemia linked to the injection of unprocessed AT in the fingers, our team has hypothesized that local injection of SVF cells could be beneficial in hand involvement of SSc patients. The phase 1, open monocentric SCLERADEC trial carried out in 2013, was the first study to evaluate the interest of autologous SVF in the management of functional handicap in the hand of 12 patients with SSc [53]. The results were encouraging, highlighting a significant improvement in the functional score of the Cochin hand, the Raynaud score, the Scleroderma Health Assessment Questionnaire (SHAQ) at 6 months and a reduction in the number of ulcers to 12 months. Interestingly improvements were maintained up to two years after the procedure [54]. Subsequently 2 multicentric randomized placebo-controlled trials were conducted to validate the effectiveness of local SVF injection to treat functional hand handicap in scleroderma patients: the American STAR trial and the French trial SCLERADEC II.

Adipose stromal/stem cells (ASC). ASC can be isolated and expanded by culturing the SVF, due to their ability to adhere to plastic and proliferate. They meet the same ISCT definition criteria as bone marrow MSC. However, their abundance and easy access from AT make them prime candidates for regenerative medicine in many clinical settings. The first study evaluating the local injection of ASC in scleroderma patients was carried out in Italy less than 10 years ago [55]. ASC were used in six patients suffering from localized scleroderma in different areas (face, limbs, feet...). The tolerance was excellent and patient-reported outcome rated clinical results as "satisfactory". The local progression of the disease was stopped in 100% of the cases, along with improve-

ment in skin suppleness, regression of dyschromia and erythema.

Another study compared the efficacy of expanded ASC with that of purified AT in the management of facial handicap for 10 patients suffering from perioral fibrosis and limitation of mouth opening [56]. Both procedures significantly and similarly improved MHSS and the maximum mouth opening capacity at one-year post-intervention.

The ADUSE phase II trial (Subcutaneous Injections of Autologous ASC to Heal Digital Ulcers in Patients With Scleroderma) is ongoing and aims to evaluate the injection of 40×10^6 ASC in thirty-two scleroderma patients presenting with refractory digital ulcers. The primary endpoint of this double-blind, randomized, multicentre and placebo-controlled trial is the proportion of active refractory ischemic digital ulcers that healed (complete or partial) without recurrence at 16 weeks post-injection.

New adipose tissue-derived approaches are being proposed in SSc such as nanofat grafting. It consists of a simple mechanical emulsification of adipose tissue to obtain a fluid and homogeneous suspension compatible with an administration in many areas, particularly in hands. Due to the absence of viable adipocytes, the volumetric effect of nanofat [57] is strongly limited while adipose tissue disaggregation favors the delivery of regenerative cells. Such strategy also opens avenues for combining different adipose-derived bioproducts in order to precisely adjust the regenerative approach according to indications.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Evidence is growing to support the use of auto-HSCT for severe or rapidly progressive forms of SSc. Results of various studies, including 3 randomized trials, are consistent and show a significant benefit of auto-HSCT on long-term survival when compared with intravenous Cy. Auto-HSCT is the only treatment to date that significantly reduces the morbidity and mortality of these patients and is currently a standard of care for severe forms of SSc, according to international treatment guidelines. Current challenges are to introduce refinements of protocols and adequate screening of the patients allowing to minimize TRM.

Another area of investigation is fast growing, looking at the clinical usefulness of locally applied cell therapies, with particular interest for the management of hand and facial manifestations. Adipose tissue is nowadays the most studied stem cell source due to its ease of access; multiple derived approaches are being developed with encouraging results. Phase II and III studies will be critical to confirm their safety and efficacy. In terms of manufacturing, current challenges are to improve standardization, define potency and design efficient and cost-effective protocols for these innovative local therapies. Expanded MSC/ASC and SVF are ATMP (Advanced Therapy Medicinal Products) as per CE regulation no. 1394/2007. All reported results in this review are based on Point-of-Care (POC) manufacturing of infused/injected grafts or somatic cellular medicinal products. Translation to central manufacturing by pharma companies is likely to result in high pricing, and will raise the question of the medical value and patient access to these treatments. Adoption will depend on the relative efficacy to improve quality of life and prolong survival. The field will draw from the accumulating experience in hematology and oncology where immune effector cells based therapies and other forms of gene therapies are introduced at an accelerated pace [58]. In the context of regenerative medicine, only one MSC-based ATMP has been approved so far: Alofisel (darvadstrocel) and is indicated for the treatment of perianal fistulas in Crohn disease.

In conclusion, both systemic and regional cell-based therapies offer new options to address the therapeutic needs of SSc patients. Combining these therapies represents an interesting avenue towards a global care of this complex and polymorphic disease.

REFERENCES

- Del Papa N, Zaccara E. From mechanisms of action to therapeutic application: a review on current therapeutic approaches and future directions in systemic sclerosis. *Best Pr Res Clin Rheumatol*. 2015;29:756–69.
- Binks M, Passweg JR, Furst D, McSweeney P, Sullivan K, Besenthal C, et al. Phase I/II trial of autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis: procedure related mortality and impact on skin disease. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:577–84.
- de Buys P, Khanna D, Furst DE. Hemopoietic stem cell transplantation in rheumatic diseases—an update. *Autoimmun Rev*. 2005;4:442–9.
- Shouval R, Furie N, Raanani P, Nagler A, Gafter-Gvili A. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2018;24:937–44.
- Del Papa N, Pignataro F, Zaccara E, Maglione W, Minniti A. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for treatment of systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2018;9:2390.
- Pugnet G, Castilla-Llorente C, Puyade M, Terriou L, Badoglio M, Deligny C, et al. Indications et suivi des autogreffes de cellules souches hématopoïétiques dans les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires: recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer*. 2017;104:S169–S180.
- Alexander T, Greco R, Snowden JA. Hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disease. *Annu Rev Med*. 2021;72:215–28.
- Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76:1327–39.
- Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, et al. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transpl*. 2019;54:1525–52.
- Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. 2009;113:214–23.
- Farge D, Henegar C, Carmagnat M, Daneshpouy M, Marjanovic Z, Rabian C, et al. Analysis of immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2005;52:1555–63.
- Snowden JA, Saccardi R, Allez M, Ardizzone S, Arnold R, Cervera R, et al. Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: updated guidelines of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transpl*. 2012;47:770–90.
- Delemarre EM, van den Broek T, Mijnheer G, Meerding J, Wehrens EJ, Olek S, et al. Autologous stem cell transplantation aids autoimmune patients by functional renewal and TCR diversification of regulatory T cells. *Blood*. 2016;127:91–101.
- Burt RK, Shah SJ, Dill K, Grant T, Gheorghide M, Schroeder J, et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 2011;378:498–506.
- van Laar JM, Farge D, Sont JK, Naraghi K, Marjanovic Z, Larghero J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;311:2490–8.
- 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*. 2018;378:35–47.
- Henes J, Oliveira MC, Labopin M, Badoglio M, Scherer HU, Del Papa N, et al. Autologous stem cell transplantation for progressive systemic sclerosis: a prospective non-interventional study from the European Society for Blood and Marrow Transplantation Autoimmune Disease Working Party. *Haematologica*. 2020;106:375–83.
- Farge D, Burt RK, Oliveira MC, Mousseaux E, Rovira M, Marjanovic Z, et al. Cardiopulmonary assessment of patients with systemic sclerosis for hematopoietic stem cell transplantation: recommendations from the European Society for Blood and Marrow Transplantation Autoimmune Diseases Working Party and collaborating partners. *Bone Marrow Transpl*. 2017;52:1495–503.
- Snowden JA, Badoglio M, Labopin M, Giebel S, McGrath E, Marjanovic Z, et al. Evolution, trends, outcomes, and economics of hematopoietic stem cell transplantation in severe autoimmune diseases. *Blood Adv*. 2017;1:2742–55.
- Nash RA, McSweeney PA, Nelson JL, Wener M, Georges GE, Langston AA, et al. Allogeneic marrow transplantation in patients with severe systemic sclerosis: Resolution of dermal fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:1982–6.
- Loh Y, Oyama Y, Statkute L, Verda L, Quigley K, Young K, et al. Non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis: graft-versus-autoimmunity without graft-versus-host disease? *Bone Marrow Transpl*. 2007;39:435–7.
- Oliveira MC, Labopin M, Henes J, Moore J, Papa ND, Cras A, et al. Does ex vivo CD34+ positive selection influence outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients? *Bone Marrow Transpl*. 2016;51:501–5.
- Moore J, Brooks P, Milliken S, Biggs J, Ma D, Handel M, et al. A pilot randomized trial comparing CD34-selected versus unmanipulated hemopoietic stem cell transplantation for severe, refractory rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2301–9.
- Alexander T, Bondanza A, Muraro PA, Greco R, Saccardi R, Daikeler T, et al. SCT for severe autoimmune diseases: consensus guidelines of the European Society for Blood and Marrow Transplantation for immune monitoring and biobanking. *Bone Marrow Transpl*. 2015;50:173–80.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4:267–74.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Claus S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109:1292–8.
- Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2542–7.
- Abreu SC, Weiss DJ, Rocco PRM. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: a therapeutic option in respiratory diseases? *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:53.
- Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:383–96.
- Rozier P, Maria A, Goulabchand R, Jorgensen C, Guilpain P, Noël D. Mesenchymal stem cells in systemic sclerosis: allogeneic or autologous approaches for therapeutic use? *Front Immunol*. 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02938>.
- Guiducci S, Porta F, Saccardi R, Guidi S, Ibbá-Manneschi L, Manetti M, et al. Autologous mesenchymal stem cells foster revascularization of ischemic limbs in systemic sclerosis: a case report. *Ann Intern Med*. 2010;153:650–4.
- Christopeit M, Schendel M, Föll J, Müller LP, Keyser G, Behre G. Marked improvement of severe progressive systemic sclerosis after transplantation of mesenchymal stem cells from an allogeneic haploidentical-related donor mediated by ligation of CD137L. *Leukemia*. 2008;22:1062–4.
- Keyser G, Christopeit M, Fick S, Schendel M, Taute BM, Behre G, et al. Treatment of severe progressive systemic sclerosis with transplantation of mesenchymal stromal cells from allogeneic related donors: report of five cases. *Arthritis Rheum*. 2011;63:2540–2.
- Liang J, Zhang H, Kong W, Deng W, Wang D, Feng X, et al. Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:312.
- Zhang H, Liang J, Tang X, Wang D, Feng X, Wang F, et al. Sustained benefit from combined plasmapheresis and allogeneic mesenchymal stem cells transplantation therapy in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19:165.
- Kamata Y, Takahashi Y, Iwamoto M, Matsui K, Murakami Y, Muroi K, et al. Local implantation of autologous mononuclear cells from bone marrow and peripheral blood for treatment of ischaemic digits in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology*. 2007;46:882–4.
- Nevskaya T, Ananieva L, Bykovskaia S, Eremin I, Karandashov E, Khrennikov J, et al. Autologous progenitor cell implantation as a novel therapeutic intervention for ischaemic digits in systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2008;48:61–64.
- Takagi G, Miyamoto M, Tara S, Kirinoki-Ichikawa S, Kubota Y, Hada T, et al. Therapeutic vascular angiogenesis for intractable macroangiopathy-related digital ulcer in patients with systemic sclerosis: a pilot study. *Rheumatology*. 2014;53:854–9.
- Ishigatsubo Y, Ihata A, Kobayashi H, Hama M, Kirino Y, Ueda A, et al. Therapeutic angiogenesis in patients with systemic sclerosis by autologous transplantation of bone-marrow-derived cells. *Mod Rheumatol*. 2010;20:263–72.
- van Rhijn-Brouwer FCC, Gremmels H, Fledderus JO, Schuurman AH, Bonte-Mineur F, Vonk MC, et al. A randomised placebo-controlled double-blind trial to assess the safety of intramuscular administration of allogeneic mesenchymal stromal cells for digital ulcers in systemic sclerosis: the MANUS Trial protocol. *BMJ Open*. 2018;8:e020479.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futral JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211–28.
- Bank J, Fuller SM, Henry GI, Zachary LS. Fat grafting to the hand in patients with Raynaud phenomenon: a novel therapeutic modality. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133:1109–18.

44. Del Papa N, Di Luca G, Sambataro D, Zaccara E, Maglione W, Gabrielli A, et al. Regional implantation of autologous adipose tissue-derived cells induces a prompt healing of long-lasting indolent digital ulcers in patients with systemic sclerosis. *Cell Transpl.* 2015;24:2297–305.
45. Del Papa N, Di Luca G, Andracco R, Zaccara E, Maglione W, Pignataro F, et al. Regional grafting of autologous adipose tissue is effective in inducing prompt healing of indolent digital ulcers in patients with systemic sclerosis: results of a monocentric randomized controlled study. *Arthritis Res Ther.* 2019;21:7.
46. Pignatti M, Spinella A, Cocchiara E, Boscaini G, Luseti IL, Citriniti G et al. Autologous fat grafting for the oral and digital complications of systemic sclerosis: results of a prospective study. *Aesthetic Plast Surg.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00266-020-01848-2>.
47. Jeon FHK, Griffin M, Denton CP, Butler PEM. Feasibility study of stem-cell enriched autologous lipotransfer to treat oro-facial fibrosis in systemic sclerosis (Sys-Stem): Protocol for open-label randomised controlled trial. *Int J Surg Protoc.* 2020;23:6–10.
48. Del Papa N, Caviggioli F, Sambataro D, Zaccara E, Vinci V, Di Luca G, et al. Autologous fat grafting in the treatment of fibrotic perioral changes in patients with systemic sclerosis. *Cell Transpl.* 2015;24:63–72.
49. Sautereau N, Daumas A, Truillet R, Jouve E, Magalon J, Veran J, et al. Efficacy of autologous microfat graft on facial handicap in systemic sclerosis patients. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2016;4:e660.
50. Gheisari M, Ahmadzadeh A, Nobari N, Iranmanesh B, Mozafari N. Autologous fat grafting in the treatment of facial scleroderma. *Dermatol Res Pr.* 2018;2018:1–7.
51. Almadori A, Griffin M, Ryan CM, Hunt DF, Hansen E, Kumar R, et al. Stem cell enriched lipotransfer reverses the effects of fibrosis in systemic sclerosis. *PLoS One.* 2019;14:e0218068.
52. Sun Y, Chen S, Zhang X, Pei M. Significance of cellular cross-talk in stromal vascular fraction of adipose tissue in neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39:1034–44.
53. Granel B, Daumas A, Jouve E, Harlé J-R, Nguyen P-S, Chabannon C, et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:2175–82.
54. Daumas A, Magalon J, Jouve E, Truillet R, Casanova D, Giraudo L, et al. Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. *Curr Res Transl Med.* 2017;65:40–3.
55. Scuderi N, Ceccarelli S, Onesti MG, Fioramonti P, Guidi C, Romano F, et al. Human adipose-derived stromal cells for cell-based therapies in the treatment of systemic sclerosis. *Cell Transpl.* 2013;22:779–95.
56. Onesti MG, Fioramonti P, Carella S, Fino P, Marchese C, Scuderi N. Improvement of mouth functional disability in systemic sclerosis patients over one year in a trial of fat transplantation versus adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2416192.
57. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132:1017–26.
58. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, de la Cámara R et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant.* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01227-8>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: MV, AD, FDG, CC, FS. Writing—original draft preparation: MV, AD, SS, RA, JM, AB. Writing—review and editing: BG, CC, FS.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Correspondence and requests for materials should be addressed to Mélanie Velier.

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

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

PARTIE 3 : RESULTATS EXPERIMENTAUX

Mes travaux de thèse de doctorat ont été réalisés au sein du Centre de Recherche en Cardiovasculaire et Nutrition (C2VN) sous la direction du Professeur Florence Sabatier, dans l'équipe 3 nommée « *Endothélium, Cellules circulantes et Maladies vasculaires* ».

1. Contexte et objectifs du travail

La Sclérodémie Systémique (ScS) demeure à ce jour associée à une morbidité significative et une altération majeure de la qualité de vie des patients. Les thérapies conventionnelles se révèlent souvent insuffisantes ; particulièrement pour les patients atteints de formes sévères mais également pour limiter les manifestations vasculaires et fibrotiques affectant le visage et les mains des patients.

Les thérapies cellulaires/tissulaires dérivées du TA autologue constituent des alternatives intéressantes parmi les stratégies innovantes évaluées dans la ScS. Plusieurs modalités sont envisagées et diffèrent par le degré de complexité du procédé d'ingénierie cellulaire mis en œuvre et l'effet thérapeutique recherché ciblant une action locale et/ou systémique.

Le procédé le plus basique consiste en la réinjection du TA autologue purifié. Il s'agit d'une procédure simple mais non réalisable dans le traitement des mains des patients sclérodermiques en raison du risque ischémique.

Cette limite a conduit notre équipe à développer une nouvelle stratégie basée sur l'injection locale de cellules de la Fraction Vasculaire Stromale (FVS) du TA. Ce concentré de cellules non adipocytaires constitue un produit suffisamment fluide pour être administré dans les faces latérales des doigts par voie sous-cutanée. Les travaux pré-cliniques réalisés dans un modèle murin chimiquement induit par la bléomycine ont montré un potentiel antifibrotique et pro-angiogénique de la FVS confortant la mise en place d'essais cliniques chez l'Homme⁴⁷⁵. En 2013, l'essai de phase I SCLERADEC évaluant l'administration de FVS autologue dans les doigts de patients sclérodermiques rapporte des résultats très encourageants y compris à long terme⁴⁷⁷⁻⁴⁷⁹. Cependant, les résultats de l'essai randomisé contre placebo de phase II n'ont pas permis de mettre en évidence la supériorité de l'approche par FVS autologue comparativement au placebo dans cette indication⁴⁸².

Plus généralement, les conclusions hétérogènes et parfois contradictoires des essais évaluant les thérapies cellulaires autologues dérivées du TA dans la ScS nous conduisent à la nécessité de mieux comprendre les mécanismes d'action sous-tendant l'efficacité thérapeutique de la FVS, aussi bien au niveau cellulaire que moléculaire. Elles questionnent également la pertinence d'une thérapie autologue par rapport aux approches allogéniques.

Dans ce contexte, l'**objectif général** de mon travail est de caractériser le potentiel angiogénique et antifibrotique des cellules progénitrices de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux dans le contexte de la sclérodémie systémique.

Les objectifs spécifiques de ce travail sont :

- 1) Comparer les propriétés angiogéniques et antifibrotiques des cellules de la fraction vasculaire stromale issue du tissu adipeux sain et sclérodermique ; à l'échelle de la fraction vasculaire stromale dans son ensemble mais également en considérant spécifiquement la composante mésenchymateuse.
- 2) Mettre en évidence des dérégulations de voies moléculaires exprimées par les cellules de la fraction vasculaire stromale au cours de la sclérodémie systémique et susceptibles d'impacter le potentiel thérapeutique des approches autologues dérivées du tissu adipeux.

2. Articles originaux 1 et 2

Une approche thérapeutique par fraction vasculaire stromale du tissu adipeux autologue est-elle pertinente dans la prise en charge de la sclérodermie systémique ?

Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis

*Jérémy Magalon, **Mélanie Velier**, Stéphanie Simoncini, Pauline François, Baptiste Bertrand, Aurélie Daumas, Audrey Benyamine, Romain Boissier, Laurent Arnaud, Luc Lyonnet, Samantha Fernandez, Françoise Dignat-George, Dominique Casanova, Benjamin Guillet, Brigitte Granel, Pascale Paul, Florence Sabatier*

Annals of the Rheumatic Diseases, Janvier 2019

L'altération vasculaire et la dysangiogenèse sont des éléments centraux de la physiopathologie de la ScS. Ces anomalies conduisent à des manifestations vasculaires ischémiques comme les phénomènes de Raynaud ou encore l'apparition d'ulcères digitaux, qui constituent une large part dans le handicap de la maladie. Par conséquent, l'évaluation du potentiel pro-angiogénique des produits de thérapie cellulaire en contexte sclérodermique représente un enjeu important.

Ce premier volet de travail s'est intéressé à l'impact du contexte autologue de la ScS sur les propriétés angiogéniques de la FVS du TA. Grâce à une collection biologique de FVS de grade clinique constituée à l'occasion de l'essai clinique SCLERADEC II, nous avons déterminé dans quelle mesure les FVS de patients sclérodermiques présentaient des profils phénotypiques, moléculaires, angiogéniques différents de ceux de FVS saines.

Sur les aspects cellulaires et phénotypiques, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative dans la cellularité et la répartition des sous-populations cellulaires (leucocytes, CSM, cellules endothéliales, cellules transitionnelles, péricytes). L'étude *in vitro* des capacités de bourgeonnement (tests de sphéroïdes) et de formation de structures pseudo-tubulaires en Matrigel® montre que la capacité angiogénique de FVS de patients est

conservée, bien que légèrement altérée, par rapport aux FVS de donneurs sains. Le potentiel de régénération vasculaire évalué dans un modèle de *Matrigel plug* chez la souris *Nude* conforte ces résultats.

Enfin, l'originalité de ce travail repose sur la mise en évidence d'une signature transcriptomique particulière pour les FVS extraites chez les patients sclérodermiques avec la modulation de gènes impliqués dans les processus angiogéniques et inflammatoires. Une approche complémentaire par *single-cell RNA sequencing* montre que les populations régénératives (endothéliales et mésenchymateuses) sont les plus concernées par ces modulations.

Les données supplémentaires du matériel, méthode et résultats de cet article original sont présentées en annexe de ce travail.

Enfin, deux échanges avec l'équipe du *Department of Biotechnological and Applied Clinical Sciences* (Université de l'Aquila, Italie) suscités suite à cet article sont présentés en annexe de ce travail.

1. Response to: *Adipose stromal vascular fraction and regenerative therapy in SSc: response to the article by Magalon et al*, Magalon J, **Velier M**, Simoncini S, et al. *Ann Rheum Dis* **2020**;79:e54.

2. Response to: *Could autologous adipose-derived stromal vascular fraction turn out an unwanted source of profibrotic myofibroblasts in systemic sclerosis?* **Velier M**, Magalon J, Simoncini S, et al. *Ann Rheum Dis* **2020**;79:e56.

CLINICAL SCIENCE

Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis

Jérémy Magalon,^{1,2} Mélanie Velier,^{1,2} Stéphanie Simoncini,² Pauline François,^{1,2} Baptiste Bertrand,^{2,3} Aurélie Dumas,⁴ Audrey Benyamine,^{2,4} Romain Boissier,^{2,5} Laurent Arnaud,⁶ Luc Lyonnet,⁶ Samantha Fernandez,⁷ Françoise Dignat-George,^{2,6} Dominique Casanova,³ Benjamin Guillet,^{2,7} Brigitte Granel,^{2,4} Pascale Paul,^{1,2} Florence Sabatier^{1,2}

Handling editor Josef S Smolen

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214218>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Professor Florence Sabatier, Cell Therapy Department, Hôpital de la Conception, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Marseille 13005, France; florence.sabatier@ap-hm.fr

Received 31 July 2018

Revised 31 October 2018

Accepted 16 November 2018



© Author(s) (or their employer(s)) 2019. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Magalon J, Velier M, Simoncini S, et al. *Ann Rheum Dis* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/annrheumdis-2018-214218

ABSTRACT

Objective The autologous stromal vascular fraction (SVF) from adipose tissue is an alternative to cultured adipose-derived stem cells for use in regenerative medicine and represents a promising therapy for vasculopathy and hand disability in systemic sclerosis (SSc). However, the bioactivity of autologous SVF is not documented in this disease context. This study aimed to compare the molecular and functional profiles of the SVF-based medicinal product obtained from SSc and healthy subjects.

Methods Good manufacturing practice (GMP)-grade SVF from 24 patients with SSc and 12 healthy donors (HD) was analysed by flow cytometry to compare the distribution of the CD45⁻ and CD45⁺ haematopoietic cell subsets. The ability of SVF to form a vascular network was assessed using Matrigel in vivo assay. The transcriptomic and secretory profiles of the SSc-SVF were assessed by RNA sequencing and multiplex analysis, respectively, and were compared with the HD-SVF.

Results The distribution of the leucocyte, endothelial, stromal, pericyte and transitional cell subsets was similar for SSc-SVF and HD-SVF. SSc-SVF retained its vasculogenic capacity, but the density of neovessels formed in SVF-loaded Matrigel implanted in nude mice was slightly decreased compared with HD-SVF. SSc-SVF displayed a differential molecular signature reflecting deregulation of angiogenesis, endothelial activation and fibrosis.

Conclusions Our study provides the first evidence that SSc does not compromise the vascular repair capacity of SVF, supporting its use as an innovative autologous biotherapy. The characterisation of the specific SSc-SVF molecular profile provides new perspectives for delineating markers of the potency of SVF and its targets for the treatment of SSc.

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a rare systemic autoimmune disease characterised by inflammation, fibrosis and vasculopathy.^{1,2} The key clinical manifestations of SSc are skin thickening and tightening and Raynaud's phenomenon. These symptoms typically coexist with gastrointestinal, cardiopulmonary

Key messages

What is already known about this subject?

► Autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction (SVF) represents a promising therapy for ischaemic vasculopathy and hand disability in systemic sclerosis (SSc), but the impact of the disease on the bioactivity of SVF has never been investigated.

What does this study add?

► Our study provides the first characterisation of GMP-grade autologous SVF used as an experimental advanced therapy medicinal products (ATMP) in patients with SSc.
 ► SVF from SSc presents similar distribution of haematopoietic and regenerative subpopulations compared with healthy donors' SVF.
 ► SSc context does not compromise the vasculogenic capacity of SVF in vitro and in vivo.
 ► SSc-SVF presents a molecular signature mainly affecting endothelial and stromal cells and reflecting deregulation of angiogenesis, endothelial activation and fibrosis.

How might this impact on clinical practice or future developments?

► This study supports the rationale for autologous SSc-SVF therapeutic use and delineates new perspectives and targets for potential cell engineering strategies to optimise SVF-based therapeutic approaches in a personalised way.

and renal involvement, leading to high morbidity.^{3–5} The diffuse cutaneous form of the disease is associated with a worse outcome compared with limited cutaneous SSc.^{6,7}

The injection of autologous stem/progenitor cells is emerging as a therapeutic option in SSc. Haematopoietic stem cell transplantation can achieve long-term benefits but display high toxicity.^{8,9} Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) can also

beneficially impact dysimmunity, vascular dysfunction and extracellular matrix production. ASCs are multipotent cells, obtained after cell culture, able to exert paracrine proangiogenic and immunomodulatory effects through the secretion of various growth factors and cytokines.^{10–12} ASC has been shown to reduce fibrosis in a murine model of diffuse SSc through normalisation of extracellular matrix remodelling and inflammation and stimulation of antioxidant defences.¹³ Translation of the use of ASC to the clinic was performed with a favourable safety profile and resulted in significant skin improvement in six patients with localised scleroderma.¹⁴

To circumvent the issues with ex vivo cell expansion, the use of the autologous stromal vascular fraction (SVF), obtained through enzymatic digestion of adipose tissue, is becoming an alternative to ASC in regenerative medicine, particularly in the context of vasculopathy and fibrosis.¹⁵ SVF is a dynamic and heterogeneous cell population including mesenchymal-like stem/stromal cells (MSC), endothelial progenitor cells (EPC), pericytes, haematopoietic and immune cells that recapitulates the variety of cells present in the adipose tissue vasculature and allows the onset of synergistic mechanisms promoting vascular repair.^{16–18} We recently reported the results from a phase I clinical trial showing the safety of local injection of autologous SVF cells in patients with SSc with hand disability.¹⁹ Changes in secondary endpoints indicated potential efficacy in the improvement of Raynaud's phenomenon, digital ulcers, hand pain and global quality of life at 6 and 24 months compared with baseline.^{19–20} The predominant improvement of peripheral vascular manifestations was consistent with the beneficial proangiogenic effects of SVF reported in experimental models and emerging clinical trials addressing ischaemic diseases.^{21–23} However, alterations of the progenitor cell-dependent endogenous capacity for vascular repair are involved in the SSc pathogenesis,^{24–25} which raises questions about the therapeutic potency of autologous SVF in this disease. Conflicting results have arisen from studies comparing MSC from patients with SSc and healthy donors (HD). Bone marrow-derived MSC (BM-MSC) from patients with SSc displays enhanced TGF- β receptor II expression and α 2 collagen synthesis.²⁶ This myofibroblast-like phenotype indicates that the SSc microenvironment may limit the therapeutic use of autologous MSC. The coculture of SSc-BM-MSC with HD microvascular endothelial cells reprogrammes these cells towards a proangiogenic phenotype.²⁷ In contrast, the phenotypic and functional properties of ASC were recently reported to be unaffected in patients with SSc.²⁸ In addition, blood-derived endothelial colony-forming cells from patients with SSc show an altered gene expression profile that may compromise their vascular repair capacity.^{29–30} However, no study has yet investigated whether SSc impairs the bioactivity of adipose tissue-derived SVF.

The aim of this study was to provide extensive characterisation of therapeutic-grade-SVF from patients with SSc (SSc-SVF) in comparison with HD-SVF. The phenotypic, transcriptomic and angiogenic properties of both fractions were assessed to refine the appraisal of autologous SVF-based therapeutic options in SSc.

MATERIALS AND METHODS

Donor specifications

SVF from patients with SSc was obtained from the cell biobank (n^oCD-2011–1331 attached to the Scleradec II clinical trial : ClinicalTrials.gov NCT02558543). SVF from HD was obtained from surgical residues of adipose tissue after liposuction for

Table 1 Baseline characteristics of patients with SSc and HD

	SSc, n=24	HD, n=12	P value
Gender, female/male	23/1	10/2	–
Age, years, mean \pm SEM	57.4 \pm 2.5	43 \pm 2.7	0.0013*
Body mass index (kg/m ² , mean \pm SEM)	24.1 \pm 0.74	24.4 \pm 0.7	0.772
CRP (median, 25–75th percentile)	2.2 (1.1–6.2)	1.7 (1–2.4)	0.734
Estimated glomerular filtration rate (mL/min/1.73 m ²)	92 \pm 3.6	102 \pm 8.3	0.204
Cardiovascular risk factors (%)			
Tobacco	12.5	8	–
Diabetes	0	0	–
Arterial hypertension	0	0	–
Hypercholesterolaemia	8	0	0.347
Disease characteristics			
Disease duration from diagnosis (years)	6.7 \pm 0.9	–	–
Early SSc disease <4 years	3 (12.5%)	–	–
History of Raynaud's phenomenon (years)	10 (4.2–14.5)	–	–
SSc subclassification: diffuse vs limited (%)	9 (37.5) vs 15 (62.5)	–	–
Medsger's Severity Scale	2 (2–3)	–	–
Total Modified Rodnan Skin Score	10 (6.25–16.5)	–	–
Digital ulcers (active)	29%	–	–
Cochin Hand Function Score	39.8 \pm 1.8	–	–
SHAQ score	1.3 \pm 0.07	–	–
Raynaud's Condition Score	5.2 \pm 0.5	–	–
Total lung capacity (% of predicted value)	93 \pm 3	–	–
Forced vital capacity (% of predicted value)	99 \pm 4	–	–
Alveolar capillary diffusing capacity (% of predicted value)	55 \pm 3	–	–
Autoantibodies (% positive)			
Antinuclear antibodies	100	–	–
Antitopoisomerase-1 antibodies (Scl70)	30.4	–	–
Anticentromere antibodies	27.3	–	–
Anti-RNA polymerase III antibodies	30	–	–
Systemic sclerosis medications, n, %			
Calcium-channel blockers, ongoing (previous)	9, 37.5 (10, 41.7)	–	–
Bosentan, ongoing (previous)	6, 25.0 (4, 16.7)	–	–
Prednisone <10 mg/day, ongoing (previous)	8, 33.3 (1, 4.2)	–	–
Methotrexate, ongoing (previous)	5, 20.8 (1, 4.2)	–	–
Iloprost infusion, ongoing (previous)	0, 0 (11, 45.8)	–	–

Data are mean \pm SEM or median (25–75th percentile range) or n (%) of patients.
–, Not applicable in HD.
*P<0.05.
CRP, C reactive protein; HD, healthy donor; SHAQ, scleroderma health assessment questionnaire; SSc, systemic sclerosis.

cosmetic purposes. The materials and methods are described in the online supplementary text.

RESULTS

Characteristics of the patients

The therapeutic-grade SVFs from 24 patients with SSc (15 limited and 9 diffuse cutaneous forms) were analysed in comparison with the SVF from 12 HDs. The demographic and standard biochemical data of the patients and control groups were similar except in age (table 1).

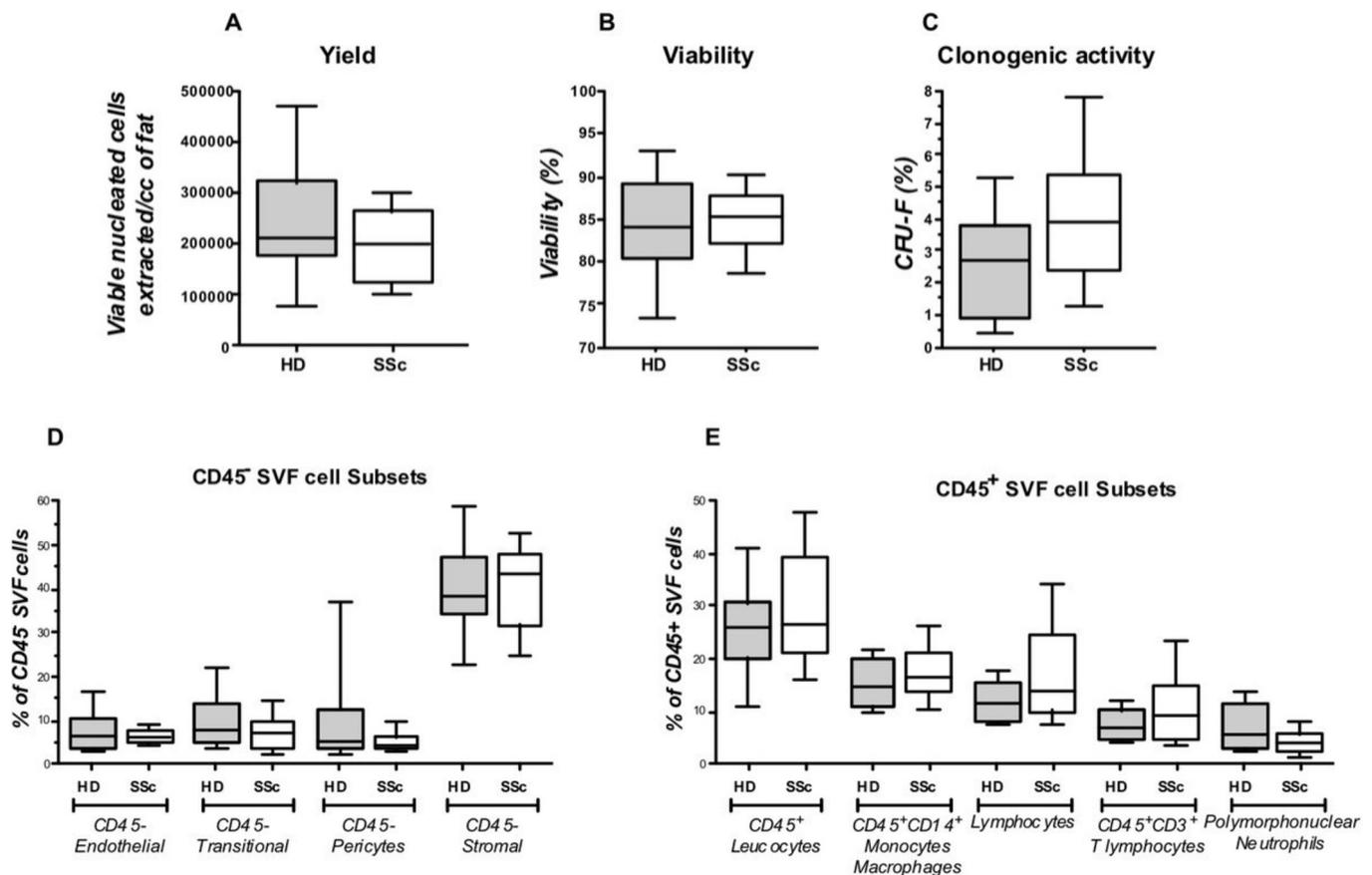


Figure 1 (A–C) The standard characteristics of SVF in HD and patients with SSc: viable nucleated cells yield, viability and clonogenic activity (CFU-F). (D) The repartition of CD45⁻ populations between HD and patients with SSc. (E) The repartition of CD45⁺ populations between HD and patients with SSc. CFU-F, colony-forming units-fibroblast; HD, healthy donors; SSc, systemic sclerosis.

Viable nucleated cells and colony-forming units-fibroblast

The standard characterisation of the SVF (Supplementary Figure) did not reveal any differences between patients with SSc and HD (figure 1A,B,C) regarding the number of viable nucleated cells extracted/cc of fat (median 200 469 [25–75th percentile range 123 488–263 167] in patients with SSc vs 214 431 [180 263–321 616] in HD), cell viability (85% [82–88] in SSc vs 84% [80–89] in HD) and the proportion of colony-forming units-fibroblast (3.9% [2.3–5.4] in patients with SSc vs 2.7% [0.9–3.8] in HD).

Flow cytometry analysis of SVF cell subsets

The distribution of the cell subpopulations in SVF was not significantly different between patients with SSc and HD (figure 1D,E). The main cell subset presented an MSC phenotype (median: 43.9% [25–75th percentile range: 31.8–48.5] in patients with SSc vs 38.4% [34.0–47.3] in HD), whereas endothelial cells represented 6.1% of the cells (4.7–7.9) in patients with SSc vs 6.3% (3.3–10.5) in HD (figure 1D). The leucocytes (26.6% [20.7–39.5] in patients with SSc vs 26% [20.2–30.7] in HD) mainly consisted of lymphocyte and monocyte/macrophage populations (13.6% [10.1–24.5] and 16.4% [13.7–21.4] in patients with SSc vs 11.5% [7.9–15.7] and 15.0% [11.5–20.3] in HD, respectively). In addition, a low proportion of polymorphonuclear cells was observed in both groups (4.3% [2.6–5.8] in patients with SSc vs 5.5% [2.6–11.7] in HD) (figure 1E).

Angiogenic activity of SVF cells

The SVF-dependent formation of capillary-like structures, as evaluated in an *in vitro* Matrigel assay, was comparable in patients with SSc and HD (figure 2A). Sprout formation and the cumulative sprout length measured in a three-dimensional spheroid assay were not altered in SSc-SVF compared with HD-SVF (figure 2B, left graphs). However, a trend towards decreases in the average length of sprouts and the average number of junctions formed by sprouts was observed for SSc-SVF ($p=0.07$) (figure 2B, right graphs). We then investigated the impact of SSc on SVF properties related to the formation of functional capillary networks *in vivo* using Matrigel plug assays performed in nu/nu mice. As controls, Matrigel implants that did not contain SVF were devoid of vessels (data not shown). H&E histological staining revealed a significantly impaired capacity of SSc-SVF to generate vessels compared with HD-SVF (figure 2C, upper left graph). Furthermore, in the implants containing SSc-SVF, the number of Dextran+ perfused vessels was slightly decreased compared with the HD group, without reaching statistical significance ($p=0.24$; figure 2C, upper right graph). Interestingly, this impairment of perfusion was also observed by ultrasound Doppler imaging, as indicated by a decrease in the vascularisation percentage ($p=0.11$; figure 2C, lower right graph). Taken together, these data demonstrated that SVF from patients with SSc exhibited slightly impaired angiogenic potential.

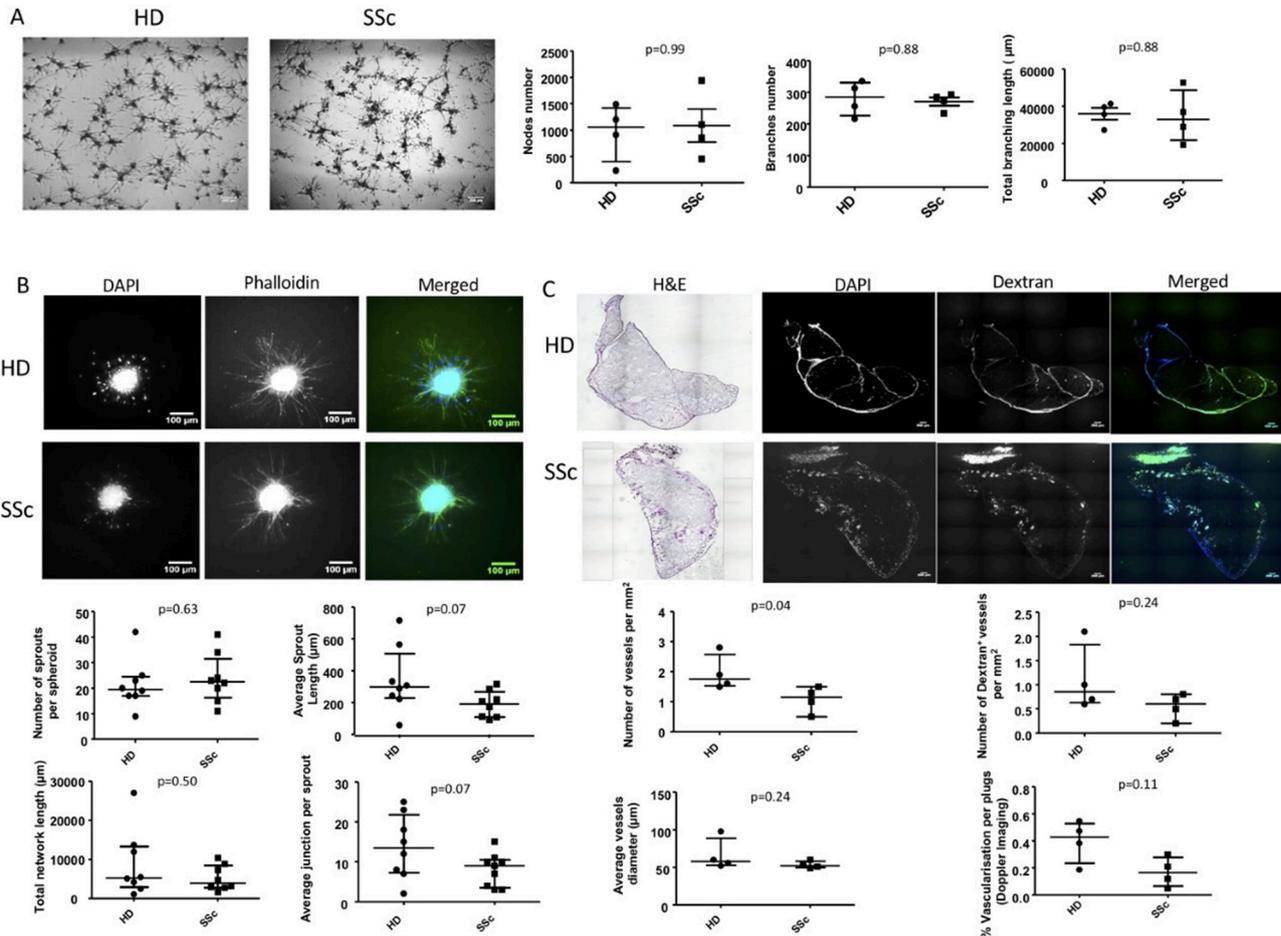


Figure 2 Angiogenic capacity of SVF cells from HD and patients with SSc. Matrigel tube formation did not reveal differences between groups (A). Spheroid-based sprouting assay revealed a tendency for higher angiogenic capacity of HD-SVF based on length and junction by sprouts (B). In vivo vascularisation revealed a significant increase in the number of vessels/mm² in HD conditions and a tendency for % of vascularisation per plug using Doppler imaging (C). HD, healthy donors; SSc, systemic sclerosis; SVF, stromal vascular fraction.

Transcriptomic analysis

To explore the molecular mechanisms underlying the angiogenic potential of SSc-SVF, we performed global gene expression profiling. Hierarchical clustering distinguished a significant differential gene expression profile based on the comparison of patients with SSc and HD (figure 3A). Overall, the transcriptomic analysis revealed that 321 genes from the SVF samples were differentially expressed in patients with SSc compared with HD, among which 123 genes were upregulated and 198 were downregulated (online supplementary tables 2 and 3). Among these genes, six genes (ACE2, Apelin, IDO1, SAA1, GDF15 and HAS1) were selected for further confirmation of expression based on their previous implication in fibrosis or angiogenesis and the fold change in their differential expression between patients with SSc and HD. The quantitative reverse transcription-PCR analysis confirmed significant upregulation of the gene expression of ACE2, Apelin, IDO1 and GDF15 in SSc patients, while that of SAA1 and HAS1 only showed a statistical tendency towards upregulation and downregulation respectively (figure 3B). To provide a cohesive view of the biological functions associated with the changes in the SSc-SVF gene expression profile, we conducted a gene ontology analysis using the DAVID database. The upregulated genes showed a strong association with the positive regulation of cell proliferation as well as angiogenesis and vasculogenesis regulation, whereas the categories enriched among the downregulated genes were associated with

the regulation of cell proliferation and migration, positive regulation of angiogenesis and the inflammatory response (figure 3C and online supplementary tables 4 and 5). Pathway enrichment analysis (online supplementary table 6) showed enrichment in several pathways involved in inflammatory response and angiogenesis (renin-angiotensin system, Notch), as well as pathways previously involved in SSc (transforming growth factor-β [TGF-β]). Collectively, these data identified an enrichment of genes involved in the control of vascular growth and maturation and the fibrotic response.

Single-cell analysis

A single-cell analysis was performed using four SVF samples (two HD, one limited and one diffuse cutaneous SSc samples). After normalisation, the gene content of 16 590 cells was obtained (8619 for HD and 7971 for SSc) and 6 cell populations were distinguished based on gene expression levels. Identification of the different subpopulations was performed using the top 20 genes expressed by each population and the available literature on their specificity of expression. The CD45+ population comprised one myeloid population, representing 3.6% of the analysed cells, and one lymphoid population (2.3%). The CD45- cells corresponded to stromal cells (46.8%), pericytes (27.8%) and two endothelial clusters (15.8% and 3.8%, respectively) (figure 4). Analysis of the set of genes of interest

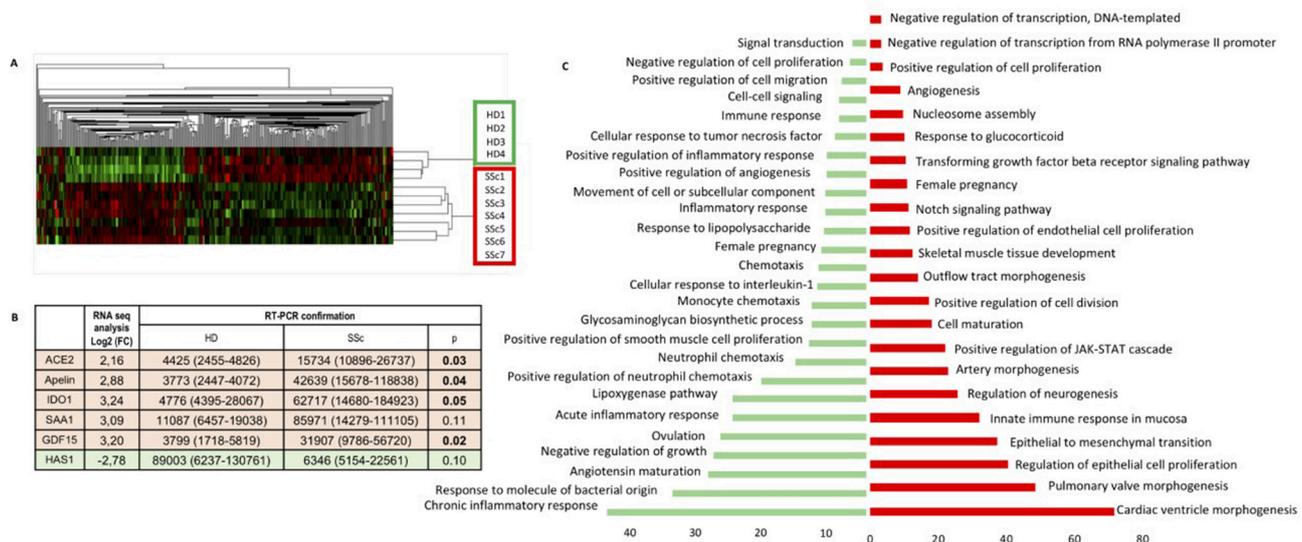


Figure 3 Transcriptomic analysis of SVF from HD (n=4) and patients with SSc (n=7) revealed a differential expression profile between the two conditions by hierarchic clustering (A) for 321 genes. (B) Represents the log₂(FC) obtained by RNA-Seq for selected genes and their confirmation by qRT-PCR (median [25%–75% quartile] expressed in specific transcripts detected per 10⁶ GAPDH transcripts). (C) Represents the fold enrichment over chance for the gene ontology biological process of the up (red) and down (green) gene lists using DAVID (fold change ≥ 2 , $p \leq 0.001$). FC, fold change; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HD, healthy donors; qRT-PCR, quantitative reverse transcription-PCR; SVF, stromal vascular fraction.

revealed major endothelial localisation of Apelin (71.7%) and IDO1 (79.9%), whereas SAA1 and GDF-15 were coexpressed by stromal cells (36.4% and 31.9%, respectively) and one endothelial cluster (26.0% and 58.0%, respectively). The expression of HAS1 was specifically assigned to the stromal cell clusters, and ACE2 to pericytes. This analysis also confirmed the differential gene expression levels between patients with SSc and HD in specific subpopulations (online supplementary table 7).

Secretome analysis

Among the secreted proteins evaluated using Luminex assay, the SSc-SVF cells produced higher levels of SAA and GDF15, which was consistent with the transcript analysis. The SSc-SVF cells were also observed to secrete higher levels of VCAM1, ICAM1, ADAMTS 13 and P-selectin (figure 5). In addition, a trend towards increased levels of fibrinogen was observed in patients with SSc (online supplementary table 8).

DISCUSSION

In the context of regenerative medicine, SVF represents a promising therapy for ischaemic vasculopathy and hand disability in SSc. The use of an autologous source of SVF is advantageous to prevent alloimmune responses but assumes that the infused cell therapy product retains a favourable profile in terms of composition and functional properties, despite the disease context. Our study is the first to provide investigations on the autologous SVF used as an advanced therapeutic medical product in a phase II clinical trial addressing handicap of the hand in SSc. Importantly, we demonstrate that SSc does not compromise the vascular repair capacity of SVF and characterise the specific SSc-SVF molecular profile by RNA sequencing analysis.

The easily accessible and uncultured SVF, concentrating all regenerative cell components of the adipose tissue vasculature, was shown to promote the formation of robust self-assembled vasculature, making it a clinically relevant cellular system with therapeutic potential in vascular diseases.¹⁶ Biological reports, mainly investigating blood and bone marrow-derived cells,

have documented that the SSc environment alters circulating or tissue-resident endogenous progenitor/stem cells in diverse ways. In addition, the mechanisms that sustain vasculopathy and fibrotic pathogenic processes associated with SSc involve a variety of cells, such as fibroblasts, pericytes, adipocytes, and endothelial cells and progenitors. However, the impact of SSc on the components of SVF has never been investigated. Based on the recent literature refining the phenotypic identification of SVF cell subsets, we designed a comprehensive flow cytometry approach, which showed no alteration in the distribution of the CD45+ leucocyte and CD45- cell subsets in SVF derived from SSc adipose tissue. These results may indicate that quantitative SSc-associated microvascular alteration patterns, such as rarefaction of microvessels and perivascular immune cell infiltrates, are not significant in SVF. Of note, pericytes involved in fibrosis³¹ were also not altered in SSc-SVF. These observations attest that the homeostasis of SVF and the quantitative composition of the SVF-based cell therapy product are maintained in the autologous context of SSc.

Furthermore, in various complementary functional assays, we observed no major impairment in the angiogenic function of SSc-SVF. The only significant impact of SSc was shown to be a decrease in the density of the neovessels formed following the injection of SVF-loaded Matrigel in nude mice. These in vivo data are consistent with in vitro spheroid assays showing a slightly decreased sprouting capacity of SSc-SVF. Thus, we demonstrated that the vasculogenic behaviour of the SVF obtained from patients with SSc was only marginally affected, supporting the rationale for its therapeutic use. Previous studies in mice indicate that diabetes and age potentially alter the intrinsic ability of SVF to support microvascular network formation in vivo.^{32 33} Although the older age of the SSc cohort compared with HD might have contributed to the diminished neovascularisation potential of the SVF, this hypothesis is unlikely because a univariate analysis failed to associate age with any of the angiogenic features characterising SVF (data not shown). In addition, the heterogeneity of ongoing treatments among enrolled patients

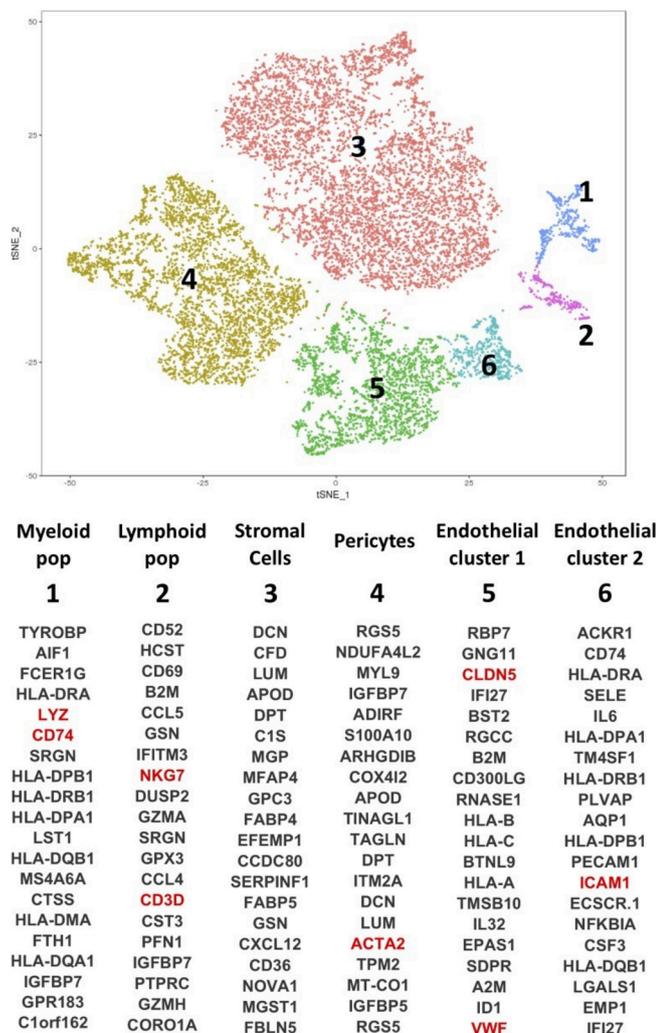


Figure 4 Graphic representation of single-cell analysis and top 20 genes expression for each cluster identified (in red, strong evidence genes). tSNE, t-distributed stochastic neighbor embedding.

with SSc did not allow delineating the specific impact of the pharmacological environment on these findings.

The current hypotheses about the angiogenic mechanism of action of SVF involve myeloid, immune cells³⁴ and vascular wall resident stem/progenitor cells,^{35 36} but highlight the major role of cooperation between MSC and EPC. The density of the vascular networks formed by the synergistic dual-cell system is many-fold higher than that found in implants containing either EPC or MSC alone.³⁷ In such interplay, paracrine activity is known to make a predominant contribution. Factors produced by MSC, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), aid in the migration and survival of EPC, whereas the platelet-derived growth factor (PDGF-BB) produced by EPC supports MSC proliferation and migration.^{37 38} Therefore, we further analysed whether SSc was associated with a specific molecular signature of SVF through global and single-cell RNA-Seq approaches and analysis of SVF-derived secreted factors. We provide the first evidence of a transcriptional signature with differential gene expression in whole SVF between SSc and healthy conditions. Notably, the transcript analysis identified a set of six genes of interest (Apelin, IDO1, SAA1, GDF15, HAS1 and ACE2) that are known to be involved in pathways controlling angiogenesis and fibrosis and are relevant to SSc vasculopathy. In this regard, the observed enrichment in several signalling pathways such

as renin angiotensin system, TGF- β , Notch and PI3-kinase, is consistent with their involvement not only in SSc. These pathways also constitute key regulators of vascular stem/progenitor cells function.³⁹ Interestingly, the expression of these genes was mainly assigned to clusters identified as cells belonging to the endothelial or stromal lineage using single-cell RNA-Seq technology.

Among the alterations predominantly affecting the endothelial SVF cell subset, we showed upregulation of Apelin gene expression in SSc-SVF. Apelin is an endothelial ligand of the Apelin receptor that activates proangiogenic signalling and regulates cardiovascular homeostasis. This result is in line with a previous description of enhanced levels of circulating Apelin as a marker of early endothelial activation and angiogenic responses that occur prior to fibrosis in early SSc and the development of proliferative vasculopathy in late-stage SSc.^{40 41} In addition, modulation of Apelin receptor was recently identified as a component of the SSc signature in skin endothelial cells analysed using single-cell RNA sequencing approach.⁴² We also bring a first evidence of an increase in endothelial indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) expression in SSc-SVF. IDO1 catalyses the production of metabolites in the Kynurenine pathway of tryptophan degradation. In addition to its well-known immunoregulatory functions, IDO1 was shown to be involved in the regulation of endothelial function, vascular tone, angiogenesis and atherogenesis processes.⁴³ Consistent with our results, IDO is emerging as a key regulator of innate and adaptive immune inflammatory responses in SSc.⁴⁴ Thus, upregulation of IDO in SVF could be a compensatory mechanism that counteracts endothelial inflammation, dysangiogenesis and immune activation. Moreover, an analysis of conditioned media from SSc-SVF revealed higher levels of the endothelial activation markers VCAM1, P-selectin and ICAM1 compared with HD-SVF. Collectively, these data support the hypothesis of an activated endothelial profile induced by SSc in adipose tissue. These also suggest that Apelin and IDO1 could be targeted in an attempt to improve SVF therapeutic potential.

In addition to these endothelial-specific alterations, the enhanced GDF15 and SAA1 secretion and gene expression observed in SSc-SVF were localised to both stromal and endothelial cells. GDF15 is involved in fibrosis initiation in scleroderma.⁴⁵⁻⁴⁷ Serum levels of SAA1 are higher in patients with SSc with pulmonary involvement⁴⁸ and in patients presenting giant cell arteritis compared with HDs with potential myofibroblast outgrowth induction.⁴⁹ In addition, HAS1 transcripts were significantly downregulated in SSc-SVF, and their expression was mainly assigned to stromal cells based on single-cell analysis. HAS1 plays a role in synthesising hyaluronic acid.⁵⁰ Collectively, the significance of such alterations deserves further investigation, as they may affect the impact of SSc-SVF on fibrosis.

In conclusion, our study is the first to show that the quantitative distribution of the endothelial, stromal, immune and pericytes cell subsets is preserved within the autologous SVF preparation used to treat patients with SSc. While the transcriptomic and secretory profiles of SVF obtained from patients with SSc exhibited a molecular signature that reflected fibrosis, angiogenesis and endothelial activation processes, we provide functional evidence that these alterations did not translate into major impairment of the angiogenic behaviour of the autologous SVF medicinal product. However, specific profiles that may account for the interindividual variability in SSc-SVF potency could impact the cell-based therapeutic effect. Taking advantage of the ongoing clinical trial assessing the fully characterised autologous SVF batches used to treat hand disability in patients with SSc, a future analysis will allow us to determine the relationship

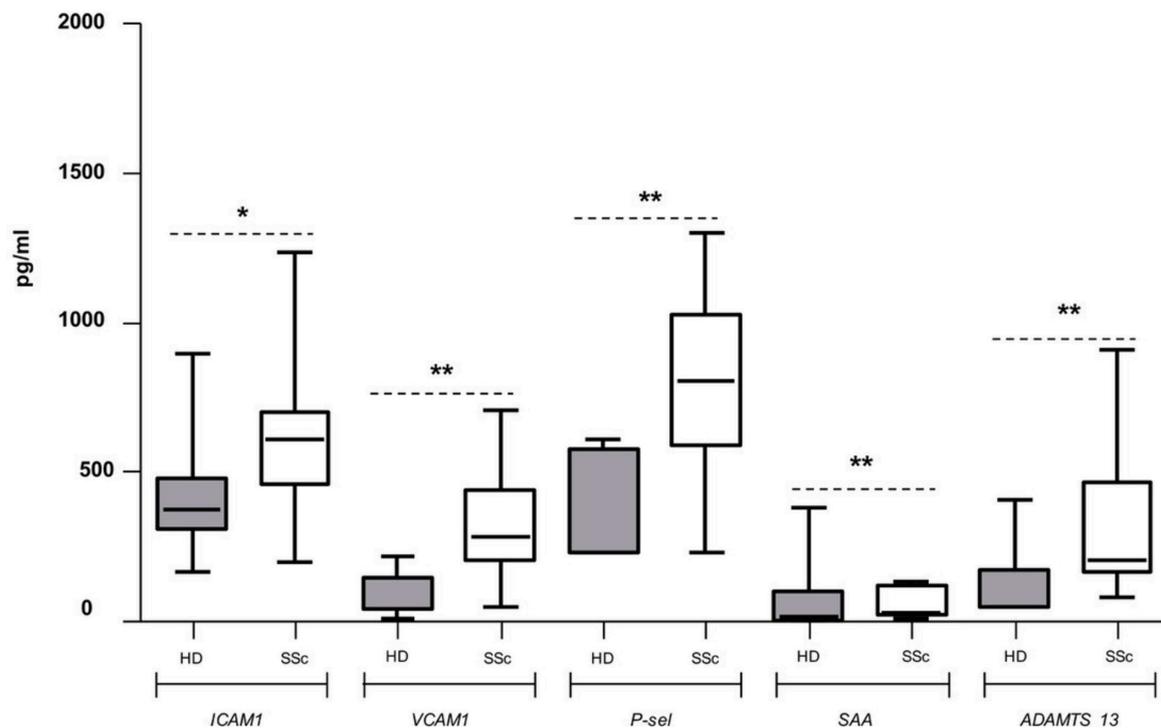


Figure 5 Significant differences ($p < 0.05$) in secreted proteins from the stromal vascular fraction of patients with systemic sclerosis (SSc) and healthy donors (HD).

between the biological attributes of SVF and its clinical efficacy in reducing vascular manifestations, which should provide clues for identifying markers of a good responder profile. These results also provide new perspectives and targets for delineating potential cell engineering strategies to optimise SVF-based therapeutic approaches in a personalised way.

Author affiliations

¹Cell Therapy Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, INSERM CIC BT 1409, Marseille, France

²INSERM, INRA, C2VN, Aix-Marseille University, Marseille, France

³Plastic Surgery Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France

⁴Internal Medicine Department, Hôpital Nord & Hôpital de la Timone, AP-HM, Marseille, France

⁵Urology Surgery Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France

⁶Vascular Biology Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France

⁷CERIMED, Aix-Marseille University, AP-HM, Marseille, France

Contributors Study concept and design: JM, SS, PP, FS. Collection and acquisition of data: JM, MV, BB, AD, AB, RB. Analysis and interpretation of data: JM, PF, LA, LL. In vivo experiments including interpretation: LL, SF, BeG. Drafting of the manuscript: JM, PF, MV, BB. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: FD-G, BeG, BrG, PP, FS. Study supervision: FD-G, DC, PP, FS.

Funding Funding for this work was granted by Fondation de l'Avenir (Grant APM RMA 2015-0008) and AORC Junior 2017 from Assistance Publique Hopitaux Marseille.

Disclaimer We certify that the manuscript was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling and overall style by one or more of the highly qualified native English-speaking editors at American Journal Experts (Certificate Verification Key 9067-71A5-5CFD-7DC1-18AP).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Obtained.

Ethics approval The protocol was approved by the local ethics committee (authorisation #14.051 from CPP Sud Méditerranée V) and the National Health Regulatory Authority (authorisation #141 449 A-62 from ANSM).

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

1 Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet* 2017;390:1685–99.

- Allanore Y, Distler O, Matucci-Cerinic M, *et al.* Review: defining a unified vascular phenotype in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:162–70.
- Nikpour M, Baron M. Mortality in systemic sclerosis: lessons learned from population-based and observational cohort studies. *Curr Opin Rheumatol* 2014;26:131–7.
- Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, *et al.* Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1809–15.
- Poudelet DR, Jayakumar D, Danve A, *et al.* Determinants of mortality in systemic sclerosis: a focused review. *Rheumatol Int* 2018;38:1847–1858:1847–58.
- Young A, Namas R, Dodge C, *et al.* Hand impairment in systemic sclerosis: various manifestations and currently available treatment. *Curr Treatm Opt Rheumatol* 2016;2:252–69.
- Araújo FC, Camargo CZ, Kayser C. Validation of the ACR/EULAR classification criteria for systemic sclerosis in patients with early scleroderma. *Rheumatol Int* 2017;37:1825–33.
- Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, *et al.* Myeloablative autologous stem-cell transplantation for severe scleroderma. *N Engl J Med* 2018;378:35–47.
- Burt RK, Farge D. Systemic sclerosis: autologous HSCT is efficacious, but can we make it safer? *Nat Rev Rheumatol* 2018;14:189–91.
- Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, *et al.* Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1327–39.
- Maria AT, Maumus M, Le Quellec A, *et al.* Adipose-derived mesenchymal stem cells in autoimmune disorders: state of the art and perspectives for systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;52:234–59.
- Maria AT, Toupet K, Maumus M, *et al.* Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *J Autoimmun* 2016;70:31–9.
- Maria AT, Toupet K, Bony C, *et al.* Antifibrotic, antioxidant, and immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in HOCl-Induced systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:1013–25.
- Scuderi N, Ceccarelli S, Onesti MG, *et al.* Human adipose-derived stromal cells for cell-based therapies in the treatment of systemic sclerosis. *Cell Transplant* 2013;22:779–95.
- Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:145.
- Ramakrishnan VM, Boyd NL. The adipose stromal vascular fraction as a complex cellular source for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2018;24:289–99.
- Klar AS, Güven S, Zimoch J, *et al.* Characterization of vasculogenic potential of human adipose-derived endothelial cells in a three-dimensional vascularized skin substitute. *Pediatr Surg Int* 2016;32:17–27.
- Poitevin S, Cussac D, Leroy AS, *et al.* Sphingosine kinase 1 expressed by endothelial colony-forming cells has a critical role in their revascularization activity. *Cardiovasc Res* 2014;103:121–30.

- 19 Granel B, Daumas A, Jouve E, *et al.* Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Ann Rheum Dis* 2015;74:2175–82.
- 20 Daumas A, Magalon J, Jouve E, *et al.* Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. *Curr Res Transl Med* 2017;65:40–3.
- 21 Koh YJ, Koh BI, Kim H, *et al.* Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1141–50.
- 22 Serratrice N, Bruzzese L, Magalon J, *et al.* New fat-derived products for treating skin-induced lesions of scleroderma in nude mice. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:138.
- 23 Comella K, Parceró J, Bansal H, *et al.* Effects of the intramyocardial implantation of stromal vascular fraction in patients with chronic ischemic cardiomyopathy. *J Transl Med* 2016;14:158.
- 24 Mostmans Y, Cutolo M, Giddelo C, *et al.* The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: A systematic review. *Autoimmun Rev* 2017;16:774–86.
- 25 Brunasso AM, Massone C. Update on the pathogenesis of Scleroderma: focus on circulating progenitor cells. *F1000Res* 2016;5:723.
- 26 Vanneaux V, Farge-Bancel D, Lecourt S, *et al.* Expression of transforming growth factor β receptor II in mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients. *BMJ Open* 2013;3:e001890.
- 27 Cipriani P, Marrelli A, Benedetto PD, *et al.* Scleroderma mesenchymal stem cells display a different phenotype from healthy controls; implications for regenerative medicine. *Angiogenesis* 2013;16:595–607.
- 28 Capelli C, Zaccara E, Cipriani P, *et al.* Phenotypical and functional characteristics of in vitro-expanded adipose-derived mesenchymal stromal cells from patients with systematic sclerosis. *Cell Transplant* 2017;26:841–54.
- 29 Manetti M, Romano E, Rosa I, *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:924–34.
- 30 Avouac J, Cagnard N, Distler JH, *et al.* Insights into the pathogenesis of systemic sclerosis based on the gene expression profile of progenitor-derived endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2011;63:3552–62.
- 31 Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, *et al.* 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:R1113–23.
- 32 Cianfarani F, Toietta G, Di Rocco G, *et al.* Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. *Wound Repair Regen* 2013;21:545–53.
- 33 Aird AL, Nevitt CD, Christian K, *et al.* Adipose-derived stromal vascular fraction cells isolated from old animals exhibit reduced capacity to support the formation of microvascular networks. *Exp Gerontol* 2015;63:18–26.
- 34 Navarro A, Marin S, Riol N, *et al.* Human adipose tissue-resident monocytes exhibit an endothelial-like phenotype and display angiogenic properties. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:50.
- 35 Awgulewitsch CP, Trinh LT, Hatzopoulos AK. The vascular wall: a plastic hub of activity in cardiovascular homeostasis and disease. *Curr Cardiol Rep* 2017;19:51.
- 36 Wörsdörfer P, Mekala SR, Bauer J, *et al.* The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body. *Pharmacol Ther* 2017;171:13–29.
- 37 Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Claus S, *et al.* Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res* 2009;104:1410–20.
- 38 Traktuev DO, Merfeld-Claus S, Li J, *et al.* A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008;102:77–85.
- 39 Lu W, Li X. Vascular stem/progenitor cells: functions and signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:859–69.
- 40 Wiwanitkit V. Serum apelin levels in systemic sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27:1586.
- 41 Aozasa N, Asano Y, Akamata K, *et al.* Serum apelin levels: clinical association with vascular involvements in patients with systemic sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27:37–42.
- 42 Apostolidis SA, Stifano G, Tabib T, *et al.* Single Cell RNA Sequencing Identifies HSPG2 and APLNR as markers of endothelial cell injury in systemic sclerosis skin. *Front Immunol* 2018;9:2191.
- 43 Song P, Ramprasath T, Wang H, *et al.* Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:2899–916.
- 44 Legány N, Berta L, Kovács L, *et al.* The role of B7 family costimulatory molecules and indoleamine 2,3-dioxygenase in primary Sjögren's syndrome and systemic sclerosis. *Immunol Res* 2017;65:622–9.
- 45 Lambrecht S, Smith V, De Wilde K, *et al.* Growth differentiation factor 15, a marker of lung involvement in systemic sclerosis, is involved in fibrosis development but is not indispensable for fibrosis development. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:418–27.
- 46 Gamal SM, Elgengehy FT, Kamal A, *et al.* Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) level and relation to clinical manifestations in egyptian systemic sclerosis patients: preliminary data. *Immunol Invest* 2017;46:703–13.
- 47 Yanaba K, Asano Y, Tada Y, *et al.* Clinical significance of serum growth differentiation factor-15 levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *Mod Rheumatol* 2012;22:668–75.
- 48 Lakota K, Carns M, Podluszky S, *et al.* Serum amyloid A is a marker for pulmonary involvement in systemic sclerosis. *PLoS One* 2015;10:e0110820.
- 49 O'Neill L, Rooney P, Molloy D, *et al.* Regulation of inflammation and angiogenesis in giant cell arteritis by acute-phase serum Amyloid A. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:2447–56.
- 50 Chan DD, Xiao WF, Li J, *et al.* Deficiency of hyaluronan synthase 1 (Has1) results in chronic joint inflammation and widespread intra-articular fibrosis in a murine model of knee joint cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:1879–89.

**Paracrine effects of adipose-derived cellular therapies in an
in vitro fibrogenesis model of human vocal fold scarring**

Mélanie Velier, Alexia Mattei, Stéphanie Simoncini, Jérémy Magalon, Laurent Giraudo, Laurent Arnaud, Antoine Giovanni, Françoise Dignat-George, Florence Sabatier

Journal of Voice, Juin 2022

La seconde étude sur la FVS cible le potentiel antifibrotique. Parallèlement à la vasculopathie, la ScS est caractérisée par le développement progressif de lésions de fibrose, objectivé par des dépôts importants de MEC et la transformation des fibroblastes en myofibroblastes. De plus, la capacité de la FVS du TA à limiter l'évolution des processus de fibrose est à ce jour mal documentée dans la littérature, malgré les premières étapes d'un développement clinique.

C'est pourquoi, nous avons cherché à documenter la capacité antifibrotique de FVS issues de donneurs sains. Pour cela, nous avons utilisé un modèle *in vitro* développé lors d'une collaboration avec l'université de médecine de Graz en Autriche relative à un projet clinique annexe s'intéressant à la thérapie cellulaire des cordes vocales cicatricielles.

Au cours de mon doctorat, je suis allée me former auprès de cette équipe à un modèle original de fibrose *in vitro* reposant sur les principes du *Macromolecular Crowding* combinés à la stimulation au TGF β 1. Initialement décrit par Graupp *et al.*, ce modèle repose sur l'exposition de fibroblastes à des macromolécules inertes, qui par encombrement stérique conduit à la sécrétion significativement accrue de composants de la matrice extracellulaire par les fibroblastes⁵¹². Cette stratégie combinée à la stimulation par le TGF β constitue un modèle robuste de fibrogenèse *in vitro*.

Nous avons utilisé ce modèle pour évaluer l'effet antifibrotique de FVS issues de donneurs sains, en comparaison à des CSM saines et à l'HGF. Nous montrons que les FVS et les CSM extraites de donneurs sains réduisent significativement l'expression de l' α SMA après 5 jours de co-culture avec *transwell* (co-culture indirecte). L'analyse du contenu en collagène des fibroblastes rapporte des résultats plus mitigés puisque l'on observe une tendance à la baisse de la quantité de collagènes fibrillaires après co-culture avec les FVS et une absence d'effet lors des co-cultures avec les ASC.

La supériorité d'effet de la FVS comparativement à l'HGF (médiateur antifibrotique connu) et à une population cellulaire homogène comme les CSM, incite à penser qu'il existe des facteurs additionnels sécrétés par la FVS qui agissent en synergie pour conduire à cet effet.

Ces résultats sont en faveur d'une capacité de la FVS à freiner l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique par des fibroblastes dans un contexte pro-fibrosant. De plus, notre modèle de co-culture avec inserts utilisé dans cette étude suggère que cet effet repose sur des mécanismes paracrines. Au total, cette étude est un argument supplémentaire en faveur du développement de thérapies reposant sur la FVS dans les pathologies à composante fibrotique.

Paracrine Effects of Adipose-Derived Cellular Therapies in an *in Vitro* Fibrogenesis Model of Human Vocal Fold Scarring

*,[†]Mélanie Velier, ^{‡,§}Alexia Mattei, *Stéphanie Simoncini, *,[†]Jérémy Magalon, [†]Laurent Giraud, [†]Laurent Arnaud, ^{‡,§}Antoine Giovanni, *,[†]Francoise Dignat-George, *,[†]Florence Sabatier, ^{||}Markus Gugatschka, and ^{||}Tanja Grossmann, *^{†‡}Marseille, and [§]Aix-en-Provence, France, and ^{||}Graz, Austria

SUMMARY: Objectives/Hypothesis. Vocal folds (VF) scarring leads to severe dysphonia which negatively impacts daily life of patients. Current therapeutic options are limited due in large part to the high complexity of the micro-structure of the VF. Innovative therapies derived from adipose tissue such as stromal vascular fraction (SVF) or adipose derived stromal/ stem cells (ASC) are currently being evaluated in this indication and paracrine anti-fibrotic effects are considered as predominant mechanisms.

Methods. The paracrine anti-fibrotic effects of SVF and ASC from healthy donors were tested in an innovative *in vitro* fibrogenesis model employing human VF fibroblasts (hVFF) and the principles of macromolecular crowding (MMC). Biosynthesis of collagen and alpha-smooth-muscle actin (α SMA) expression in hVFF were quantified after five days of indirect coculture with ASC or SVF using silver stain, western blot and RT-qPCR analysis.

Results. Fibrogenesis was promoted by addition of transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) combined with MMC characterized by an enhanced deposition of fibrillar collagens and the acquisition of a myofibroblast phenotype (overexpression of α SMA). Adipose-derived therapies led to a reduction in the α SMA expression and the collagen content was lower in hVFF co-cultivated with SVF.

Conclusions. ASC and SVF promoted significant prevention of fibrosis in an *in vitro* fibrogenesis model through paracrine mechanisms, supporting further development of adipose-derived cellular therapies in VF scarring.

Key Words: Vocal cords—Dysphonia—Stem cell—Fibrosis—Fibroblasts—Hepatocyte growth factor.

Abbreviations: VF, vocal fold—ECM, extracellular matrix— α SMA, alpha-smooth-muscle actin—ACTA2, actin alpha 2—bFGF, basic fibroblasts growth factor—HGF, hepatocyte growth factor—MSC, mesenchymal stromal cells—SVF, stromal vascular fraction—ASC, adipose derived stromal cells—hVFF, human vocal fold fibroblasts—MMC, macromolecular crowding—TGF- β 1, transforming growth factor beta 1—DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium—FCS, fetal calf serum—SM, standard medium—GMP, good manufacturing practices—RT, reverse transcription—RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction—GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase—SDS-PAGE, sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis—VEGF, vascular endothelial growth factor—COL1A1, Collagen 1 alpha 1.

INTRODUCTION

Vocal fold (VF) scar is one of the most challenging benign laryngeal pathologies,¹ especially because VF microstructure is complex,² particularly due to its foliated organization allowing optimal vibration. The proportions and the organization of its extracellular matrix (ECM) components largely determine the mechanical properties of the VF. VF scarring is most often the result of laryngeal microsurgery, but it may also be found congenitally (sulcus vocalis) or acquired

following a trauma or chronic inflammatory phenomena. Thus, the normal microstructure is replaced by fibrous tissue, with an excessive and disorganized ECM inducing vibration disorder.¹ Compared to normal fibroblasts, VF scar tissue fibroblasts produce a larger amount of collagen, proliferate more rapidly and overexpress α -smooth-muscle actin (α SMA), also known as actin alpha 2 (ACTA2), a myofibroblast differentiation marker.³

Current therapies (medialization, scar resection, microflap, injection of hyaluronic acid, etc.)^{2,4} are often disappointing since they do not restore a normal ECM distribution. Other more experimental treatments such as administration of basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)⁵ or Hepatocyte Growth Factor (HGF)^{6,7} have shown encouraging effects *in vitro* or *in vivo* on animals. Only one phase I/II clinical trial assessed the safety and effectiveness of intracordal injection of a recombinant human HGF⁸: the results indicated no serious adverse events and encouraging clinical results. Thus, the identification of innovative strategies able to improve the mechanical vibrational properties of VF remains an important clinical challenge.

Mesenchymal stromal cells (MSC), which were first described in bone marrow to support hematopoiesis,⁹ are

Accepted for publication May 17, 2022.

This work was supported by PHC Amadeus Campus France 2017 (grant number FR05/2017).

From the *Aix Marseille Univ, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre recherche en CardioVasculaire et Nutrition, Marseille, France; [†]Cell Therapy Department, Hôpital de la Conception, Marseille, France; [‡]APHM, La Conception University Hospital, Department of Oto-Rhino-Laryngology and Head and Neck Surgery, Marseille, France; [§]Aix Marseille University, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire Parole et Langage, Aix-en-Provence, France; and the ^{||}Division of Phoniatrics, ENT University Hospital Graz, Medical University of Graz, Graz, Austria.

Address correspondence and reprint requests to Alexia Mattei, Service ORL et chirurgie cervico-faciale du Pr Michel, CHU Conception, 147 boulevard Baille, 13005 Marseille. E-mail: alexia.mattei@ap-hm.fr

Journal of Voice, Vol. ■■, No. ■■, pp. ■■–■■

0892-1997

© 2022 The Voice Foundation. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2022.05.012>

multipotent stem cells that can be isolated from a variety of tissues but adipose tissue remains a very attractive source due to its abundance and accessibility. Autologous adipose-derived Stromal Vascular Fraction (SVF) is a heterogeneous population of cells obtained in a few hours after enzymatic digestion of adipose tissue that does not require an expansion step. SVF is also an advantageous source of adipose derived stromal cells (ASC) because of its fluidity and ease to inject. Besides, SVF brings the synergistic effect of its various cellular subpopulations, including ASC but also endothelial progenitor cells combining vasculogenic, anti-fibrotic and anti-inflammatory properties. The exact mechanism of action of ASC and SVF are not fully elucidated but it is now admitted that the major effect rests on paracrine activity through a large type of secreted molecules.^{10,11}

To facilitate research on this field, Graupp et al. described an *in vitro* fibrogenesis model using human vocal fold fibroblasts (hVFF) and the principles of macromolecular crowding (MMC).¹² MMC promotes fibrogenesis after the addition of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) to a medium containing inert macromolecules. The aim of this experimental study was to assess the *in vitro* paracrine potential of SVF cells and ASC on scarred hVFF in this innovative model.

MATERIAL AND METHODS

Donors

Adipose derived stromal cells (ASC) and Stromal Vascular Fraction (SVF) cells from healthy donors ($n = 4$) were obtained from adipose tissue surgical residues following liposuction for aesthetic purposes. All patients provided informed consent for the scientific use of surgical residues.

Cell culture

Immortalized human vocal fold fibroblasts (hVFF) were obtained from the lab of Prof. Susan Thibeault (University of Wisconsin, Madison, USA).¹³ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies, Waltham, Massachusetts) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) and 100 μ g/mL Normocin (Invivogen, San Diego, California, USA) was used as standard medium (SM). Adipose tissue collection was

conducted under conscious sedation with local anesthesia. SVF was obtained in a Cell Therapy Unit using the automated processing Celution 800/CRS system (Cytosol Therapeutics Inc., San Diego, California, USA) as previously described.¹⁴ Collected lipoaspirate was washed and enzymatically digested to obtain SVF in accordance with the European Regulations and Good Manufacturing Practices (GMP) for 'Advanced Therapy Medicinal Products'. To isolate the ASC, SVF was then plated into a T75 cell culture flask in a culture medium consisting of DMEM supplemented with 50% Ham's F-12 Nutrient Mix (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 10% FCS, GlutaMAX (100X, Thermo Scientific), Gentamicin and Penicillin G (both Panpharma, Luitré, France), Fungizone (Bristol-Meyers Squibb, New York, NY, USA). Adherent cells were grown under standard cell culture conditions (5% CO₂, 37°C, humidified), detached with Trypsin-EDTA and passed to extend the culture. For co-culture experiments, hVFF from passages 13–20 were seeded into cell culture plates (15,000 cells/cm²). The following day, SM was switched to FCS-free SM for another 24 h. Cells were then allocated to different treatment groups. For the control group DMEM enriched with 0.5% FCS, 100 μ g/mL Normocin and 100 nM of L-ascorbic acid 2-phosphate was used. Myofibroblast differentiation was induced by adding of 5 ng/mL TGF- β 1 combined with "macromolecular crowding" (MMC) by adding a mixture of 37.5 mg/mL 70 kDa Ficoll (Fc) with 25 mg/mL 400 kDa Fc (both Sigma-Aldrich). To assess possible anti-fibrotic effects, three conditions were tested in co-culture with hVFF: (i) recombinant HGF (50 ng/mL, Sigma-Aldrich), (ii) paracrine effect of thawed SVF and (iii) paracrine effect of thawed ASC from passages 3–5. After 5 days of incubation, samples were further processed.

Reverse transcription-qPCR

RNA isolation of hVFF was performed using the QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) and total mRNA was isolated with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was eluted in RNase-free water and concentration was determined using the NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific). Reverse transcription (RT), as well as

TABLE 1.
Primer sequences used for RT-qPCR

Gene	Gene symbol	Forward primer	Reverse primer	Product length [bp]
Alpha smooth Muscle action	ACTA2	CGTTACTACTGCTGAGCGTGA	GCCCATCAGGCAACTCGTAA	137
Beta-2-microglobulin	B2M	AGGCTATCCAGCGTACTCCA	CGGATGGATGAAACCCAGACA	105
Collagen I α 1	COL1A1	CCCCGAGGCTCTGAAGGT	GCAATACCAGGAGCACCATTG	140

RT quantitative PCR (RT-qPCR), was performed as previously described.¹⁵ Primer sequences are provided in Table 1. Relative quantification of all mRNAs of interest was performed based on the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.¹⁶

Pepsin digestion, sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and silver stain

Supernatants and cell layers from hVFF seeded in 24-well-plates were harvested separately and pepsinized as previously described.¹⁷ Briefly, 50 μ l of a pepsin stock solution (1 mg/mL dissolved in 1N HCL) were added to 500 μ L of supernatants, while a pepsin digestion solution (25% pepsin stock solution, 0.005% Triton X-100 in ddH₂O) was added to cell layers. All samples were incubated for 2 h followed by neutralization with 1 N NaOH.

Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed under non-reducing conditions using 3%–8% precast Criterion XT Tris-Acetate gels and XT Tricine running buffer (both Bio-Rad, Hercules, California, USA); electrophoresis was run for 70 min at 200 V. Vitro-Col, human collagen I solution served as collagen standard (0.16 μ g/lane). Gels were subsequently stained with the SilverQuest Silver Staining kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. Gel images were acquired using Quantity One software (Bio-Rad) and densitometric analysis of bands was performed using Image Lab Software, Version 5.2.

Western blot

Proteins were extracted from hVFF cell layers seeded in 6-well-plates and subjected to SDS-PAGE using 4%–12%

Criterion XT Bis-Tris Gels (Bio-Rad). SDS-PAGE was run at 200 V for 60 min, followed by electroblotting of proteins (90 min at 0.5 A and 4°C) onto Nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Immuno-detection was carried out in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween-20 (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and 5% milk. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies for detection of ACTA2 (#A5228, Sigma Aldrich, 1:1000) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; #2118C, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA, 1:5000). Subsequently, blots were incubated with secondary antibody (Goat Anti-Mouse 1:5000 for ACTA2; Goat Anti-Rabbit 1:5000 for GAPDH, both abcam, Cambridge, UK). Detection was conducted using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) and the ChemiDoc Touch Imaging System (bio-rad), densitometric analysis was performed using Image Lab Software, Version 5.2.

RESULTS

Validation of the MMC/TGF- β 1 model

We first validated the myofibroblast differentiation induced by TGF- β 1 combined with MMC (MMC/TGF- β 1) through the assessment of ACTA2 and Collagen I α 1 (COL1A1) contents in hVFF. Results from RT-qPCR analysis revealed that mRNA expression of ACTA2 and COL1A1 were significantly up-regulated under MMC/TGF- β 1 condition ($P = 0.019$ and $P = 0.002$ respectively) (Figure 1A and 2A) compared to the negative condition (untreated fibroblasts). Western blot and silver stain analysis performed on hVFF protein lysates were in line with the previous data: we

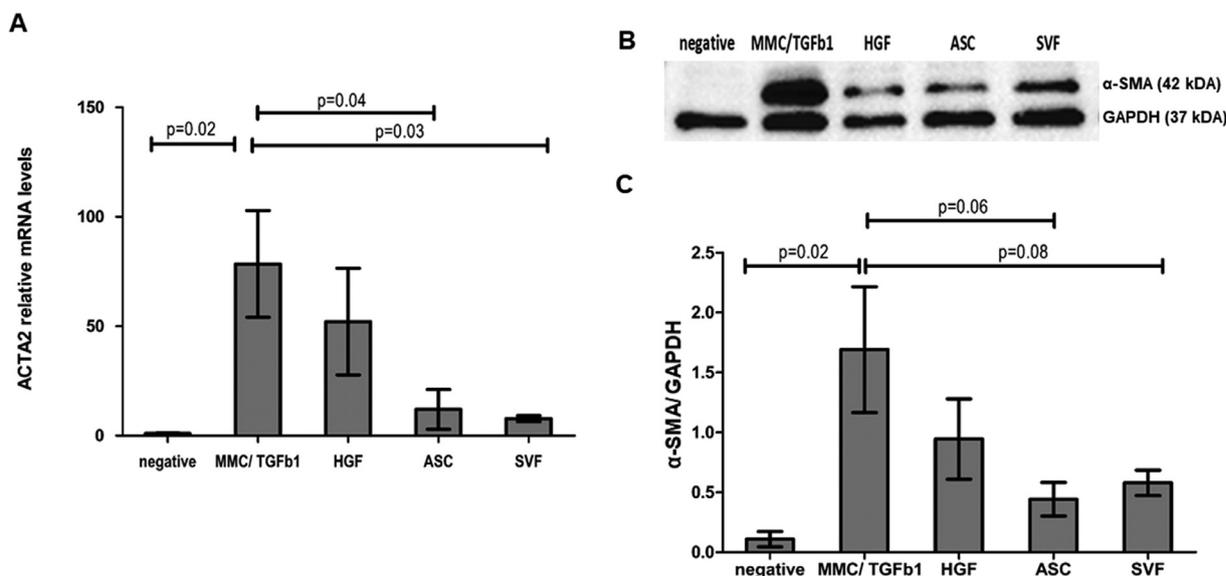


FIGURE 1. Expression of ACTA2 (also named α -SMA) (A) mRNA expression level of ACTA2 by RT-qPCR. Data is presented as mean \pm S.E.M.. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. (B) The protein level of ACTA2 was examined by Western blot analysis on whole cells lysates from hVFF after co-culture with ASC (n = 4) and SVF (n = 4). Representative blots for ACTA2 and GAPDH (loading control) are shown. (C) Densitometric data from ACTA2 protein levels. Data is presented as mean \pm S.E.M., normalized to GAPDH protein levels and relative to the untreated condition (negative). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test.

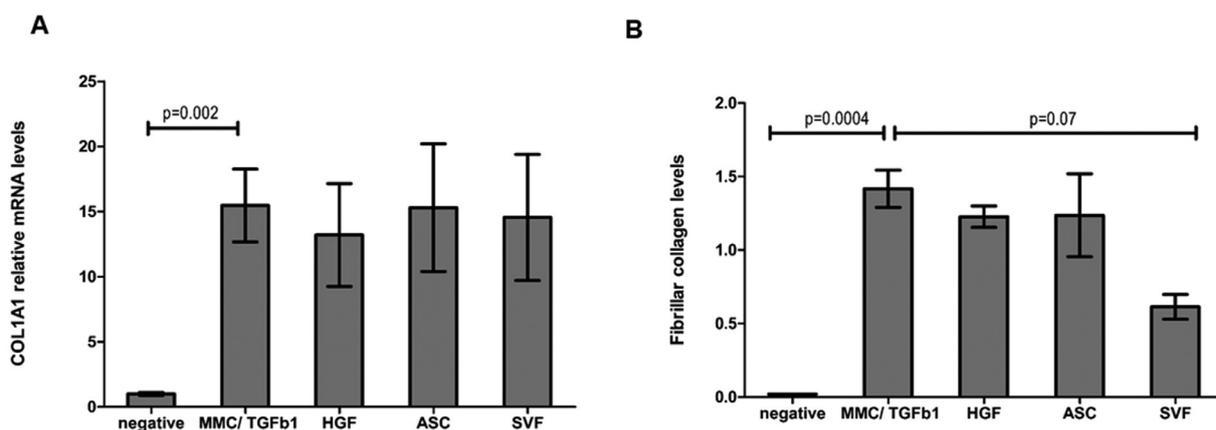


FIGURE 2. Expression of collagens (A) mRNA expression level of COL1A1 by RT-qPCR. Data is presented as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. (B) Densitometric data from fibrillar collagen I protein levels. Data is presented as mean \pm S.E.M., normalized to collagen I protein levels of alpha2 chain under crowded condition with TGF- β 1, and relative to the untreated condition (negative). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test.

observed a significant elevation of the ACTA2/GADPH ratio ($P = 0.024$) and of fibrillar collagen contents ($P = 0.0004$) in the MMC/TGF- β 1 condition compared to the untreated condition (Figure 1B and 1C). Altogether, these data validated the myofibroblast phenotype acquisition of immortalized hVFF after MMC/TGF- β 1 treatment.

Co-culture

The expression of the myofibroblast marker ACTA2 and collagen content of hVFF co-cultured with ASC or SVF or treated with HGF for 5 days were assessed. The results revealed a reduction in the mRNA level of ACTA2 on hVFF when they were co-cultured with ASC and SVF ($P = 0.043$ and $P = 0.028$ respectively) (Figure 1A). Western blot analysis confirmed these results highlighting a tendency to reduce the level of ACTA2 in hVFF co-cultured with both ASC and SVF ($P = 0.061$ and $P = 0.083$ respectively) (Figure 1B and 1C).

Figure 2 represents the expression of mRNA of COL1A1 and fibrillar collagen in protein lysates of hVFF. We observed no significant reduction in the COL1A1 mRNA expression (Figure 2A) in both ASC and SVF co-culture conditions whereas silver stain analysis revealed a significant reduction of fibrillar collagen content in hVFF after co-culture with SVF ($P = 0.006$) (Figure 2B). Of note, no significant reduction of ACTA2 or collagen levels were obtained when hVFF were treated with HGF (Figure 1 and 2).

DISCUSSION

Vocal fold scarring remains one of the most difficult conditions to treat among benign VF diseases and adipose-derived cell therapies represent hope for these patients. The therapeutic potential of MSC has largely been attributed to paracrine activity.^{18,19} In this study, we demonstrated that adipose derived stromal cells (ASC) and stromal Vascular Fraction (SVF) promoted significant prevention of fibrosis in an *in vitro* model through paracrine mechanisms.

Previously, a similar study explored whether ASC have therapeutic potential for treating vocal fold scarring through the effects of HGF on scar fibroblasts in an indirect co-culture model.³ They showed that co-culture with ASC led to a significant decrease of ACTA2 expression in fibroblasts comforting our data. However, they also demonstrated a reduction in collagen production in the ASC co-culture conditions whereas, in our study, we did not observe significant effect of ASC on the fibrillar collagen content.

Compared with ASC, SVF can be real time obtained in a sufficient quantity without *in vitro* culture, reducing drastically the delay of preparation. Yasuda et al. reported that injection of SVF had a protective effect in an acute kidney injury *in vivo* model by secreting renoprotective molecules, such as HGF and VEGF.²⁰ We can hypothesize that in the present study, SVF and ASC reduced the ACTA2 and collagen expression in hVFF partly by secreting those growth factors transferred through the co-culture system. Only conditions with SVF showed a reduction in both ACTA2 and collagen contents which might be attributed to the higher secretion of soluble mediators by SVF. In line with this, the secretome of ASC and SVF has been compared recently and revealed that SVF released a greater variety of cytokines or soluble proteins at significantly higher amounts as compared with ASC.²¹

ACTA2 was downregulated on mRNA and protein-levels, but collagen was only significantly down-regulated by SVF at the level of fibrillar collagen, that was quantified by silver stain analysis. On COL1A1 mRNA level, no reduction was detected. This could be explained by the complex extracellular assembly of different types of collagen produced by fibroblast as part of the ECM and involved in the fibrosis process.

Several *in vivo* studies on animals reported significant improvements in scarred vocal folds after injection of ASC (immediately after injury or at a longer interval) in both histological and macroscopic aspects of the vocal folds²² with an excellent tolerance of the procedure. A first clinical trial

of SVF injection which enrolled 8 patients was recently reported by our group²³ suggesting a clear improvement in the majority of the vocal parameters obtained at 12 months. However, the etiology of vocal fold scarring is very heterogeneous so a better understanding of the mechanisms underlying the efficacy of ASC and SVF is mandatory. In addition, identification of *in vitro* potency assay able to anticipate the anti-fibrotic potential of the cell therapy product could allow a better selection of patients who can benefit from these innovative therapies.

CONCLUSIONS

Based on our results, it appears that adipose derived-cellular therapies are interesting candidates for reducing myofibroblast phenotype acquisition. Nevertheless, global approaches to further characterize ASC and SVF anti-fibrotic potential and studies on a large scale are further needed to better characterize the mechanisms of action.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Data interpretation: MV, AM, SS, JM, AG, FDG, FS, MG, TG; Revise the manuscript: JM, FDG, FS, MG, TG; All authors read and approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

None.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All patients provided informed consent for the scientific use of surgical residues.

REFERENCES

- Hantzakos A, Dikkers FG, Giovanni A, et al. Vocal fold scars: a common classification proposal by the American Laryngological Association and European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019;276:2289–2292.
- Friedrich G, Dikkers FG, Arens C, et al. Vocal fold scars: current concepts and future directions. Consensus report of the phonosurgery committee of the European laryngological society. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270:2491–2507.
- Kumai Y, Kobler JB, Park H, et al. Modulation of vocal fold scar fibroblasts by adipose-derived stem/stromal cells. *Laryngoscope.* 2010;120:330–337.
- Graupp M, Bachna-Rotter S, Gerstenberger C, et al. The unsolved chapter of vocal fold scars and how tissue engineering could help us solve the problem. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016;273:2279–2284.
- Suehiro A, Hirano S, Kishimoto Y, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on rat vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2010;119:690–696.
- Kishimoto Y, Hirano S, Kitani Y, et al. Chronic vocal fold scar restoration with hepatocyte growth factor hydrogel. *Laryngoscope.* 2010;120:108–113.
- Graupp M, Rinner B, Frisch MT, et al. Towards an *in vitro* fibrogenesis model of human vocal fold scarring. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018;275:1211–1218. <https://doi.org/10.1007/s00405-018-4922-7>.
- Hirano S, Kawamoto A, Tateya I, et al. A phase I/II exploratory clinical trial for intracordal injection of recombinant hepatocyte growth factor for vocal fold scar and sulcus. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12:1031–1038.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4:267–274.
- Liang X, Ding Y, Zhang Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant.* 2014;23:1045–1059.
- Dykstra JA, Facile T, Patrick RJ, et al. Concise review: fat and furious: harnessing the full potential of adipose-derived stromal vascular fraction. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6:1096–1108.
- Graupp M, Gruber H-J, Weiss G, et al. Establishing principles of macromolecular crowding for *in vitro* fibrosis research of the vocal fold lamina propria: MMC for vocal fold fibrosis research. *Laryngoscope.* 2015;125:E203–E209.
- Chen X, Thibeault SL. Novel isolation and biochemical characterization of immortalized fibroblasts for tissue engineering vocal fold lamina propria. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15:201–212.
- Granel B, Daumas A, Jouve E, et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:2175–2182.
- Karbiener M, Darnhofer B, Frisch M-T, et al. Comparative proteomics of paired vocal fold and oral mucosa fibroblasts. *J Proteomics.* 2017;155:11–21.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25:402–408.
- Steinmann B, Rao VH, Vogel A, et al. Cysteine in the triple-helical domain of one allelic product of the alpha 1(I) gene of type I collagen produces a lethal form of osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem.* 1984;259:11129–11138.
- Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther.* 2014;143:181–196.
- Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007;110:3499–3506.
- Yasuda K, Ozaki T, Saka Y, et al. Autologous cell therapy for cisplatin-induced acute kidney injury by using non-expanded adipose tissue-derived cells. *Cytotherapy.* 2012;14:1089–1100.
- Hirose Y, Funahashi Y, Matsukawa Y, et al. Comparison of trophic factors secreted from human adipose-derived stromal vascular fraction with those from adipose-derived stromal/stem cells in the same individuals. *Cytotherapy.* 2018;20:589–591.
- Mattei A, Magalon J, Bertrand B, et al. Cell therapy and vocal fold scarring. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2017;134:339–345.
- Mattei A, Bertrand B, Jouve E, et al. Feasibility of first injection of autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction in human scarred vocal folds: a nonrandomized controlled trial. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;146:355–363.

3. Article original 3

Dans quelle mesure le potentiel paracrine de CSM isolées du tissu adipeux est-il impacté par la ScS ?

Adipose-derived stem cells from systemic sclerosis patients maintain pro-angiogenic and antifibrotic paracrine effects in vitro

Mélanie Velier, Stéphanie Simoncini, Maxime Abellan, Pauline Francois, Sandy Eap, Anaïs Lagrange, Baptiste Bertrand, Aurélie Daumas, Brigitte Granel, Bruno Delorme, Françoise Dignat-George, Jérémy Magalon, Florence Sabatier

Journal of Clinical Medicine, Novembre 2019

La mise en évidence d'une réduction, bien que peu importante, de l'activité angiogénique de la FVS de patients sclérodermiques *in vitro*, ainsi que l'existence d'une signature transcriptomique différentielle affectant la composante mésenchymateuse, incitent à rechercher une éventuelle altération des propriétés des CSM issues de patients sclérodermiques.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer les propriétés antifibrotiques et pro-angiogéniques des CSM isolées du TA ou en anglais dites *Adipose Stromal/Stem Cells* (ASC) en contexte sclérodermique. Pour cela, nous avons utilisé des modèles *in vitro* de co-culture indirecte avec des cellules cibles (cellules endothéliales ou fibroblastes) puisque les activités paracrines des CSM ont une contribution essentielle à leurs propriétés thérapeutiques.

Ainsi, nous avons isolé les ASC de donneurs sains et de patients sclérodermiques par mise en culture de FVS afin de pouvoir les caractériser plus spécifiquement. Nous rapportons ici que les propriétés cardinales des ASC de patients sclérodermiques (phénotype, expansion en culture et capacité de différenciation en adipocytes et chondrocytes) sont similaires à celles d'ASC saines. De plus, l'analyse de l'expression de la β -galactosidase et de transcrits d'intérêt (p21, p53 et p16) montre que la ScS n'induit pas un phénotype plus sénescence des ASC. Aussi, l'analyse du profil sécrétoire ne rapporte pas de différence significative sur cinq molécules impliquées dans le potentiel angiogénique et antifibrotique.

Après co-culture avec des ASC saines ou sclérodermiques, le potentiel angiogénique des cellules endothéliales microvasculaires stimulées a été évalué dans des tests *in vitro*

(sphéroïdes et Matrigel®). Les résultats indiquent que les ASC de patients sclérodermiques maintiennent un effet angiogénique paracrine important sur les cellules endothéliales, bien que cet effet soit significativement réduit par rapport à celui d'ASC saines.

Enfin, la stimulation de fibroblastes dermiques sclérodermiques (isolés de résidus dermo-épidermiques) par des ASC issues de patients sclérodermiques dans des modèles de co-culture avec insert, conduit à une réduction des marqueurs de fibrose (α SMA et collagène). De façon intéressante, le potentiel antifibrotique des ASC sclérodermiques semble supérieur à celui d'ASC saines ; en faveur d'une adaptation spécifique des ASC en réponse à l'environnement sclérodermique.



Article

Adipose-Derived Stem Cells from Systemic Sclerosis Patients Maintain Pro-Angiogenic and Antifibrotic Paracrine Effects In Vitro

Mélanie VELIER ^{1,2,*}, Stéphanie SIMONCINI ¹, Maxime ABELLAN ³, Pauline FRANCOIS ^{1,2}, Sandy EAP ⁴, Anaïs LAGRANGE ⁴, Baptiste BERTRAND ³, Aurélie DAUMAS ^{1,5}, Brigitte GRANEL ^{1,5}, Bruno DELORME ⁴, Françoise DIGNAT GEORGE ¹, Jérémy MAGALON ^{1,2}  and Florence SABATIER ^{1,2,*}

¹ Aix Marseille University, INSERM, INRA, C2VN, 13005 Marseille, France; stephanie.simoncini@univ-amu.fr (S.S.); pauline.francois@ap-hm.fr (P.F.); aurelie.daumas@ap-hm.fr (A.D.); brigitte.granel@ap-hm.fr (B.G.); francoise.dignat-george@univ-amu.fr (F.D.G.); jeremy.magalon@ap-hm.fr (J.M.)

² Cell Therapy Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, INSERM CIC BT 1409, 13005 Marseille, France

³ Plastic Surgery Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, 13005 Marseille, France; maxime.abellan-lopez@ap-hm.fr (M.A.); baptiste.bertrand@ap-hm.fr (B.B.)

⁴ R&D Department, Macopharma, 59420 Mouvaux, France; sandy.eap@macopharma.com (S.E.); anais.lagrange@macopharma.fr (A.L.); bruno.delorme@macopharma.fr (B.D.)

⁵ Internal Medicine Department, Hôpital Nord & Hôpital de la Timone, AP-HM, 13005 Marseille, France

* Correspondence: melanie.velier@ap-hm.fr (M.V.); florence.sabatier@ap-hm.fr or florence.sabatier@univ-amu.fr (F.S.)

Received: 4 October 2019; Accepted: 12 November 2019; Published: 14 November 2019



Abstract: Innovative therapies based on autologous adipose-derived stem/stromal cells (ASC) are currently being evaluated for treatment of systemic sclerosis (SSc). Although paracrine angiogenic and antifibrotic effects are considered the predominant mechanisms of ASC therapeutic potential, the impact of SSc on ASC paracrine functions remains controversial. In this study, phenotype, senescence, differentiation potential, and molecular profile were determined in ASC from SSc patients (SSc-ASC) ($n = 7$) and healthy donors (HD-ASC) ($n = 7$). ASC were co-cultured in indirect models with dermal fibroblasts (DF) from SSc patients or endothelial cells to assess their pro-angiogenic and antifibrotic paracrine effects. The angiogenic activity of endothelial cells was measured in vitro using tube formation and spheroid assays. DF collagen and alpha smooth muscle actin (α SMA) content were quantified after five days of co-culture with ASC. Differentiation capacity, senescence, and mRNA profiles did not differ significantly between SSc-ASC and HD-ASC. SSc-ASC retained the ability to stimulate angiogenesis through paracrine mechanisms; however, functional assays revealed reduced potential compared to HD-ASC. DF fibrosis markers were significantly decreased after co-culture with SSc-ASC. Together, these results indicate that SSc effects do not significantly compromise the angiogenic and the antifibrotic paracrine properties of ASC, thereby supporting further development of ASC-based autologous therapies for SSc treatment.

Keywords: systemic sclerosis; adipose derived stromal/stem cells; paracrine effect; angiogenesis; antifibrotic

1. Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a rare and multifaceted systemic autoimmune disease. Although SSc pathogenesis remains elusive, it is generally accepted that initial vascular injury due to autoimmunity

can result in constitutive activation of fibroblasts and fibrosis affecting skin and multiple organs. The interaction of these three processes results in a polymorphous spectrum of clinical and pathologic manifestations of SSc [1]. In rapidly progressive SSc forms, mortality rates reach 30–50% within the first five years of disease onset depending on the extent of skin, the cardiopulmonary, and the renal involvement [2]. Current therapeutic approaches are insufficient to halt the evolution of the disease and cure fibrosis lesions that have already formed. To date, no treatment has offered any benefit to patients with severe forms of SSc, with the exception of autologous hematopoietic stem cell transplantation, which significantly reduces mortality but displays high toxicity [3–5]. In this context, innovative cell-based therapies are currently being developed in the hope that they may confer long-term benefits with higher tolerance. Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) are multipotent progenitors that can be isolated from several tissues including bone marrow, adipose, umbilical cord, or placenta tissues [6]. The discovery of MSC's trophic and immunomodulatory properties has accelerated the development of MSC-based therapies in regenerative medicine and for the treatment of autoimmune diseases [7]. MSC also exhibit antifibrotic [8] and angiogenic [9] capacities, which may counteract the main pathogenic mechanisms of SSc. MSC therapeutic potential has largely been attributed to paracrine activity. Soluble mediators and extracellular vesicles produced by MSC play a pivotal role in immunomodulation and tissue repair [10]. Adipose tissue MSC are abundant and easy to harvest, and adipose-derived stromal/stem cells (ASC) have been assessed in several SSc models *in vivo* with promising results. Three studies tested ASC in a bleomycin-induced SSc model and showed a reduction or prevention of lung fibrosis [11–13]. ASC from healthy donors (HDs) have been shown to reduce fibrotic and inflammatory markers and promote matrix remodeling in skin and lungs using a hypochlorous acid (HOCl) murine model of diffuse SSc [14].

Early phase clinical trials evaluating local injections of autologous ASC in the faces or the hands of SSc patients have yielded encouraging results. Transplantation of ASC in a hyaluronic acid solution significantly improved tightened skin [15]. Another study compared fat grafting and injection of autologous ASC in the mouths of SSc patients with functional disability and obtained satisfactory results with both procedures in terms of mouth opening and pain reduction [16]. Our research group reported the safety and the efficacy of an autologous adipose-derived stromal vascular fraction composed mainly of uncultured ASC in treating hand disability and Raynaud syndrome among SSc patients [17,18]. However, autologous MSC-based therapies remain controversial [19–22], notably concerning potential alteration of cells from SSc patients. Although most of these studies have focused on bone-marrow-derived MSC, ASC-based therapies are also controversial. Recent reports of altered molecular signatures in ASC from SSc patients have suggested compromise of their angiogenic and ant-fibrotic activity [23–25]; however, few functional studies have been conducted.

Since paracrine effects are considered the predominant mechanism mediating therapeutic activity in ASC, the aim of this study was to investigate the extent to which SSc affects paracrine angiogenic and antifibrotic effects in ASC.

2. Experimental

2.1. Donor Specifications

ASC from healthy donors (HD-ASC; $n = 7$) were obtained from adipose tissue surgical residues following liposuction for aesthetic purposes. ASC from SSc patients (SSc-ASC; $n = 7$) were obtained from adipose tissue surgical residues following routine care lipotransfer. All patients and HD provided informed consent for the scientific use of surgical residues.

2.2. ASC Isolation and Expansion

Adipose tissue harvesting was performed using a standardized method in a closed circuit with a 3 mm cannula (Coleman). Upon the completion of harvesting, the bag was immediately transported to a registered cell-therapy unit. The collected lipoaspirate was washed with Ringer's lactate solution

(Baxter Inc., Opelika, AL, USA) and enzymatically digested with 0.25 U/mL collagenase NB 5 (SERVA) for 45 min at 37 °C. Cells were concentrated, washed, aseptically recovered, and resuspended in Ringer's lactate solution. The cell suspension was then plated into a T75 flask in Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham's F-12 Nutrient Mixture (DMEM/F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic solution. The culture medium was changed every 48 h until 80% confluence was reached. Adherent cells were then detached with trypsin-EDTA and passaged to extend the culture. ASC from passages 3–5 were used for all experiments.

2.3. Phenotypic Analysis

The expression of a panel of surface markers was assessed following previously described protocols (26). For each antigen, 200,000 cells resuspended in cold phosphate-buffered saline (PBS) were incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody at saturating concentration for 30 min in the dark at 4 °C. Antibodies and isotype controls were purchased from Becton-Dickinson (CD29, CD34, CD40, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, IgG1, and IgG2b) or Beckman Coulter (CD80, CD86, and HLA-DR). Appropriate PE-conjugated isotype-matched controls were included. Cells were then washed twice with PBS Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ by centrifugation at 300 g for 5 min. Labeled HD-ASC and SSc-ASC were finally resuspended in 200 µL CellFix (Becton-Dickinson) and processed immediately for flow cytometric analysis. Acquisitions were performed using an ACCURI C6 flow cytometer equipped with 488 nm argon laser (Becton-Dickinson). At least 10,000 events were recorded for each analysis. Data were analyzed using the BD CSampler software (Becton-Dickinson, version 1.0.264.21). Results were recorded as percentage of positivity and ratio of mean fluorescence intensity (rMFI)—the ratio of MFI (PE-conjugated monoclonal antibody) to MFI (appropriate isotype control).

2.4. Differentiation Potential

Adipogenic and osteogenic differentiation capacities were assessed by seeding HD-ASC and SSc-ASC at 10,000 cells/cm² on an appropriate surface, including 12-well plates, 24-well plates, and T25 flasks. Adipogenic differentiation and osteogenic differentiation were induced using specific induction media. Adipogenic differentiation was induced using low-glucose DMEM supplemented with 10% FBS, 1 µM dexamethasone (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich), and 60 µM indomethacine (Sigma-Aldrich). After 14 days of culture, adipogenic differentiation was examined using Oil Red O staining, as previously described [26,27]. Briefly, the cell layer was stained with 1.8 g/L Oil Red O (Sigma-Aldrich) for 30 min. Lipid droplets in the cytoplasm were stained red. Triglyceride accumulation was quantified using a commercially available kit according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cell layer was washed with PBS and incubated with the AdipoRed reagent (Lonza) for 10 min. Fluorescence was measured using a spectrometer (Infinite M200 PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland) with an excitation wavelength of 485 nm, an emission wavelength of 572 nm, and a gain of 90. The results were analyzed using i-Control microplate reader software (Tecan, version 3.1.9.0).

After 21 days of culture, osteogenic differentiation was examined using Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), as previously described [26,27]. Osteogenic differentiation was induced using high-glucose DMEM supplemented with 10% FBS, 0.1 µM dexamethasone, 25 µg/mL L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich), and 3 mM NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich). Briefly, the cell layer was stained with 2% Alizarin Red S at pH 4.3 (Sigma-Aldrich) for 30 s to 5 min. The staining reaction was stopped with distilled water. Calcium deposits were stained reddish-orange. Calcium content was measured using a commercially available kit (Interchim) following the manufacturer's instructions. Following differentiation of HD-ASC and SSc-ASC under the tested culture conditions, expression of specific differentiation markers was assessed using quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) using the SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a PrimePCR assay (Bio-Rad), and cDNA in a CFX 1000 Touch system (Bio-Rad). Amounts of fatty

acid-binding protein 4 (FABP4) and alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL) were normalized to that of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, $\Delta C_T = C_{T(\text{gene of interest})} - C_{T(\text{GAPDH})}$).

2.5. Senescence-Associated β Galactosidase (SA- β -Gal) Staining

SA- β -Gal activity was evaluated using the Promokine senescence detection kit (PromoCell) according to the manufacturer's instructions. The percentage of SA- β -Gal positive cells was determined in 10 randomly selected microscopic fields (20 \times magnification) per well.

2.6. Cell Cycle Analysis

Cell cycle analysis was conducted by using a propidium iodide-based flow cytometry method. ASC (100,000 cells/well in six-well culture dishes) were incubated for 48 h in basal medium, harvested, fixed with 70% cold ethanol, and stained with propidium iodide. At least 10,000 events were acquired per sample using a Gallios flow cytometer system and were analyzed using Kaluza analysis software (Beckman Coulter, Kaluza Analysis 2.1).

2.7. Analysis of ASC Secretome

ASC were seeded at a density of 100,000 ASC/well in six-well culture dishes with DMEM/F-12 supplemented with 10% FBS for 24 h; the medium was then replaced with 1 mL DMEM supplemented with 1% FBS. The conditioned medium was recovered after 48 h and then centrifuged at 300 g for 5 min. Quantification of soluble factors including vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), hepatocyte growth factor (HGF), and transforming growth factor β 1 (TGF β 1) was performed using the Luminex method following the manufacturer's instructions; 96-well plates were run on a Bio-Plex MAGPIXTM multiplex reader using Bio-Plex Manager software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Concentrations were calculated based on seven-point standard curves using a five-parametric fit algorithm. Only data that fell within the documented assay range and passed the quality control standards provided by the manufacturer were considered.

2.8. qRT-PCR Analysis

Total RNA was isolated from HD-ASC and SSc-ASC using RNeasy mini kits (Ambion), including a DNase I digestion step to remove genomic DNA. Concentrations were determined using a spectrophotometer (NanoVue, Biochrom). We converted 60 ng RNA to cDNA using a high-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Real-time PCR amplification was performed using Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) with pre-designed primers (Applied Biosystems) on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The cycling conditions were as follows: 2 min at 50 °C (uracil-N-glycosylase (UNG) incubation), 2 min at 95 °C (polymerase activation), 40 cycles of 1 s at 95 °C (denaturation), and 20 s at 60 °C (annealing/elongation). The primers used for gene-specific amplification are described in Table 1. Threshold cycle (CT) values of technical duplicates were averaged, and relative quantification of all mRNAs of interest was performed based on the $2^{-\Delta C_T}$ method for mRNA GAPDH expression.

Table 1. References of primers used for RT-qPCR experiments.

Gene Abbreviation	Reference
α SMA	Hs00426835_g1
COL1A1	Hs00164004_m1
COL3A1	Hs00943809_m1
MMP-2	Hs01548727_m1
MMP-1	Hs00899658_m1
TIMP-1	Hs01092512_g1
TGF β 1	Hs00998133_m1
HGF	Hs00300159_m1
VEGF-A	Hs00900055_m1
p16 ^{INK4}	Hs00233365_m1
p21 ^{WAF}	Hs00355782_m1
p53	Hs1034249_m1
GAPDH	Hs02786624_g1

α SMA: alpha smooth muscle actin, COL1A1: collagen type I alpha 1, COL3: collagen type 3, MMP-1 and MMP-2: matrix metalloproteinase 1 and 2, TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TGF β 1: transforming growth factor beta 1, HGF: hepatocyte growth factor, VEGF-A: vascular endothelial growth factor A, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase.

2.9. Co-Culture Conditions

ASC from HD and SSc patients were co-cultured with dermal fibroblasts (DF) from SSc patients. DF were isolated after enzymatic digestion (collagenase NB 5, 0.25 U/mL for 45 min at 37 °C) of a skin biopsy and seeded at a density of 15,000 cells/cm² dishes in DMEM supplemented with 10% PBS. The medium was replaced with DMEM supplemented with 0.5% FBS 24 h later. On the following day, 288,000 ASC were placed in the top chamber using a transwell insert (Greiner) with a 0.4 μ m pore diameter to permit cytokine movement between chambers. After five days of co-culture, Western blot assays and collagen quantification were performed on fibroblast lysate.

HD-ASC and SSc-ASC were co-cultured with adult human microvascular dermal endothelial cells (HMVEC-dA; C-12212, Promocell) in an indirect co-culture model using a 0.4 μ m pore diameter transwell insert for 24 h. HMVEC-dAs were seeded in six-well culture dishes at a density of 10,500/cm². They were then incubated overnight with endothelial basal cell culture medium 2 (C-22211, Promocell) supplemented with 1% PBS. On the following day, we placed 600,000 ASC in the top chamber using a 0.4 μ m pore diameter transwell insert for 24 h. HMVEC-dA were then trypsinized and tested immediately in angiogenic (tube formation and spheroid) in vitro assays.

2.10. Western Blot Analysis

Proteins were extracted from cell layers in six-well-plates and subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide-based discontinuous gel electrophoresis (SDS–PAGE) using NuPAGE 4–12% Bis-Tris Protein Gels (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). SDS-PAGE was performed at 200 V for 60 min followed by protein electroblotting (90 min at 0.5 A and 4 °C) onto nitrocellulose C+ membranes. Immunodetection was performed in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween-20 and 3% bovine serum albumin (BSA). Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies to detect alpha smooth muscle actin (α -SMA; A5228, Sigma Aldrich) and GAPDH (2118C, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Blots were then incubated with secondary goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Abcam, Cambridge, UK) for 1 h at room temperature. Immunocomplexes were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL, USA). Specific bands were detected using a G-BOX Imaging System (GeneSys, Cambridge, UK), and the optical density (OD) of each band was measured using GeneTools software (Syngene, version 4.03.05.0). All proteins for each panel were assessed on one membrane; thus, GAPDH expression was determined once for all proteins to control for loading. For each sample, differences between proteins of interest and the control loading protein were calculated as relative content and are

presented graphically. For statistical analyses, signals were further normalized with the control group (untreated DF).

2.11. Collagen Content Quantification

Proteins were extracted from cell layers in six-well-plates after five days of co-culture with ASC based on the Sircol quantitative dye-binding method (Biocolor). Samples were centrifuged at $12,000\times g$ for 5 min, and 80 μL of each sample was added to 1 mL Syrius red reagent. Tubes were rocked at room temperature for 30 min and centrifuged at $12,000\times g$ for 10 min. Supernatants were discarded, and tubes washed with 750 μL ice-cold salt acid. After another $12,000\times g$ centrifugation for 10 min, collagen–dye pellets were suspended in 1 mL alkali reagent. Sample ODs and the standard range of bovine collagen type I concentration were read at 555 nm using a microplate reader (Multiskan Ascent, Thermo Electron, Illkirch, France). Data are expressed as collagen content (μg).

2.12. Tube Formation Assays

HMVEC-dA resulting from co-culture with HD-ASC ($n = 4$) and SSc-ASC ($n = 6$) were loaded at a density of 20,000 cells/well in a μ -slide angiogenesis (81506, IBIDI) system coated with 10 μL 6 mg/mL growth factor-reduced, phenol red-free Matrigel Basement Membrane Matrix (356231, Corning), previously polymerized for 30 min, and maintained in endothelial cell basal medium 2 (EBM2) supplemented with microvascular SingleQuot (EGM2-MV; Lonza) at 37 °C with 5% CO_2 . Capillary-like structures were recorded after 6 h using a video-imaging inverted microscope (DMI8, Leica, Heidelberg, Germany equipped with an I8 incubator at 5 \times magnification; images were analyzed using Leica Application Suite X software (Las X v. 3.0.2.16120). Mesh and node numbers were quantified using ImageJ software with the Angiogenesis Analyzer plug-in. Each experiment was performed in triplicate.

2.13. Spheroid-Based Sprouting Assay

Angiogenic sprouting was analyzed in vitro using the stromal vascular fraction (SVF) in a collagen gel matrix, as previously described [28]. Briefly, HMVEC-dA resulting from co-culture with HD-ASC ($n = 4$) and SSc-ASC ($n = 6$) were suspended in culture medium containing 0.2% (wt/vol) carboxymethylcellulose (M0512, Sigma Aldrich), which was then seeded in non-adherent round-bottom 96-well plates (82.1582.001, Sartstedt), leading to spheroid formation with a defined cell number. After 24 h, spheroids were collected and embedded in collagen gels (354236, rat tail Collagen I, Corning). The spheroid-containing gel was rapidly transferred onto pre-warmed Labtek II slides (NUNC 54534, Thermo Fisher) and allowed to polymerize (30 min); 100 μL of the resulting medium from each co-culture was added to the top of the gel. After 24 h of culture, spheroids were fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde at room temperature. After washing and permeabilization for 2 h at 4 °C with PBS supplemented with 0.1% Triton X-100 and 1% BSA, spheroids were immunolabeled overnight at 4 °C with phalloidin coupled to Alexa-647 (A22287, Thermo Fisher Scientific) (1/100), and nuclei were stained with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1/5000) diluted with PBS supplemented with 1% BSA. After washing, we captured a fluorescent optical image stack along the z-axis at 20 \times magnification using two lasers in sequential mode under a Leica DMI8 microscope ($n = 10$ spheroids per condition). Las X software was used for all image-acquisition procedures. Prior to image measurements, we performed image processing using Huygens Essential deconvolution software (Scientific Volume Imaging, version 18.04 version number) with up to 40 iterations of the classical maximum likelihood estimation algorithm and a theoretical point spread function and automatic background correction. The images were then analyzed using the Sprout Analysis plug-in in the ImageJ Fiji distribution [29] to evaluate total network length and average sprout length.

2.14. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and IBM SPSS software package (SPSS Statistics for Windows, version 17.0). Quantitative variables are reported as means \pm standard deviation (SD) or median with range according to the normality of their distribution. Continuous variables were compared using Student's *t*-test or the nonparametric Mann–Whitney *U*-test. To compare more than two groups, we used one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc Bonferroni test for multiple comparisons. Significance was determined at a level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Patient Characteristics

Baseline characteristics of HD and SSc patients are summarized in Table 2.

Table 2. Baseline characteristics of systemic sclerosis (SSc) patients and healthy donors (HD).

	SSc Patients	HD
Gender F/M	7/0	7/0
Age (years, mean \pm SD)	45.8 \pm 14.2	42.3 \pm 13.1
Body mass index (kg/m ² , mean \pm SD)	22.5 \pm 2.74	25.9 \pm 3.11
Tobacco (yes/no)	1/6	3/4
Arterial hypertension (yes/no)	0/7	0/7
SSc subclassification (Diffuse/Limited)	4/3	NA

NA: Not Applicable, SSc: Systemic Sclerosis, HD: Healthy Donors, F: Female, M: Male.

3.2. ASC Characterization

3.2.1. Morphology and Phenotype

ASC were characterized according to International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) criteria. During cellular expansion, HD-ASC and SSc-ASC were small, fusiform, spindle-shaped, plastic-adherent cells (Figure 1A), a typical morphology for mesenchymal stem/stromal cells [30]. We then analyzed membrane marker expression among HD-ASC and SSc-ASC in accordance with ISCT guidelines [31]. Our results showed that both cell populations expressed typical mesenchymal stromal cell membrane markers (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, and CD105) and did not express hematopoietic markers (CD34 and CD45) or major histocompatibility complex class II markers (HLA-DR). We also verified that culture conditions did not induce expression of co-stimulatory molecules. Both HD-ASC and SSc-ASC were found to be negative for CD40, CD80, and CD86 marker expression (Table 3). Results are presented in percentage of positive cells and ratio of mean fluorescence intensity (rMFI) of each marker to the respective isotype control (means \pm SD). Statistical analysis were performed on rMFI results (F-test followed by *t*-test).

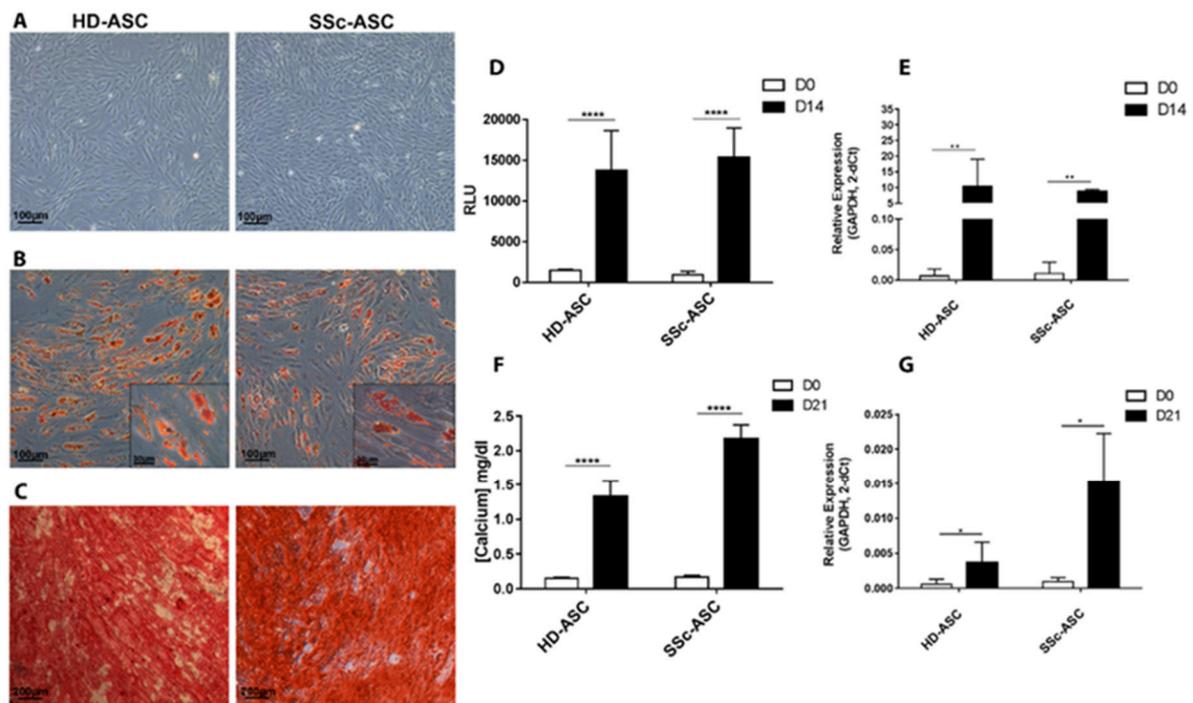


Figure 1. Adipogenic and osteogenic differentiation capacity of ASC from Healthy donors (HD-ASC) and from SSc patients (SSc-ASC). Representative images of HD-ASC and SSc-ASC (A) before differentiation (10× magnification), (B) after further differentiation into the adipogenic lineage and stained with Oil Red O (10× and 40× magnification), (C) and after further differentiation into the osteogenic lineage and stained with Alizarin Red S (5× magnification). (D) Accumulation of triglycerides before (D0) and after differentiation into the adipogenic lineage (D14). (E) mRNA level of FABP4 before (D0) and after differentiation into the adipogenic (D14), assessed using RT-qPCR. (F) Calcium content in cell lysates before (D0) and after differentiation into the osteogenic lineage (D21). (G) mRNA level of (ALPL) in HD-ASC and SSc-ASC before (D0) and after differentiation into the osteogenic lineage (D21), assessed using RT-qPCR. Statistical analysis was carried out with a two-way ANOVA test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$.

Table 3. Expression of membrane markers by HD-ASC (adipose-derived stem/stromal cells) and SSc-ASC assessed by flow cytometry.

Membrane Marker	% of Positive Cells ± SD		rMFI (Ratio of Mean Fluorescence Intensity) ± SD		Statistical Analysis
	HD-ASC	SSc-ASC	HD-ASC	SSc-ASC	<i>p</i> -Value
CD40	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.97 ± 0.11	0.88 ± 0.01	NS
CD34	0.35 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.97 ± 0.16	0.93 ± 0.02	NS
CD45	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.94 ± 0.09	0.98 ± 0.03	NS
HLA-DR	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.93 ± 0.05	0.95 ± 0.02	NS
CD80	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.14 ± 0.10	1.00 ± 0.02	NS
CD86	0.07 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.95 ± 0.09	1.01 ± 0.03	NS
CD29	78.03 ± 0.14	60.07 ± 0.29	16.76 ± 6.22	15.23 ± 6.99	NS
CD105	80.05 ± 0.13	72.58 ± 0.22	16.86 ± 6.95	22.38 ± 13.65	NS
CD73	98.24 ± 0.00	97.32 ± 0.04	41.34 ± 1.73	46.71 ± 10.99	NS
CD90	99.07 ± 0.01	97.52 ± 0.03	186.35 ± 31.57	171.04 ± 35.40	NS
CD44	98.95 ± 0.01	99.79 ± 0.00	127.78 ± 14.44	161.73 ± 16.12	NS
CD13	99.83 ± 0.00	99.92 ± 0.00	250.33 ± 106.47	352.41 ± 126.74	NS

SSc-ASC: ASC from SSc patients, HD-ASC: ASC from HD, NS: not significant, HLA-DR: human leukocyte antigen-DR, CD: cluster of differentiation, SD: standard deviation.

3.2.2. Differentiation

The differentiation potential of HD-ASC and SSc-ASC toward adipogenic and osteogenic lineages after appropriate induction was investigated (Figure 1). Oil Red O staining revealed that HD-ASC and SSc-ASC efficiently differentiated into the adipogenic lineage (Figure 1B). Under adipogenic induction, cells appeared larger and more oval, and large lipid droplet accumulation was observed within the cytoplasm (stained red). Triglyceride quantification showed significant accumulation after 14 days of differentiation regardless of the cellular population studied (Figure 1D). Expression of FABP4, an adipogenic-specific gene, was analyzed using RT-PCR after cell expansion in an FBS + bFGF medium before (day 0, D0) and after (D14) differentiation. FABP4 mRNA expression levels were significantly increased after adipogenic induction at D14 (Figure 1E).

HD-ASC and SSc-ASC amplified in FBS + bFGF-containing medium showed the ability to differentiate in osteoblasts, as assessed by Alizarin Red S staining (Figure 1C). After three weeks under osteogenic stimuli, we observed the presence of calcium deposits (stained red). The concentration of calcium deposits in the extracellular matrix was significantly higher at D21 than at D0 for HD-ASC and SSc-ASC (Figure 1F). Finally, the expression of ALPL, a key osteogenic-specific gene, was analyzed by RT-PCR before (D0) and after (D21) differentiation (Figure 1G). Levels of ALPL mRNA expression were significantly higher after osteogenic induction at D21 in both cell types. Together, these results show that differentiation potential in adipocytes and osteoblasts was similar in HD-ASC and SSc-ASC. Our results also show that both cellular populations presented typical human mesenchymal stromal cell features.

3.3. ASC Senescence Markers

Using SA- β -Gal staining, we detected no significant difference in senescence percentages between HD-ASC and SSc-ASC ($p > 0.05$; Figure 2A). To confirm the absence of senescence, we analyzed the cell cycle distribution using flow cytometry and found that the percentages of quiescent cells (G0/G1), replicative cells (S), and division cells (M) were similar between HD-ASC and SSc-ASC ($p > 0.05$; Figure 2B). The major pathways controlling senescence converge at the level of activation of the cycle-dependent kinase inhibitor p16^{INK4} or p21^{WAF}. Therefore, we assessed the expression of several key cell-cycle markers by quantitative RT-PCR (p16^{INK4}, p21^{WAF}, and p53). We observed no differences in the expression levels of these markers between the two groups (Figure 2C).

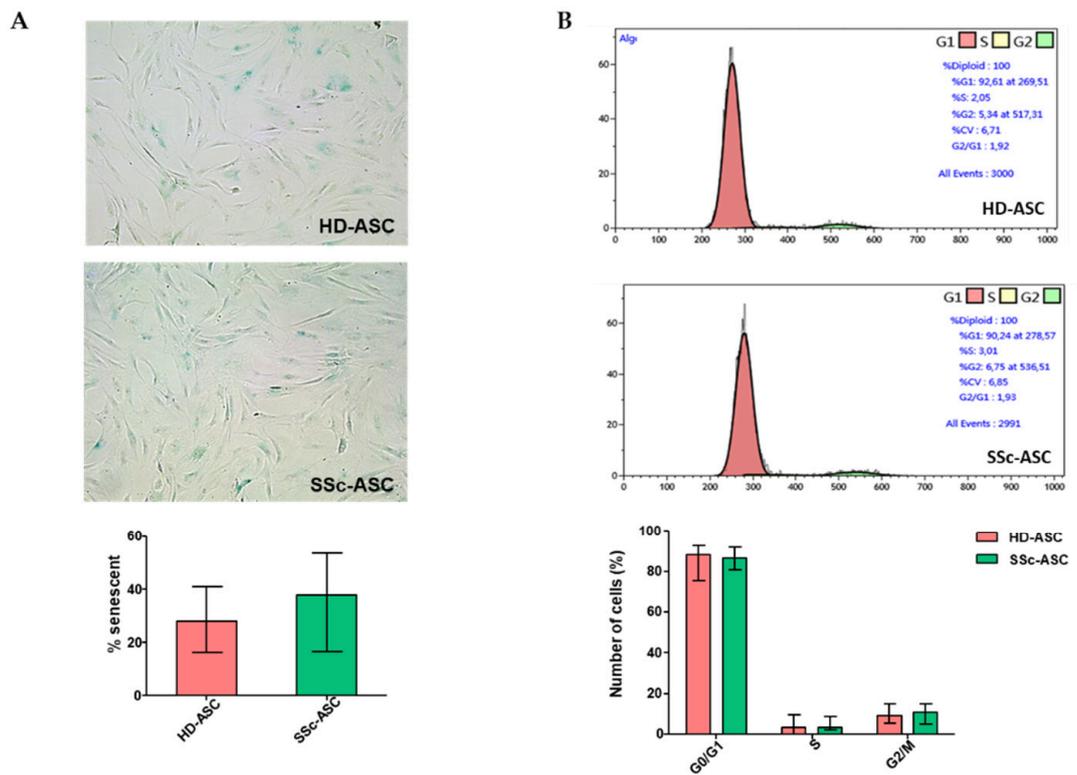


Figure 2. Senescence markers of HD-ASC ($n = 7$) and SSc-ASC ($n = 7$). (A) Representative images of β Gal staining are shown in the top panel. The bar graph (lower panel) represents the percentage of senescent cells determined as the number of cells positive for senescence relative to the total number of cells in HD-ASC ($n = 7$) and SSc-ASC ($n = 7$). (B) Cell cycle analysis by flow cytometry. The DNA content was analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining. The representative histograms are from one sample per group (upper panel). The bar graph (lower panel) represents a mean percentage of cells at different phases of the cell cycle determined by the DNA content for HD-ASC ($n = 7$) and SSc-ASC ($n = 7$). The expression of different cell cycle markers was determined by RT-qPCR analysis. For each gene, data are normalized to the housekeeping gene β -actin.

3.4. qRT-PCR and Secretome Analyses

We then investigated mRNA expression for a set of genes relevant to ASC pro-angiogenic and antifibrotic potential. qRT-PCR analysis showed lower VEGF-A transcript expression levels in SSc-ASC than in HD-ASC ($p = 0.16$). No significant difference was detected in mRNA levels of alpha smooth muscle actin (α SMA), collagen type I alpha 1 (COL1A1), collagen type 3 (COL3), matrix metalloproteinase 1 and 2 (MMP-2, MMP-1), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1), transforming growth factor beta 1 (TGF β 1), or hepatocyte growth factor (HGF) (Figure 3). Similarly, secretome analysis confirmed the trend of lower vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) secretion levels in SSc-ASC ($p = 0.20$) and no significant difference among other markers evaluated between the two groups. Table 4 presents each paracrine factor as the mean \pm SD ($n = 3$ for each group). Statistical analysis was carried out with a Mann–Whitney test.

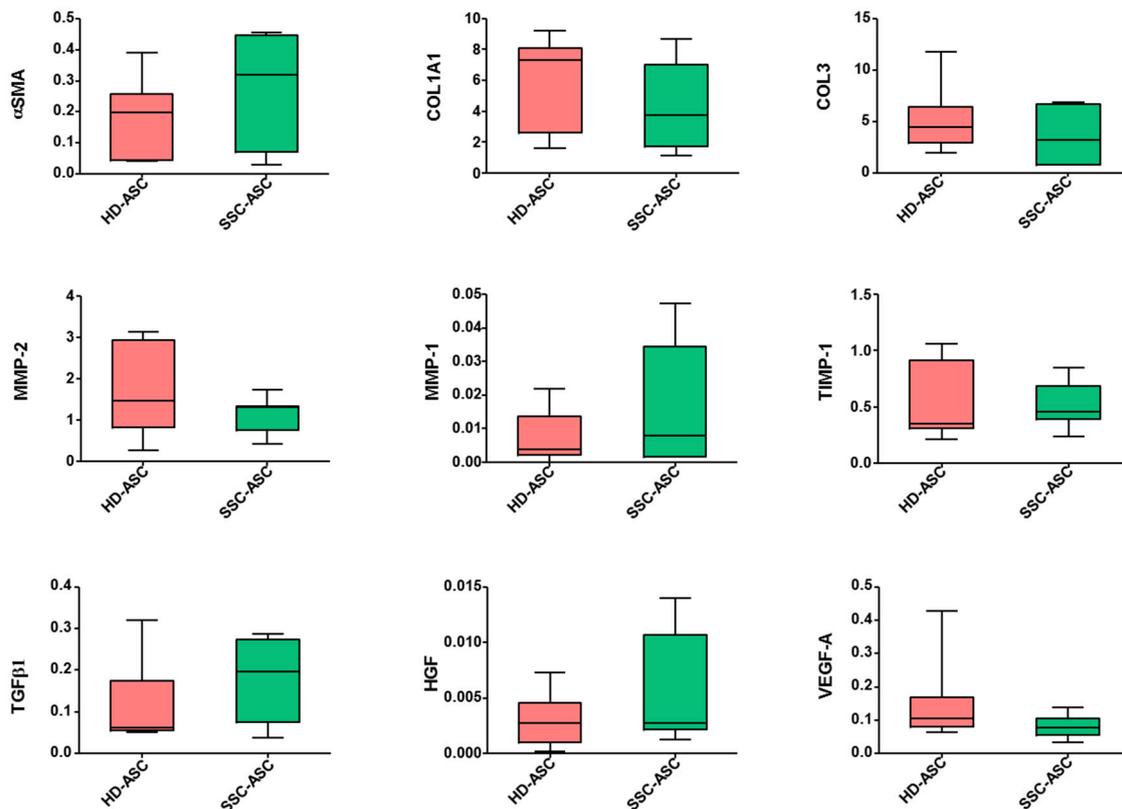


Figure 3. SSc-ASC ($n = 7$) and HD-ASC ($n = 7$) at passage 3–5 were assayed for mRNA expression level of α SMA (alpha smooth muscle actin), COL1A1 (collagen type I alpha 1), COL3 (collagen type 3), MMP-1 and MMP-2 (matrix metalloproteinase 1 and 2), TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1), TGF β 1 (transforming growth factor beta 1), HGF (hepatocyte growth factor), and VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) by RT-qPCR. GAPDH was measured as an endogeneous control for normalization. For each gene, results are expressed as $2^{-\Delta CT}$. Whiskers represent the median with range (min–max). Statistical analysis was carried out with a Mann–Whitney test.

Table 4. Comparative results of secretome analysis produced from SSc-ASC and HD-ASC.

Molecule (pg/mL)	SSc-ASC	HD-ASC	p -Value
VEGF-A	33.49 (\pm 12.91)	50.78 (\pm 11.67)	0.20
MMP-2	28,635 (\pm 1435)	25,991 (\pm 3883)	0.70
TIMP-1	39,805 (\pm 48,657)	51,625 (\pm 41,909)	0.51
HGF	10.90 (\pm 1.721)	11.70 (\pm 4.676)	0.82
TGF β 1	667.1 (\pm 72.94)	620.3 (\pm 64.06)	0.70

3.5. ASC Pro-Angiogenic Paracrine Activity

The sprouting ability of HMVEC-dA was evaluated using a 3D spheroid assay performed *in vitro* after co-culture in the presence of SSc-ASC or HD-ASC (Figure 4A,B). The results indicated that average sprout length was significantly lower in HMVEC-dAs co-cultivated with SSc-ASC compared to those exposed to HD-ASC. The total network length also decreased in response to SSc-ASC, although this difference was not significant. The results of the Matrigel assay indicated that HMVEC-dA-dependent formation of capillary-like structures did not differ significantly between HMVEC-dA stimulated with SSc-ASC and HD-ASC (Figure 4C,D). Together, these findings demonstrate that SSc-ASC maintained a significant paracrine angiogenic effect on endothelial cells, although this effect was slightly smaller than that of HD-ASC.

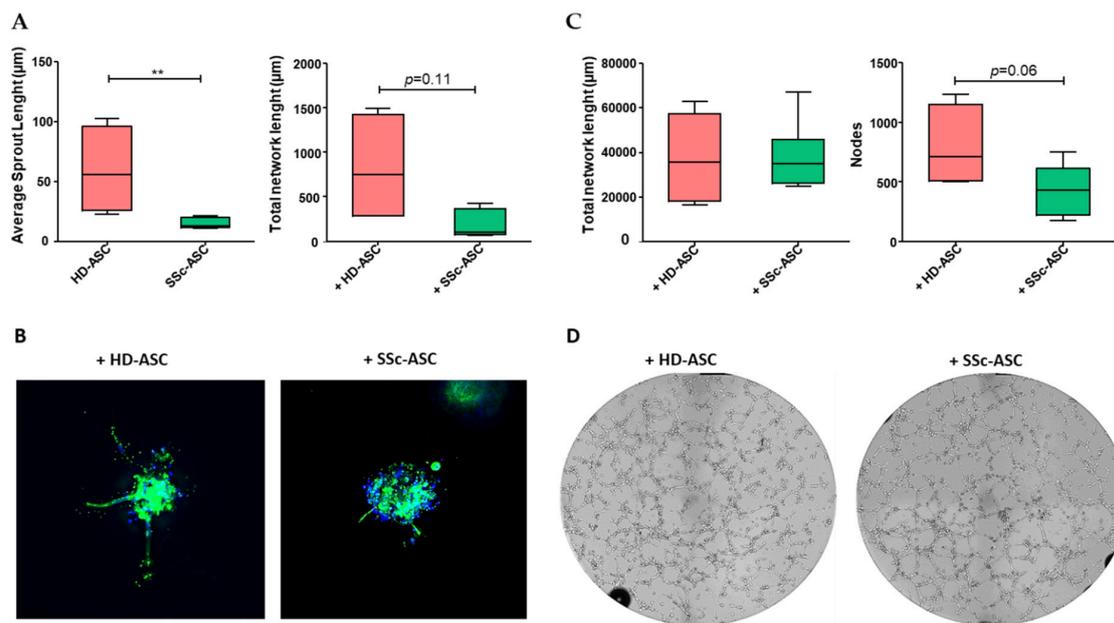


Figure 4. Pro-angiogenic paracrine effect of ASC evaluated in angiogenic *in vitro* assays with HMVEC-dA co-cultured with HD-ASC ($n = 4$) and SSc-ASC ($n = 6$). (A) Quantification of 3D *in vitro* angiogenesis assay with collagen gel-embedded spheroids (total network length and average sprout length). For each experiment, 10 spheroids were analyzed. Data are median with range (min–max) of HD-ASC ($n = 4$) and SSc-ASC ($n = 6$). (B) Representative images of vascular sprout stained for F-actin with phalloidin (red) and nuclei using 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), (blue) (magnification $\times 20$). (C) Quantitative analysis of tube formation assays after six hours (total network length and number of nodes). A total of 20,000 HMVEC-da/well were seeded on growth factor-reduced Matrigel. Data are median with range (min–max) of HD-ASC ($n = 4$) and SSc-ASC ($n = 6$) in experiments performed in triplicate. (D) Representative images of tube formation assays (10x magnification) six hours after seeding. Statistical analysis was carried out with a Mann–Whitney test. ** $p < 0.01$.

3.6. ASC Antifibrotic Paracrine Potential

Finally, we evaluated ASC paracrine antifibrotic potential by measuring the expression of the myofibroblast marker α SMA and the collagen content of DF isolated from SSc patients and co-cultured with ASC for five days. Western blot analysis performed on DF protein lysate showed that SSc-ASC secretory activity induced a significant reduction in DF α -SMA expression compared to that of non-treated DF (Figure 5A,B), whereas the effect of HD-ASC was non-significant and heterogeneous among donors. Compared to untreated DF, soluble collagen content was significantly lower in DF stimulated by either SSc-ASC or HD-ASC (Figure 5C). Together, these findings demonstrate the antifibrotic paracrine activity of SSc-ASC *in vitro*.

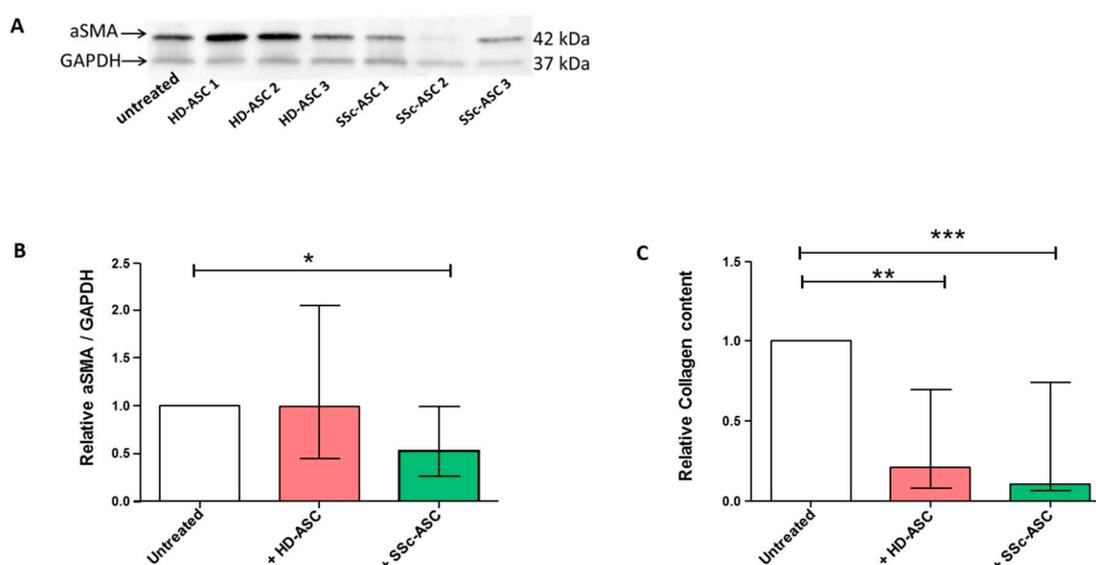


Figure 5. Anti-fibrotic paracrine effect of HD-ASC and SSc-ASC on dermal fibroblasts (DF) from SSc patients. (A) The level of α SMA was examined by immunoblot on whole cells lysates from SSc-DF ($n = 3$) after co-culture with HD-ASC ($n = 4$) and SSc-ASC ($n = 6$). Representative experiments for α SMA and GAPDH (loading control) for three independent HD-ASC and SSc-ASC on 1 SSc-DF are shown. (B) Protein quantification was represented by bar graphs showing the relative α SMA/GAPDH quantification normalized to the untreated SSc-DF condition. (C) Histogram displays the relative collagen content in protein lysates of SSc-DF ($n = 2$) after co-culture with HD-ASC ($n = 4$) or SSc-ASC ($n = 6$) normalized to the untreated SSc-DF. Statistical analysis was carried out with a one-way ANOVA test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$.

4. Discussion

ASC-based therapy represents hope for patients suffering from advanced forms of SSc. However, before such therapy can be applied, important aspects about the maintenance of their beneficial biological properties in the autologous context must be completely elucidated. The identification of in vitro functional tests that behave as potency assays, e.g., anticipating clinical results, should permit better selection of patients who can benefit from these innovative therapies. In this study, we demonstrated that SSc-ASC secretory activity promoted significant reduction of fibrosis in vitro. Moreover, the pro-angiogenic potential of ASC isolated from SSc patients was maintained, albeit to a slightly lower extent than observed in HD-ASC. These findings may support further clinical development of autologous ASC to treat SSc patients for whom conventional therapies are no longer an option.

Although several studies have evaluated the phenotypic and the functional characteristics of bone marrow MSC (BM-MSC) from patients suffering from SSc, few have reported the effects of SSc on MSC extracted from adipose tissue. Our results confirm that, compared with HD-ASC, SSc-ASC display similar expansion potential, adipogenic or osteogenic differentiation potential, and unaltered phenotype. This finding is consistent with those of early studies of BM-MSC and ASC from SSc patients [32–34]. However, SSc-ASC have been reported to display multilineage differentiation ability but have failed to sustain a terminally differentiated progeny [25]. Impaired maturation of SSc-ASC in adipocytes or osteocytes was associated with a downregulation of a set of genes involved in cell differentiation. In contrast with our results, Virzì et al. also reported that SSc-ASC expressed CD44, CD29, and CD73 to a lesser extent than those derived from healthy individuals. Based on increased levels of various inflammatory cytokines measured in the SVF, the authors suggested that the pro-inflammatory microenvironment characterizing adipose tissue impairs the differentiation capacity and the phenotype of ASC from SSc patients. Therefore, heterogeneity in the inflammatory status of

SSc patients is likely to contribute to discrepancies between studies. The senescence status of MSC is of paramount importance for their therapeutic use, because accelerated senescence impedes *in vitro* expansion, which is necessary to obtain a sufficient dose of cells and also evokes deleterious changes in the secretome and the MSC biological properties [35]. In contrast to a previous BM-MSC study [36], we demonstrated that SSc-ASC did not exhibit greater senescence than HD-ASC. Senescence is notably associated with decreased activity in sirtuins and is emerging as a pathophysiological contributor to scleroderma [37]; therefore, our results provide further evidence of the benefit of using adipose tissue as an MSC source for therapeutic purposes [38].

Paracrine promotion of angiogenesis is highly likely in SSc, especially when local MSC-based therapies are used to limit vascular manifestations and digital ulcers. We found that paracrine factors produced by SSc-ASC maintained the capacity to stimulate angiogenic activity significantly in microvascular endothelial cells *in vitro*. This finding is consistent with those of our previous study of adipose-derived stromal vascular fractions from SSc patients, which showed a slight reduction in *in vivo* neovascularization potential compared to those from HDs [39]. Nevertheless, SSc-ASC paracrine potential was attenuated compared to that of HD-ASC. This difference was observed mainly in spheroid assays, indicating that only the early stages of angiogenesis (sprouting) were altered, whereas the organization of endothelial cells into capillary-like structures in Matrigel, which mainly involves proliferation, migration, and invasion properties, was enhanced to similar extents by SSc-ASC and HD-ASC. We also detected no significant difference in the expression levels of relevant soluble factors involved in ASC angiogenic effects. Nevertheless, global approaches to further characterize ASC secretome would be of interest to confirm these data. These results are consistent with those of another study of ASC enhancement of angiogenic activity in endothelial cells directly co-cultured in an *in vitro* model; both SSc-ASC and HD-ASC improved the branching indices of endothelial cells [34]. Together, these findings imply that the effect of SSc on the pro-angiogenic capability of ASC does not constitute a major obstacle to using autologous cells for vascular repair/regeneration. However, future studies must identify the specific mechanisms responsible for the weakened ASC-induced paracrine stimulation of endothelial cell sprouting observed in the present study.

Other research groups have described the potential involvement of organ-resident perivascular MSC-like cells and BM-MSC in myofibroblast generation during fibrosis development associated with SSc [40,41]. However, the transfer of adipose tissue enriched in autologous ASC was recently shown to improve orofacial fibrosis in SSc patients [42]. In the present study, we report the first assessment of paracrine antifibrotic potential of SSc-ASC using indirect co-culture experiments performed with patient-derived DF. Consistent with the presence of antifibrotic factors in SSc-ASC, such as HGF, TIMP-1, and MMP-2, we found that these cells reduced α SMA expression levels and collagen content in DF from SSc patients, demonstrating significant antifibrotic paracrine effects *in vitro*. These results appear to contrast with recent studies of miRs *in silico*, which reported a pro-fibrotic ASC signature from SSc patients [23]. Sera from SSc patients have also been shown to favor differentiation of healthy ASC into profibrotic myofibroblast-like cells *in vitro* [43].

Notably, our approach allowed us to address functional effects of ASC secretome using co-culture model with DF from SSc patients. Thus, our results imply that ASC paracrine antifibrotic functions are finely tuned by the disease-associated microenvironment and that ASC are prone to activate compensatory mechanisms to restore local homeostasis. In support of this hypothesis, such adaptability of MSC to microenvironmental factors has already been proposed due to their immunomodulatory properties [44].

In conclusion, our results indicate that the paracrine angiogenic properties of autologous ASC are compatible with potential benefits of ASC-based therapy in scleroderma patients. These findings further encourage clinical evaluation of these emerging strategies and provide additional support for the development of cell-free therapies based on ASC secretome. Future studies of the relationship between these paracrine activities evaluated *in vitro* and corresponding effects of ASC-based therapies in reducing clinical manifestations of SSc will permit the definition of accurate potency assays.

Such tests may allow improved selection of putative responder patients to optimize these promising cell-based therapies.

Author Contributions: Conceptualization, M.V. and M.A.; Data curation, M.V.; Formal analysis, M.V. and S.S.; Funding acquisition, J.M. and F.S. Investigation, M.V., S.S., M.A., P.F., S.E. and A.L.; Methodology, M.V., S.S., S.E. and A.L.; Project administration, F.D.G. and F.S.; Resources, M.A., B.B., A.D. and B.G.; Supervision, F.S.; Validation, S.S., B.D., J.M. and F.S.; Visualization, F.D.G.; Writing—original draft, M.V., S.S., J.M. and F.S.; Writing—review & editing, A.D., B.G. and F.S.

Funding: This research was funded by by Fondation de l’Avenir (Grant APM RMA 16-045) and AORC Junior 2017 from Assistance Publique Hopitaux Marseille (Sclerabio) (NCT03629002).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Del Papa, N.; Zaccara, E. From mechanisms of action to therapeutic application: A review on current therapeutic approaches and future directions in systemic sclerosis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2015**, *29*, 756–769. [[CrossRef](#)]
2. Fransen, J.; Popa-Diaconu, D.; Hesselstrand, R.; Carreira, P.; Valentini, G.; Beretta, L.; Airo, P.; Inanc, M.; Ullman, S.; Balbir-Gurman, A.; et al. Clinical prediction of 5-year survival in systemic sclerosis: Validation of a simple prognostic model in EUSTAR centres. *Ann. Rheum. Dis.* **2011**, *70*, 1788–1792. [[CrossRef](#)]
3. Sullivan, K.M.; Goldmuntz, E.A.; Keyes-Elstein, L.; McSweeney, P.A.; Pinckney, A.; Welch, B.; Mayes, M.D.; Nash, R.A.; Crofford, L.J.; Eggleston, B.; et al. Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 35–47. [[CrossRef](#)]
4. van Laar, J.M.; Farge, D.; Sont, J.K.; Naraghi, K.; Marjanovic, Z.; Larghero, J.; Schuerwegh, A.J.; Marijt, E.W.; Vonk, M.C.; Schattenberg, A.V.; et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: A randomized clinical trial. *JAMA* **2014**, *311*, 2490–2498. [[CrossRef](#)]
5. Burt, R.K.; Farge, D. Systemic sclerosis: Autologous HSCT is efficacious, but can we make it safer? *Nat. Rev. Rheumatol.* **2018**, *14*, 189–191. [[CrossRef](#)]
6. da Silva Meirelles, L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2204–2213. [[CrossRef](#)]
7. Rozier, P.; Maria, A.; Goulabchand, R.; Jorgensen, C.; Guilpain, P.; Noël, D. Mesenchymal Stem Cells in Systemic Sclerosis: Allogenic or Autologous Approaches for Therapeutic Use? *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2938. [[CrossRef](#)]
8. Wu, Y.; Huang, S.; Enhe, J.; Ma, K.; Yang, S.; Sun, T.; Fu, X. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int. Wound J.* **2014**, *11*, 701–710. [[CrossRef](#)]
9. Bronckaers, A.; Hilkens, P.; Martens, W.; Gervois, P.; Ratajczak, J.; Struys, T.; Lambrechts, I. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* **2014**, *143*, 181–196. [[CrossRef](#)]
10. Liang, X.; Ding, Y.; Zhang, Y.; Tse, H.-F.; Lian, Q. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy: Current Status and Perspectives. *Cell Transplant.* **2014**, *23*, 1045–1059. [[CrossRef](#)]
11. Lee, S.H.; Lee, E.J.; Lee, S.Y.; Kim, J.H.; Shim, J.J.; Shin, C.; In, K.H.; Kang, K.H.; Uhm, C.S.; Kim, H.K.; et al. The effect of adipose stem cell therapy on pulmonary fibrosis induced by repetitive intratracheal bleomycin in mice. *Exp. Lung Res.* **2014**, *40*, 117–125. [[CrossRef](#)]
12. Uji, M.; Kureya, Y.; Yamada, K.; Watanabe, T.; Konishi, K.; Asai, K.; Nakamura, T.; Hirata, K. Effect of intratracheal administration of adipose-derived stromal cells on bleomycin-induced lung injury in a rat model. *Mech. Lung Inj. Repair* **2015**, *46*, 81–91.
13. Tashiro, J.; Elliot, S.J.; Gerth, D.J.; Xia, X.; Pereira-Simon, S.; Choi, R.; Catanuto, P.; Shahzeidi, S.; Toonkel, R.L.; Shah, R.H.; et al. Therapeutic benefits of young, but not old, adipose-derived mesenchymal stem cells in a chronic mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Transl. Res.* **2015**, *166*, 554–567. [[CrossRef](#)]
14. Maria, A.T.; Toupet, K.; Bony, C.; Pirot, N.; Vozenin, M.C.; Petit, B.; Roger, P.; Batteux, F.; Le Quellec, A.; Jorgensen, C.; et al. Antifibrotic, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in HOCl-Induced Systemic Sclerosis: MESENCHYMAL STEM CELLS IN MURINE SSc. *Arthritis Rheumatol.* **2016**, *68*, 1013–1025. [[CrossRef](#)]

15. Scuderi, N.; Ceccarelli, S.; Onesti, M.G.; Fioramonti, P.; Guidi, C.; Romano, F.; Frati, L.; Angeloni, A.; Marchese, C. Human adipose-derived stromal cells for cell-based therapies in the treatment of systemic sclerosis. *Cell Transplant.* **2013**, *22*, 779–795. [[CrossRef](#)]
16. Onesti, M.G.; Fioramonti, P.; Carella, S.; Fino, P.; Marchese, C.; Scuderi, N. Improvement of Mouth Functional Disability in Systemic Sclerosis Patients over One Year in a Trial of Fat Transplantation versus Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 2416192. [[CrossRef](#)]
17. Granel, B.; Daumas, A.; Jouve, E.; Harlé, J.R.; Nguyen, P.S.; Chabannon, C.; Colavolpe, N.; Reynier, J.C.; Truillet, R.; Mallet, S.; et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: An open-label phase I trial. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 2175–2182. [[CrossRef](#)]
18. Daumas, A.; Magalon, J.; Jouve, E.; Truillet, R.; Casanova, D.; Giraudo, L.; Veran, J.; Benyammine, A.; Dignat-George, F.; Magalon, G.; et al. Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. *Curr. Res. Transl. Med.* **2017**, *65*, 40–43. [[CrossRef](#)]
19. Di Benedetto, P.; Cipriani, P.; Ruscitti, P.; Liakouli, V.; Giacomelli, R. Adipose stromal vascular fraction and regenerative therapy in SSC: Response to the article by Magalon et al. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
20. Magalon, J.; Velier, M.; Simoncini, S.; Dignat-George, F.; Granel, B.; Paul, P.; Sabatier, F. Response to: «Adipose stromal vascular fraction and regenerative therapy in SSC: Response to the article by Magalon et al» by De Benedetto et al. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
21. Manetti, M. Could autologous adipose-derived stromal vascular fraction turn out an unwanted source of profibrotic myofibroblasts in systemic sclerosis? *Ann. Rheum. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
22. Velier, M.; Magalon, J.; Simoncini, S.; Dignat-George, F.; Granel, B.; Paul, P.; Sabatier, F. Response to: « Could autologous adipose-derived stromal vascular fraction turn out an unwanted source of profibrotic myofibroblasts in systemic sclerosis? » by Manetti. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
23. Di Benedetto, P.; Panzera, N.; Cipriani, P.; Mastroiaco, V.; Tessitore, A.; Liakouli, V.; Ruscitti, P.; Berardicurti, O.; Carubbi, F.; Guggino, G.; et al. Mesenchymal stem cells of Systemic Sclerosis patients, derived from different sources, show a profibrotic microRNA profiling. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7144. [[CrossRef](#)]
24. Lee, R.; Del Papa, N.; Introna, M.; Reese, C.F.; Zemskova, M.; Bonner, M.; Carmen-Lopez, G.; Helke, K.; Hoffman, S.; Tourkina, E. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells in systemic sclerosis: Alterations in function and beneficial effect on lung fibrosis are regulated by caveolin-1. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2019**, *4*, 127–136. [[CrossRef](#)]
25. Virzì, F.; Bianca, P.; Giammona, A.; Apuzzo, T.; Di Franco, S.; Mangiapane, L.R.; Colorito, M.L.; Catalano, D.; Scavo, E.; Nicotra, A.; et al. Combined platelet-rich plasma and lipofilling treatment provides great improvement in facial skin-induced lesion regeneration for scleroderma patients. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 236. [[CrossRef](#)]
26. Delorme, B.; Charbord, P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Med.* **2007**, *140*, 67–81.
27. Viau, S.; Chabrand, L.; Eap, S.; Lorant, J.; Rouger, K.; Goudaliez, F.; Sumian, C.; Delorme, B. Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0181406. [[CrossRef](#)]
28. Korff, T.; Kimmina, S.; Martiny-Baron, G.; Augustin, H.G. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: Direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J.* **2001**, *15*, 447–457. [[CrossRef](#)]
29. Eglinger, J.; Karsjens, H.; Lammert, E. Quantitative assessment of angiogenesis and pericyte coverage in human cell-derived vascular sprouts. *Inflamm. Regen.* **2017**, *37*, 2. [[CrossRef](#)]
30. Delorme, B.; Ringe, J.; Gallay, N.; Le Vern, Y.; Kerboeuf, D.; Jorgensen, C.; Rosset, P.; Sensebe, L.; Layrolle, P.; Häupl, T.; et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* **2008**, *111*, 2631–2635. [[CrossRef](#)]
31. Dominici, M.L.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)]

32. Larghero, J.; Farge, D.; Braccini, A.; Lecourt, S.; Scherberich, A.; Fois, E.; Verrecchia, F.; Daikeler, T.; Gluckman, E.; Tyndall, A.; et al. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67*, 443–449. [[CrossRef](#)]
33. Griffin, M.; Ryan, C.M.; Pathan, O.; Abraham, D.; Denton, C.P.; Butler, P.E. Characteristics of human adipose derived stem cells in scleroderma in comparison to sex and age matched normal controls: Implications for regenerative medicine. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 23. [[CrossRef](#)]
34. Capelli, C.; Zaccara, E.; Cipriani, P.; Di Benedetto, P.; Maglione, W.; Andracco, R.; Di Luca, G.; Pignataro, F.; Giacomelli, R.; Introna, M.; et al. Phenotypical and Functional Characteristics of In Vitro-Expanded Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells From Patients With Systematic Sclerosis. *Cell Transplant.* **2017**, *26*, 841–854. [[CrossRef](#)]
35. Turinetto, V.; Vitale, E.; Giachino, C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *IJMS* **2016**, *17*, 1164. [[CrossRef](#)]
36. Cipriani, P.; Di Benedetto, P.; Liakouli, V.; Del Papa, B.; Di Padova, M.; Di Ianni, M.; Marrelli, A.; Alesse, E.; Giacomelli, R. Mesenchymal stem cells (MSCs) from scleroderma patients (SSc) preserve their immunomodulatory properties although senescent and normally induce T regulatory cells (T_{reg}s) with a functional phenotype: Implications for cellular-based therapy: SSc-MSC preserve immunomodulatory abilities. *Clin. Exp. Immunol.* **2013**, *173*, 195–206.
37. Wyman, A.E.; Atamas, S.P. Sirtuins and Accelerated Aging in Scleroderma. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2018**, *20*, 16. [[CrossRef](#)]
38. Najjar, M.; Bouhtit, F.; Melki, R.; Afif, H.; Hamal, A.; Fahmi, H.; Merimi, M.; Lagneaux, L. Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy: New Perspectives and Challenges. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 626. [[CrossRef](#)]
39. Magalon, J.; Velier, M.; Simoncini, S.; François, P.; Bertrand, B.; Daumas, A.; Benyamine, A.; Boissier, R.; Arnaud, L.; Lyonnet, L. Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *78*, 391–398. [[CrossRef](#)]
40. Cipriani, P.; Di Benedetto, P.; Ruscitti, P.; Liakouli, V.; Berardicurti, O.; Carubbi, F.; Ciccia, F.; Guggino, G.; Zazzeroni, F.; Alesse, E.; et al. Perivascular Cells in Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis Overexpress Activated ADAM12 and Are Involved in Myofibroblast Transdifferentiation and Development of Fibrosis. *J. Rheumatol.* **2016**, *43*, 1340–1349. [[CrossRef](#)]
41. Nicolosi, P.A.; Tombetti, E.; Maugeri, N.; Rovere-Querini, P.; Brunelli, S.; Manfredi, A.A. Vascular Remodelling and Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 4636859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Almadori, A.; Griffin, M.; Ryan, C.M.; Hunt, D.F.; Hansen, E.; Kumar, R.; Abraham, D.J.; Denton, C.P.; Butler, P.E. Stem cell enriched lipotransfer reverses the effects of fibrosis in systemic sclerosis. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0218068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Manetti, M.; Romano, E.; Rosa, I.; Fioretto, B.S.; Praino, E.; Guiducci, S.; Iannone, F.; Ibba-Manneschi, L.; Matucci-Cerinic, M. Systemic Sclerosis Serum Steers the Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells Toward Profibrotic Myofibroblasts: Pathophysiologic Implications. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nenasheva, T.; Nikolaev, A.; Diykanov, D.; Sukhanova, A.; Tcyganov, E.; Panteleev, A.; Bocharova, I.; Serdyuk, Y.; Nezlin, L.; Radaeva, T.; et al. The introduction of mesenchymal stromal cells induces different immunological responses in the lungs of healthy and M. tuberculosis infected mice. Olszewski MA, éditeur. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



4. Résultats complémentaires

La dérégulation de la voie de l'apeline dans la FVS au cours de la ScS est-elle susceptible d'impacter le potentiel thérapeutique des approches autologues dérivées du tissu adipeux ?

Les données présentées dans cette partie font l'objet de résultats non publiés à ce jour.

4.1. Contexte scientifique

L'Apeline (*APJ Endogenous Ligand*) est un peptide endogène, ligand d'un récepteur couplé à une protéine G appelé APJ³⁸⁸. Elle est synthétisée sous forme de pré-proapeline de 77 acides aminés et est soumise à différents clivages qui conduisent à plusieurs isoformes *in vivo* dont les plus actifs sont l'apeline-36, l'apeline-17, et la (Pyr)-apeline-13⁵¹³.

La voie de signalisation apeline/APJ est impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme l'équilibre hydrique, le métabolisme glucidique et lipidique ainsi que l'homéostasie du système cardiovasculaire (effet inotropique et vasodilatateur)^{513,514}. De plus, cette voie est dérégulée dans des conditions pathologiques comme l'insuffisance cardiaque, le cancer, l'obésité et le diabète^{388,515}. L'apeline est principalement sécrétée par le TA (adipokine) et les cellules endothéliales⁵¹⁵. On ne retrouve pas d'apeline dans les corps de Weibel et Palade (granules de stockage qui libèrent leur contenu lorsque l'endothélium est activé), en faveur d'une sécrétion constitutive de l'apeline par les cellules endothéliales⁵¹⁶. En condition basale, le récepteur APJ est peu exprimé sur les cellules endothéliales mais il peut être surexprimé en présence de VEGF ou lors d'hypoxie cellulaire.

La voie apelinergique est impliquée dans différentes étapes des processus angiogéniques. Une étude récente sur le *Zebrafish* montre qu'elle est indispensable au bourgeonnement des cellules endothéliales (*tip cells*), étape précoce de l'angiogenèse⁵¹⁷. Elle participe également à la migration et à la prolifération des cellules endothéliales ainsi qu'au recrutement des péricytes, aux stades plus tardifs de l'angiogenèse^{388,515,518,519}. Dans un modèle murin d'ulcère cutané, les injections sous-cutanées d'apeline diminuaient la perte vasculaire et l'apoptose liées aux lésions d'ischémie-reperfusion aboutissant à une réduction de la formation des ulcères⁵²⁰. L'injection de MM07 (analogue de synthèse d'Apeline) a conduit aux mêmes résultats confortant l'implication de la voie apelinergique dans la protection vasculaire et la cicatrisation des ulcères⁵²⁰.

Cependant, le rôle de la voie apelinergique dans la régulation des processus angiogéniques semble être bénéfique ou délétère selon le contexte physiopathologique considéré. Ce rôle ambigu de l'apeline est actuellement peu étudié dans le contexte sclérodermique.

L'expression d'apeline est réduite dans les fibroblastes dermiques de patients atteints de ScS par rapport aux sujets sains⁵²¹. De plus, Yokoyama *et al.* montrent que la fibrose cutanée TGFβ-induite est inhibée par la voie apelinergique. Aussi, le blocage d'apeline induit la surexpression de marqueurs de fibrose (αSMA et Collagène 1). Enfin, l'administration d'apeline réduit significativement le développement de la fibrose cutanée dans un modèle de ScS induit à la bléomycine ; suggérant l'implication de la voie apelinergique dans les processus fibrotiques.

Dans une approche par *single cell RNA sequencing*, Apostolidis *et al.* ont montré que le gène du récepteur de l'apeline (APJ) était surexprimé au sein des cellules endothéliales microvasculaires issues de biopsies cutanées de patients ScS⁵²².

Enfin, les résultats concernant les niveaux d'apeline circulante chez les patients atteints de ScS sont contradictoires^{521,523} et aucune étude ne s'est intéressée à l'implication de la voie apelinergique dans la vasculopathie sclérodermique.

L'analyse transcriptomique de la FVS de patients sclérodermiques réalisée dans le premier volet de ce travail a révélé l'existence d'une signature particulière associée à la ScS⁵²⁴. Parmi les 300 gènes différentiellement exprimés entre les FVS sclérodermiques et saines, le gène de l'apeline a été identifié comme une cible d'intérêt, surexprimé dans la FVS de ces patients. L'approche complémentaire par *single cell RNA Seq* (approche de séquençage de l'ARN à l'échelle cellulaire) a permis d'attribuer principalement la modulation de l'expression de ce gène aux compartiments endothéliaux (80%) et mésenchymateux (environ 10%).

Cette partie du travail vise à évaluer les dérégulations de l'expression d'apeline et de son récepteur APJ dans la composante endothéliale et mésenchymateuse de FVS de patients sclérodermiques et de donneurs sains ainsi qu'à appréhender la contribution de cette voie dans le potentiel angiogénique de la FVS.

4.2. Matériels, méthodes et résultats

4.2.1. Difficultés d'isolement des progéniteurs endothéliaux depuis la FVS de patients sclérodermiques

Pour déterminer dans quelle mesure la surexpression de l'apeline dans la FVS de patients sclérodermiques est impliquée dans la dysfonction endothéliale au cours de la ScS, nous avons cherché à isoler les progéniteurs endothéliaux de type *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC) contenus dans la FVS.

- **Matériels et Méthodes**

Pour isoler les ECFC depuis la FVS du tissu adipeux, nous avons utilisé une technique de séparation immunomagnétique par sélection des cellules CD144 (VE-Cadhérine) positives selon les recommandations du fournisseur (MACS®, Miltenyi). Brièvement, les cellules de FVS étaient lavées puis centrifugées (400g pendant 5 minutes) avant d'être reprises dans un volume adapté du réactif d'éluion. Les cellules étaient ensuite incubées avec des billes préalablement *coatées* par un anticorps dirigé contre la VE-Cadhérine/CD144 (Microbeads, Miltenyi), pendant 15 minutes à 4°C. Après lavage, les cellules étaient purifiées par tri magnétique (colonnes LS, Miltenyi) permettant une sélection positive des cellules CD144+. Après une numération des cellules éluées, la fraction CD144+ était ensemencée dans une plaque 6 puits préalablement *coatée* à la gélatine 0.2% à raison de 15 000 Cellules Nucléées Viables (CNV)/cm², dans un milieu enrichi en facteurs de croissance pour cellules endothéliales appelé *Endothelial Cell Growth Medium MV2* (EGM-2MV, Promocell). Les cultures étaient maintenues dans une atmosphère à 37°C et 5% de CO₂. La Figure 30 ci-dessous schématise le procédé de tri magnétique utilisé. Dans un premier temps, nous avons validé la faisabilité et l'efficacité de cette méthode d'isolement des ECFC sur des échantillons de FVS issus de donneurs sains.

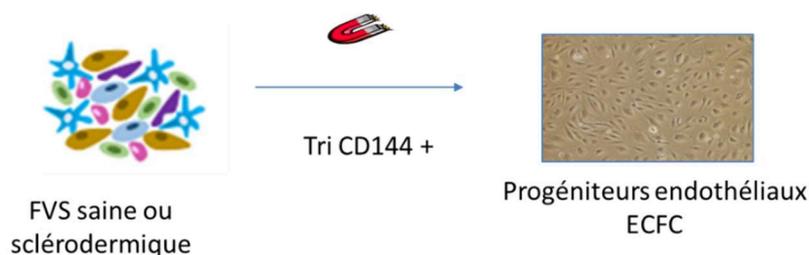


Figure 30 : Stratégie d'isolement des progéniteurs endothéliaux « ECFC » par séparation immunomagnétique depuis la FVS

- **Résultats**

Nous avons isolé avec succès des ECFC depuis 6 FVS saines sur les 7 essais réalisés. L'extrapolation de cette méthode aux FVS de patients sclérodermiques s'est révélée non concluante puisque toutes les tentatives de tris CD144 + positifs ont été des échecs. De même, les tris CD31/PECAM (autre marqueur à la surface des cellules endothéliales) n'ont pas permis d'isoler les ECFC depuis des FVS de patients ScS. Ces résultats suggèrent un impact de la ScS sur le potentiel clonogénique et prolifératif des ECFC. Les succès et les échecs de tris d'ECFC depuis des FVS saines et sclérodermiques sont résumés dans le Tableau 11 ci-dessous.

	Sexe	Age	Nombre de cellules de FVS décongelées (.10 ⁶)	Séparation immunomagnétique réalisée	Apparition de clones d'ECFC	Nombre de tris successifs réalisés	Succès d'isolement des ECFC	Quantité d'ECFC congelée
DS 1	F	41	10	CD144	oui	3	oui	700 000
DS 2	M	75	5	CD144	oui	2	oui	600 000
DS 3	F	32	5	CD144	oui	3	oui	550 000
DS 4	M	48	2,7	CD144	oui	4	oui	350 000
DS 5	F	58	4	CD144	oui	3	oui	400 000
DS 6	F	27	8	CD144	oui	3	oui	950 000
DS 7	F	20	5	CD144	oui	2	non	NA
ScS 1	F	58	9,3	CD144	non	1	non	NA
ScS 2	F	60	8,2	CD144	oui	3	non	NA
ScS 3	F	27	8,4	CD144	oui	3	non	NA
				CD31	oui	3	non	NA
ScS4	M	59	5,7	CD144	oui	3	non	NA
ScS5	F	56	9,6	CD144	oui	2	non	NA
				CD31	oui	2	non	NA
ScS 6	F	67	8,1	CD144	non	1	non	NA
ScS 7	F	52	9,3	CD144	oui	3	non	NA
				CD31	oui	2	non	NA
ScS 8	F	59	8,7	CD144	oui	2	non	NA
				CD31	non	1	non	NA

Tableau 11 : Résumé des succès et échecs d'isolement de progéniteurs endothéliaux depuis des FVS de donneurs sains (n=7) et sclérodermiques (n=8)

4.2.2. Niveaux d'expression d'apeline et APJ similaires entre ASC saines et sclérodermiques

Un second volet a été de caractériser les modulations d'expression d'apeline et de son récepteur APJ dans les ASC saines et sclérodermiques. Une des problématiques associées à cette caractérisation est l'existence de nombreux isoformes de l'apeline.

- **Matériels et Méthodes**

Nous avons réalisé des analyses en RT-qPCR, western blot et immunofluorescence pour apprécier les potentielles différences d'expression d'apeline et APJ dans les ASC.

L'ARN total d'ASC de donneurs sains (ASC-DS, n=7) et sclérodermiques (ASC-ScS, n=16) a été isolé par le RNeasy mini kit (Qiagen), puis dosé par spectrophotométrie (NanoVue, Biochrom) et enfin converti en ADN complémentaire (Applied Biosystems). L'amplification par

RT-qPCR a été réalisée sur un automate StepOne™ à l'aide d'un mix commercial (Applied Biosystems) et des amorces pré-conçues pour les gènes de l'apeline (APLN) et du récepteur APJ. Les gènes du ménage utilisés étaient la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase (GAPDH) et la *Ribosomal Protein L13* (RPL13) et l'analyse a été faite par la méthode du 2^{-ΔCT}.

Les western blot évaluant le niveau d'expression d'apeline et APJ étaient réalisés sur des ASC-DS (n=5) et ASC-ScS (n=9) selon une méthode déjà publiée⁵²⁵. Brièvement, les lysats protéiques étaient collectés dans un tampon d'extraction protéique, soumis à une sonication (2 cycles de 5 minutes) puis centrifugés (13000 rpm, 15 minutes à 4°C). Après détermination de la concentration protéique dans les échantillons par méthode colorimétrique (BCA assay, Thermofisher), une quantité fixe de protéines (20μg) était chargée sur un gel de polyacrylamide. L'efficacité de la migration et du transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose étaient objectivées au rouge ponceau. Par la suite, les membranes étaient saturées avec du tampon TBST-3% BSA pendant 30 minutes puis incubées *overnight* à +4°C sous agitation avec successivement les anticorps primaires (anti-apeline et anti-APJ) puis l'anticorps secondaire *donkey anti-rabbit* couplé à la *HorseRadish Peroxidase* (HRP). Les révélations étaient faites par chimioluminescence avec le kit Pierce ECL® (Thermofisher), les photos des membranes prises avec la Gbox (Syngene) et l'intensité des bandes a été estimée par le logiciel GeneTools (Syngene). La protéine normalisatrice utilisée pour ces analyses était l'actine.

Pour pallier aux difficultés d'interprétation des western blot qui rapportent de nombreux isoformes d'apeline, nous avons mis au point une méthode par immunofluorescence permettant d'évaluer dans son ensemble l'expression protéique d'apeline et APJ dans les ASC. Pour cela, les ASC saines et sclérodermiques (n=5 et n=8 respectivement) à un passage inférieur à P5 étaientensemencées dans des Lab-Tek™ dans un milieu DMEM/Hams12 supplémenté 10% sérum de veau fœtal. Le lendemain, les ASC étaient lavées en Phosphate-Buffered Saline (PBS) Ca²⁺/Mg²⁺, fixées à la paraformaldéhyde 3% pendant 15 minutes et mises en contact avec la solution de Quenche (NH₄Cl) pendant 10 minutes. Par la suite, les membranes étaient incubées avec les anticorps primaires anti-apeline (Invitrogen) et anti-APJ (Biorbyt) pendant 2 heures à température ambiante puis avec l'anticorps secondaire *donkey anti-rabbit* couplé à un fluorochrome (qui émet à 555nm) pendant 1 heure. Enfin, un contre marquage DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) était réalisé pour observer les noyaux cellulaires. Les photos étaient prises à l'aide du microscope inversé Leica DMI8. Les quantifications des intensités de fluorescence d'apeline et APJ ont été faites sur le logiciel Fiji, auxquelles ont été soustraits les signaux de fluorescence associés au bruit de fond issu d'un contrôle isotypique.

- **Résultats**

Aucune différence significative n'a été mise en évidence, aussi bien au niveau des transcrits que de l'expression protéique par les différentes méthodes analytiques employées. Les résultats sont présentés dans la Figure 31 ci-dessous. Pour les résultats de western blot,

plusieurs bandes correspondant à différents isoformes ont été mises en évidence. Nous avons choisi de quantifier uniquement celle de l'apeline-36, isoforme reconnu comme un des plus actifs *in vivo*. Il est important de noter la large distribution des valeurs obtenues.

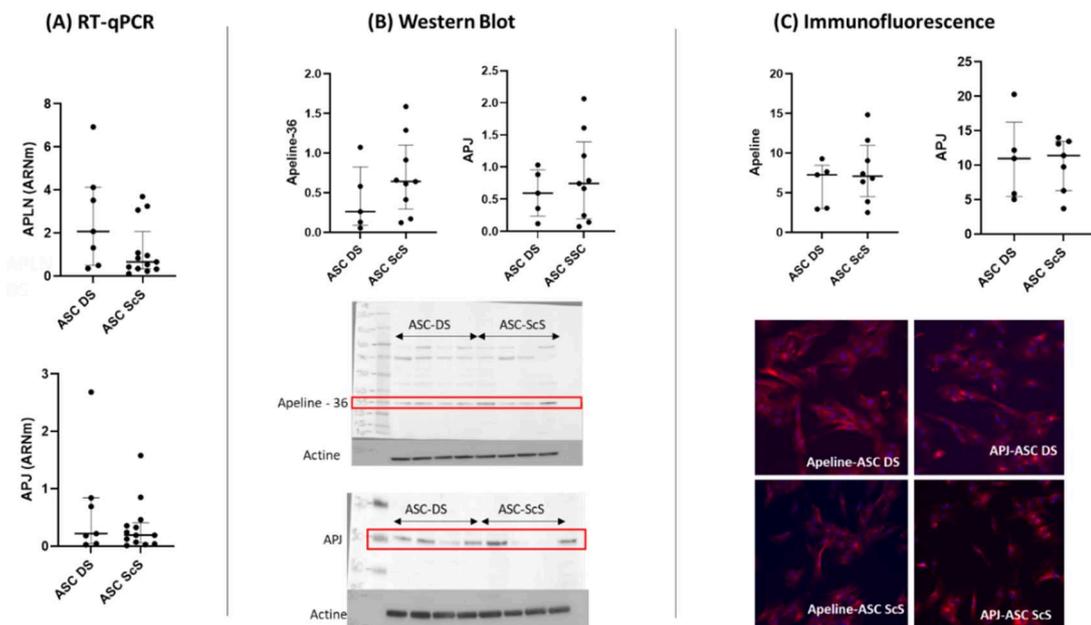


Figure 31 : Niveaux d'expression de l'apeline et son récepteur APJ dans les ASC de donneurs sains (ASC-DS) et de patients sclérodermiques (ASC ScS) évalués par (A) RT-qPCR, (B) Immunofluorescence et (C) Western Blot

4.2.3. Impact de la voie apelinergique sur le potentiel angiogénique de la FVS du tissu adipeux

Dans cette partie, nous avons cherché à évaluer l'impact des modulations de la voie apelinergique sur le potentiel angiogénique de la FVS.

- **Matériels et Méthodes**

Dans l'objectif de déterminer s'il existe un profil particulier du potentiel angiogénique de la FVS associé à la stimulation ou à l'inhibition de la voie apelinergique, nous avons conditionné des cellules de FVS saines (n=4) et sclérodermiques (n=4) avec de l'apeline recombinante et un inhibiteur compétitif du récepteur APJ : le F13A. Cet antagoniste présente une substitution de deux acides aminés en position C-terminale de l'apeline⁵²⁶.

Après décongélation et lavages des cellules de la FVS, un compte cellulaire en cellule de Malassez était réalisé avant de lancer les tests de bourgeonnement en sphéroïdes et de formation de pseudo-tubes en Matrigel® sous différentes conditions de stimulation. D'après la littérature disponible, nous avons testé trois doses croissantes de stimulation par l'apeline recombinante (10, 100 et 1000 ng/ml) et trois doses d'inhibiteur F13A (2, 20 et 200 ng/ml).

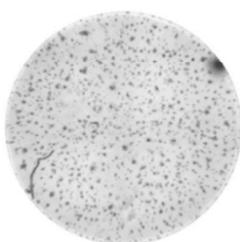
Pour les tests de formation de pseudo-tubes en Matrigel®, les cellules étaient déposées au sein du gel polymérisé à raison de 20 000 cellules par puits de lame *μ-slide angiogenesis* (Ibidi). Chaque condition de stimulation était réalisée en triplicat. Nous avons analysé la formation de pseudo-tubes à 3 temps précoces (24h, 48h et 72h) et un temps tardif (8 jours après ensemencement) grâce à des analyses quantitatives d'images (x20, Leica DM18).

Concernant les essais de bourgeonnement, également appelés tests en sphéroïdes, les cellules de FVS étaient ensemencées à raison de 400 cellules par puits sur des plaques 96 puits, à fond en U non *coatées* (Started) pendant 48h en milieu EGM-2MV/carboxyméthylcellulose. Après contrôle microscopique de la formation des sphéroïdes, nous les avons placés dans un mélange EGM-2MV/carboxyméthylcellulose/collagène. Après polymérisation du gel, les sphéroïdes alors « bloqués » dans le gel, étaient soumis à une stimulation par les différentes solutions d'apeline recombinante et de F13A pendant 24 heures. Par la suite, les sphéroïdes ont été perméabilisés au Triton X-100 et immunomarqués *overnight* à 4°C. La phalloïdine était marquée à l'Alexa-647 (Thermo Fisher Scientific) et les noyaux cellulaires au DAPI. Les photos ont été prises selon une « pile d'images » le long de l'axe z pour capturer l'ensemble du sphéroïde (grossissement 20X, n≥30 sphéroïdes par condition). Enfin, les images étaient traitées avec un logiciel de déconvolution Huygens Essential avant d'être analysées et quantifiées à l'aide du logiciel Fiji.

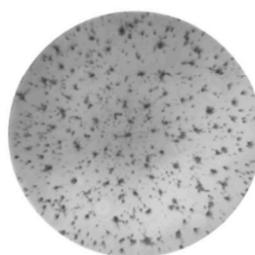
- **Résultats**

Les cellules de FVS présentent une cinétique de formation des pseudo-tubes en Matrigel® différente des cellules endothéliales purifiées. En effet, une population cellulaire endothéliale homogène présente un pic angiogénique environ à 6h post-ensemencement sur le Matrigel® et l'effondrement des réseaux survient à 24h en raison de l'absence de cellules périvasculaires. Dans le cas des cellules de FVS, plusieurs étapes successives conduisent à la formation des réseaux pseudo-tubulaires sur la matrice, avec une cinétique plus longue grâce au « cocktail » cellulaire contenu dans la FVS: (1) la formation d'agrégats cellulaires, (2) le bourgeonnement des agrégats par les cellules endothéliales de type « *tip cells* » après 24 à 72h (3) la migration et l'élongation des structures grâce aux cellules endothéliales de type « *stalk cells* » et (4) la stabilisation des motifs pseudo-tubulaires par les cellules périvasculaires après 8 jours d'incubation (Figure 32).

1/ Formation d'agrégats cellulaires (J2)



2/ Bourgeonnement par les tip cells (J3-J4)



3/ Formation et stabilisation de structures pseudo-tubulaires (J8)

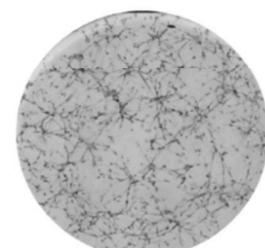


Figure 32 : Cinétique de formation des structures pseudo-tubulaires par les cellules de FVS

Lors de l'analyse d'images, nous avons quantifié plusieurs paramètres :

- Pour les tests en Matrigel® : la proportion de *tip cells* et *stalk cells* après 2 et 3 jours, la longueur totale du réseau, le nombre de boucles et de jonctions des réseaux au 8^e jour
- Pour les tests en sphéroïdes : le nombre de bourgeonnements, la longueur moyenne des bourgeonnements, le nombre de jonctions par bourgeonnement et la longueur totale de l'ensemble des bourgeonnements

Les Figures 33 et 34 ci-dessous récapitulent les profils angiogéniques *in vitro* de FVS saines et sclérodermiques en réponse aux différentes stimulations avec de l'apeline recombinante et l'antagoniste (F13A) à trois doses différentes respectivement testées.

Les résultats montrent une importante hétérogénéité inter-donneurs malgré la normalisation des résultats sur une condition standard (EGM-2MV). De plus, nous ne mettons pas en évidence de différence significative sur le potentiel angiogénique *in vitro* de la FVS entre les différentes conditions de modulation de la voie apelinergique.

Néanmoins, quelques tendances se dégagent, principalement sur les doses les plus élevées d'apeline. En effet, une stimulation importante par l'apeline recombinante tend à réduire la proportion de *tip cells* dans les tests en Matrigel® en phase précoces pour les échantillons sclérodermiques (Figure 33). Le profil inverse semble se dégager pour les cellules de FVS issues de donneurs sains qui semblent répondre plus favorablement à la stimulation par l'apeline (Figure 34).

Ces résultats suggèrent une adaptation différente des cellules de patients sclérodermiques en réponse aux modulations de la voie apeline/APJ par rapport aux FVS de donneurs sains. Ces données préliminaires nécessitent d'être confirmés sur un effectif plus grand.

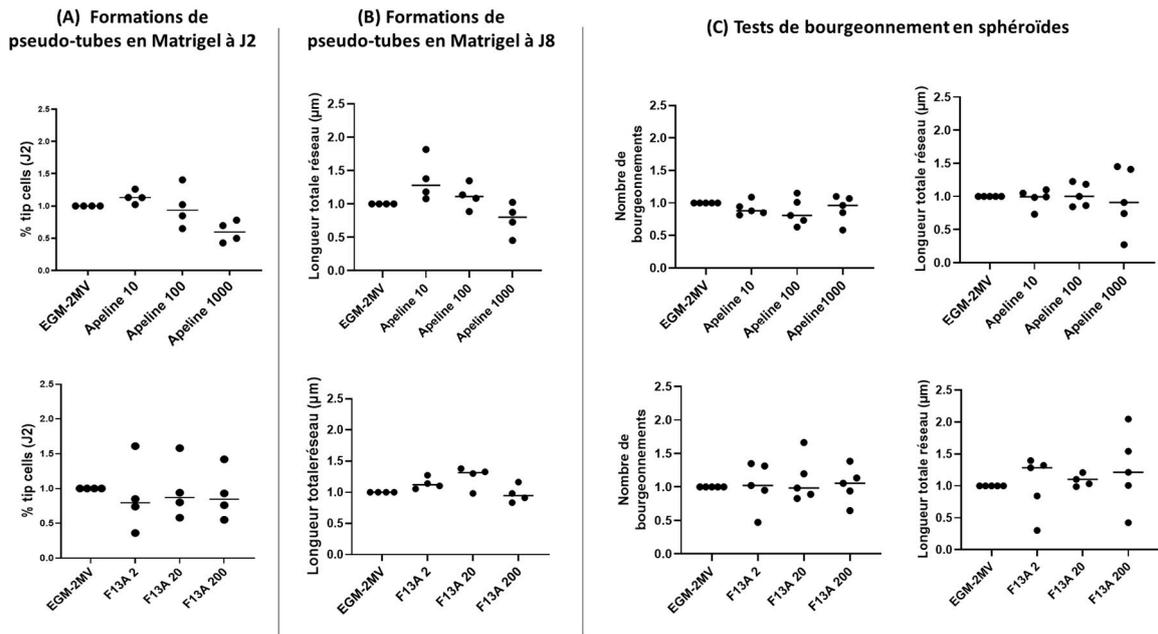


Figure 33 : Profils angiogéniques *in vitro* de FVS sclérodermiques en réponse aux différentes modulations de la voie apelinergique

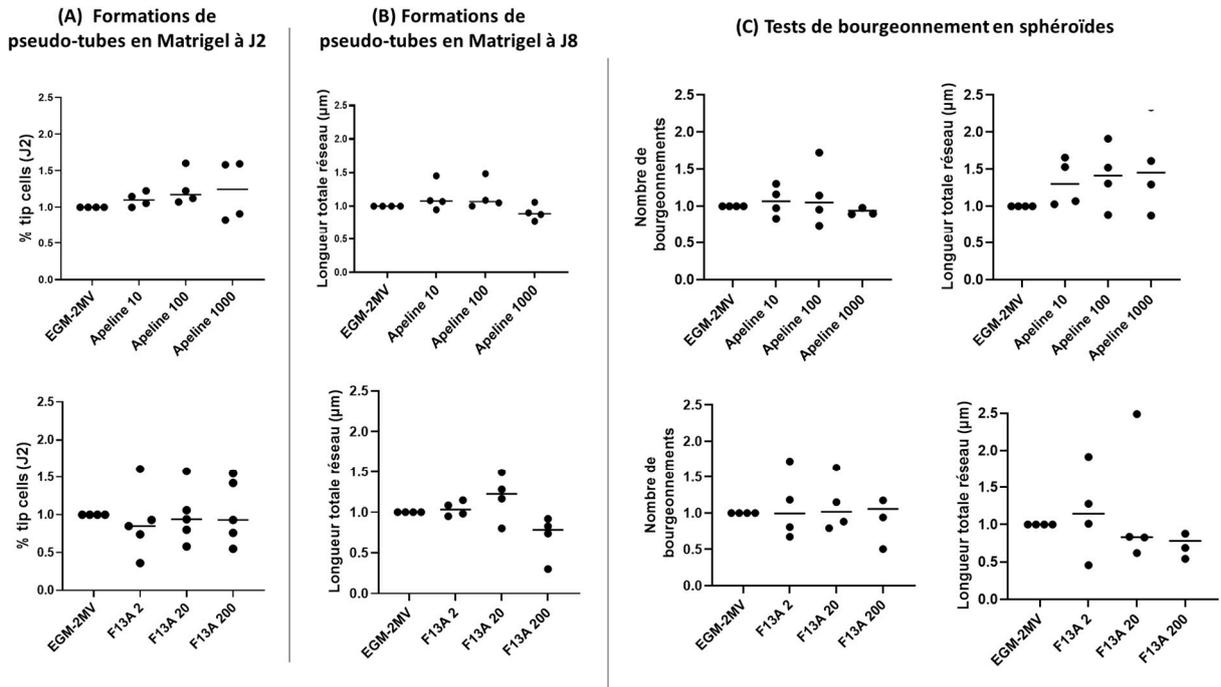


Figure 34 : Profils angiogéniques *in vitro* de FVS de donneurs sains en réponse aux différentes modulations de la voie apelinergique

4.2.4. Taux réduits d'apeline sérique chez les patients sclérodermiques

Cette partie du travail s'est intéressée à doser l'apeline circulante dans une cohorte de patients sclérodermiques et à les comparer aux niveaux sériques observés chez des donneurs sains.

- **Matériels & Méthodes**

Nous avons réalisé ces dosages sériques dans une cohorte de 12 donneurs sains et 21 patients sclérodermiques (7 formes diffuses et 14 formes limitées). Nous avons utilisé une méthode immunoenzymatique (Phoenix Pharmaceuticals) pour quantifier les niveaux d'apeline circulante. Il est important de noter que ce test permet la détection croisée de 3 isoformes majoritaires circulants : l'apeline-12, l'apeline-13 et l'apeline-36.

- **Résultats**

L'analyse des résultats montre une réduction significative des taux d'apeline circulante chez les patients sclérodermiques, particulièrement chez les patients présentant une forme cutanée diffuse de la ScS par rapport aux donneurs sains (Figure 35).

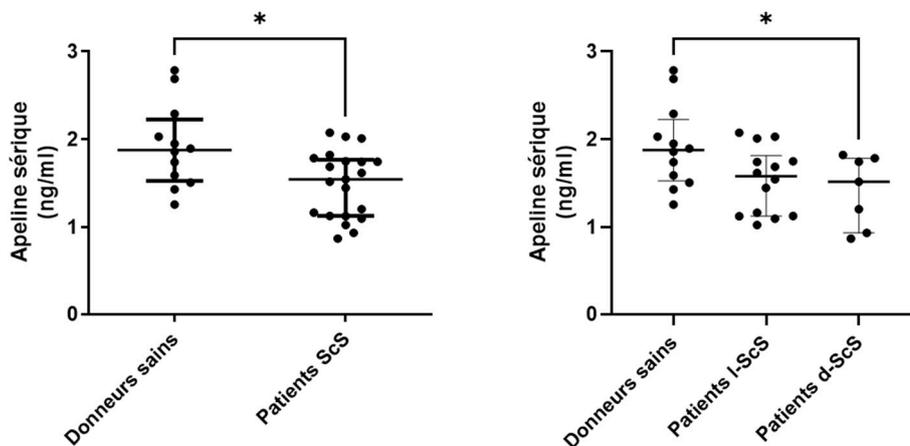


Figure 35 : Dosage d'apeline sérique dans une cohorte de donneurs sains et patients sclérodermiques

Les différentes approches utilisées pour caractériser les modulations de la voie apelinergique au cours de la ScS nous permettent d'identifier les points de conclusions suivants :

1) Ce travail a d'abord permis de valider la stratégie de tri des progéniteurs endothéliaux ECFC par séparation immunomagnétique sur des échantillons de FVS saines. Néanmoins, nous avons mis en évidence la difficulté d'isolement des ECFC par cette méthode à partir d'échantillons de patients sclérodermiques. Ainsi, d'autres stratégies sont en cours de développement pour isoler des ECFC de patients sclérodermiques à partir de la FVS.

2) Nous avons dans un second temps développé et validé de nouveaux outils permettant de déterminer les niveaux d'expression d'apeline et de son récepteur APJ dans des ASC saines et issues de patients. Bien que l'apeline soit surexprimée en contexte sclérodermique dans la FVS prise dans sa globalité, les résultats montrent qu'il n'y a pas de modulation significative d'expression d'apeline ni de son récepteur APJ dans la composante mésenchymateuse expansée.

3) Concernant l'étude du potentiel angiogénique *in vitro* de cellules de FVS saines et sclérodermiques dans différentes conditions de modulation de la voie apelinergique ; les résultats ne mettent pas en évidence d'impact significatif. A ce stade, nous ne pouvons pas dégager de conclusions en raison d'un nombre réduit d'échantillons testés, d'une forte hétérogénéité inter-donneurs et d'une variabilité intrinsèque aux tests mis en œuvre.

4) Les concentrations d'apeline sérique sont diminuées chez les patients sclérodermiques, particulièrement chez ceux atteints d'une forme cutanée diffuse, comparativement aux donneurs sains.

PARTIE 4 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le nombre d'essais cliniques évaluant la Fraction Vasculaire Stromale (FVS) du tissu adipeux (TA) et/ou les *Adipose-derived Stromal/stem Cells* (ASC) est exponentiel depuis quelques années. Néanmoins, seuls de très rares Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) reposant sur ces approches sont actuellement sur le marché. Le renforcement des connaissances physiopathologiques et des mécanismes d'action associés aux approches thérapeutiques dérivées du TA est indispensable pour permettre le développement clinique de nouvelles stratégies de thérapie cellulaire. Grâce à sa richesse en progéniteurs endothéliaux et mésenchymateux, la FVS exerce de multiples propriétés, notamment de régénération tissulaire et de vasculaire. Néanmoins, l'impact potentiel de maladies systémiques sur le potentiel thérapeutique de la FVS est indispensable. **Ce travail de thèse s'inscrit dans la nécessité de progresser dans la caractérisation des propriétés biologiques des cellules progénitrices de la FVS du TA au cours de la Sclérodémie Systémique (ScS).**

Un débat demeure concernant la pertinence des approches autologues pour la prise en charge de la ScS et plus généralement, des maladies auto-immunes. Au cours de la ScS, la vasculopathie ischémique et les lésions de fibrose se développent dans un contexte d'auto-immunité. L'imbrication de ces trois composantes physiopathologiques conduit à des manifestations cliniques variables, à une altération significative de la qualité de vie et dans les formes les plus graves, à la mise en jeu du pronostic vital.

Dans ce contexte, **l'objectif de mon travail de doctorat est de caractériser le potentiel angiogénique et antifibrotique de la FVS et plus particulièrement de sa composante mésenchymateuse dans le contexte sclérodermique.**

- *Impact de la ScS sur les caractéristiques cellulaires générales de la FVS et des CSM dérivées du TA*

D'une façon générale, ce travail montre que la **FVS et les ASC issues de donneurs sains et de patients sclérodermiques sont similaires au regard des critères de qualification standard.** En effet, les FVS de patients sclérodermiques de grade clinique montrent une richesse et une viabilité cellulaires comparables aux FVS saines. De même, l'analyse des différentes sous-populations cellulaires, sur la base d'une stratégie de cytométrie en flux multiparamétrique, révèle une répartition équivalente entre FVS saines et sclérodermiques. Ainsi, la ScS ne réduit pas la quantité de cellules dites « régénératives » (CD45-) contenues dans la FVS du TA. Cette étude est la première à fournir une caractérisation *in vitro* aussi détaillée de la composition cellulaire de la FVS en contexte sclérodermique.

De même, **l'étude ciblée sur les ASC** montre que les capacités de différenciation en adipocytes et en ostéoblastes sont conservées en contexte sclérodermique, de même que le profil phénotypique évalué sur douze marqueurs de surface différents. D'autres études confortent la conservation des critères d'identité des CSM en contexte sclérodermique^{320,507}. Cependant, Virzi *et al.* rapportent une modification du phénotype caractérisée par la réduction du niveau d'expression des marqueurs CD44, CD29 et CD79 à la surface des ASC

sclérodermiques par rapport aux ASC saines⁴²⁷. Dans cette même étude, les auteurs mettent en évidence une altération de la capacité de différenciation des ASC sclérodermiques et plus particulièrement, une incapacité à aboutir à une maturation complète en adipocytes et en ostéocytes.

Concernant le niveau de sénescence des ASC, l'analyse de l'expression de la β -galactosidase, du cycle cellulaire et de différents transcrits d'intérêt ne met pas en évidence un profil plus sénescé pour les ASC sclérodermiques dans ce travail. A l'inverse, Cipriani *et al.* montrent une surexpression de la β -galactosidase dans les CSM de MO des patients sclérodermiques. Ces résultats hétérogènes, et parfois contradictoires, sont à interpréter au regard de la variabilité des méthodes d'isolement et d'expansion des CSM mais aussi des différentes sources tissulaires étudiées et enfin de l'hétérogénéité inter-patients, caractéristique de la ScS.

- *Impact de la ScS sur les propriétés fonctionnelles des progéniteurs contenus dans le TA*

Suite à ces premiers résultats sur les caractéristiques générales des cellules, nous nous sommes demandés : ***Qu'en est-il des propriétés fonctionnelles des cellules régénératives de la FVS en contexte sclérodermique et plus particulièrement, de la composante mésenchymateuse ?***

A ce jour, aucune donnée ne permet d'établir un lien entre la répartition quantitative des différentes sous-populations cellulaires et la capacité de la FVS à exercer un effet thérapeutique. Par ailleurs, la mise en évidence de progéniteurs endothéliaux dans la paroi vasculaire incite à considérer le TA comme une source intéressante dans un objectif de régénération vasculaire. La capacité de la FVS à former des néovaisseaux repose principalement sur la coopération cellulaire et paracrine entre les progéniteurs endothéliaux et mésenchymateux^{440,527,469}.

Nous rapportons dans ce travail une caractérisation du potentiel angiogénique de la FVS dans le contexte sclérodermique. Différents tests fonctionnels angiogéniques *in vitro* et *in vivo* complémentaires ont été mis en œuvre pour comparer la capacité de néovascularisation et de réparation vasculaire de la FVS de donneurs sains et de patients sclérodermiques. Seule la densité vasculaire, évaluée dans un test de *Matrigel plug* chargé en cellules humaines de FVS sclérodermique chez les souris *Nude*, était significativement réduite comparativement à des FVS saines. Néanmoins, ***l'étude plus globale de ces tests angiogéniques révèle une légère altération de la capacité de la FVS extraite en contexte sclérodermique à former des néovaisseaux.***

Pour explorer les mécanismes moléculaires associés au potentiel thérapeutique de la FVS, nous avons réalisé une caractérisation transcriptomique enrichie d'une approche de séquençage d'ARN à l'échelle cellulaire (*Single Cell RNA Sequencing*). Nous avons identifié une

signature transcriptomique spécifique des échantillons de FVS sclérodermiques avec la modulation d'environ 300 gènes. De plus, six populations cellulaires distinctes ont été identifiées sur la base de leur profil d'expression génique : deux populations leucocytaires et quatre populations régénératives (stromale, péricytaire et deux sous-populations endothéliales). Le croisement de résultats entre les données du transcriptome et du *Single Cell RNA Sequencing* suggère que les populations endothéliales et mésenchymateuses sont les plus atteintes par ces modulations. Ces résultats nous ont conduits à étudier plus spécifiquement les propriétés biologiques des populations cellulaires endothéliales et mésenchymateuses.

Nous avons également évalué le potentiel paracrine antifibrotique de la FVS saine non expansée dans un modèle *in vitro*. Pour cela, un modèle original de fibrose a été développé en collaboration l'université de Graz (Autriche) selon les principes du *Macromolecular Crowding* associés à une stimulation par le TGFβ1. **Nous montrons que les FVS issues de sujets sains peuvent réduire les marqueurs de fibrose (αSMA et dans une moindre mesure les collagènes fibrillaires) par des mécanismes paracrines.** De plus, le potentiel antifibrotique des ASC saines évalué dans ce même modèle semblait légèrement réduit par rapport aux FVS. A l'inverse, Domergue *et al.* ont montré que les ASC de donneurs sains avaient un effet antifibrotique supérieur à celui des FVS non expansées dans un modèle de cicatrice hypertrophique⁴⁷⁴.

L'étude ciblée dans ce travail sur la composante mésenchymateuse révèle un potentiel paracrine pro-angiogénique *in vitro* maintenu chez les patients sclérodermiques, bien que légèrement réduit par rapport aux ASC saines. En accord avec ces données, Griffin *et al.* suggéraient une réduction des capacités de migration et d'invasion des ASC de patients sclérodermiques sur un nombre limité d'échantillons⁵⁰⁷. L'originalité de cette étude centrée sur la composante mésenchymateuse a été d'évaluer *in vitro* la capacité des ASC à réduire les marqueurs de fibrose de fibroblastes dermiques de patients sclérodermiques. **Les résultats suggèrent une supériorité d'efficacité des ASC sclérodermiques à réduire la fibrose *in vitro* comparativement à des ASC saines, en faveur d'un *priming* des ASC sclérodermiques.** Nous pouvons nous interroger : *Les ASC conservent-elles un profil particulier lié au contexte sclérodermique après expansion ex vivo les rendant plus efficaces pour lutter contre les processus fibrotiques ?* Cette capacité antifibrotique accrue conforterait l'idée que les CSM ont une capacité d'adaptation face aux processus pathologiques. Un tel concept selon lequel les CSM intègrent les signaux de leur environnement pour développer les réponses régénératives adaptées a récemment été documenté dans le cadre des processus de cicatrisation cutanée⁵²⁸.

Les limites de ces travaux sont principalement l'absence d'évaluation des ASC dans des modèles *in vivo* ainsi que l'étude d'un nombre restreint d'échantillons. De plus, l'hétérogénéité de la maladie et la complexité des mécanismes physiopathologiques associés à la ScS conduisent à une grande variabilité inter-donneurs. Un effectif important est donc

nécessaire pour conduire à des conclusions robustes. Cependant, la rareté de la maladie et la faible fréquence des lipoaspirations/lipofillings réalisés chez ces patients en font des échantillons extrêmement précieux.

- Etude de la voie apelinergique au cours de la ScS

Les approches par *single cell RNA sequencing* sont des méthodes relativement récentes qui caractérisent les modulations de transcrits à l'échelle de la cellule permettant ainsi d'identifier différentes sous-populations cellulaires sur la base d'un profil d'expression de gènes. Cette technique se révèle donc particulièrement utile pour étudier les tissus complexes tels que la peau ou la FVS du TA. Plusieurs études ont utilisé l'approche par *single cell RNA sequencing* pour appréhender les mécanismes physiopathologiques complexes de la ScS. Par exemple, Valenzi *et al.* rapportent une hétérogénéité des fibroblastes présents dans les poumons de patients sclérodermiques¹⁰⁴. La présence d'une population spécifique de fibroblastes activés et présentant un profil myofibroblastique est en faveur de l'implication de ce mécanisme dans l'établissement de la fibrose pulmonaire chez les patients sclérodermiques. De même, l'étude d'Apostoldis *et al.* met en évidence un profil particulier de gènes dans les cellules endothéliales contenues dans des biopsies cutanées de patients sclérodermiques par rapport à des échantillons sains⁵²². Il est particulièrement intéressant de noter que le gène du récepteur à l'apeline (APJ) est surexprimé dans le cluster endothélial d'échantillons sclérodermiques. Cette étude rappelle les résultats que nous avons générés sur la FVS où **nous montrons une surexpression du gène de l'apeline dans les FVS de patients sclérodermiques**. Ces résultats incitent à explorer plus en profondeur la voie apelinergique et ses dérégulations au cours de la ScS.

C'est pourquoi, nous avons investigué dans quelle mesure la surexpression d'apeline dans les FVS sclérodermiques pouvait être associée à une altération du potentiel de régénération vasculaire. En effet, l'apeline est décrite comme activatrice de signaux pro-angiogéniques ; or la FVS de patients sclérodermiques présentent un déficit fonctionnel modéré sur la régénération vasculaire. L'*up-regulation* de l'apeline observée en contexte sclérodermique peut alors être interprétée comme une réponse compensatrice qui tente de combler le déficit vasculogénique de la FVS ou comme le témoin d'une angiogenèse anarchique conduisant à une vascularisation inefficace. Pour cela, nous avons réalisé des tests angiogéniques *in vitro* après stimulation de FVS saines et sclérodermiques par de l'apeline recombinante ou par un antagoniste du récepteur de l'apeline. **Nous ne mettons pas en évidence d'impact significatif des modulations de la voie apelinergique sur la capacité angiogénique de la FVS**. Néanmoins, des tendances se dégagent et permettent d'identifier des profils distincts entre les FVS saines et les FVS sclérodermiques. L'interprétation de ces résultats complémentaires est limitée en raison d'un nombre réduit d'échantillons et une forte variabilité inter-donneurs.

Par ailleurs, **les niveaux d'expression d'apeline et de son récepteur APJ dans les ASC de patients sclérodermiques sont similaires à ceux des ASC saines**. Cependant, des tests fonctionnels seraient nécessaires pour évaluer dans quelle mesure l'exposition des ASC à de

l'apeline recombinante potentialiserait leur potentiel angiogénique et antifibrotique. En effet, de rares études rapportent un rôle protecteur de l'apeline contre le stress oxydatif intracellulaire⁵²⁹ ou encore contre l'apoptose induite par des phénomènes ischémiques⁵¹⁹. De plus, l'apeline favorise la survie des CSM et la vascularisation *in vitro* dans des conditions d'hypoxie⁵³⁰.

Concernant **les niveaux circulants d'apeline**, deux études publiées à ce jour rapportent des variations de taux d'apeline sérique en contexte sclérodermique. Une première étude rapporte des taux d'apeline sérique similaires entre les patients atteints de ScS et les sujets sains⁵²³. Néanmoins, les auteurs rapportent des taux plus élevés dans les phases précoces de la maladie (moins de 3 ans) suggérant une implication de la voie apelinergique dans l'initiation des manifestations vasculaires ou au contraire une élévation systémique compensatrice en réponse au développement des lésions endothéliales. La seconde étude met en évidence une corrélation négative entre les niveaux d'apeline sérique et le mRSS ainsi que des taux plus faibles chez les patients sclérodermiques ayant développé des UD⁵²¹. **Les dosages d'apeline sérique réalisés sur notre cohorte montrent une réduction de l'apeline circulante chez les patients sclérodermiques comparativement à des sujets sains.** Ces résultats sont à interpréter conjointement avec la surexpression de l'apeline dans les cellules de la FVS du TA. La figure 36 ci-dessous illustre les principaux résultats obtenus sur les modulations de la voie apelinergique dans les progéniteurs du TA au cours de la ScS.

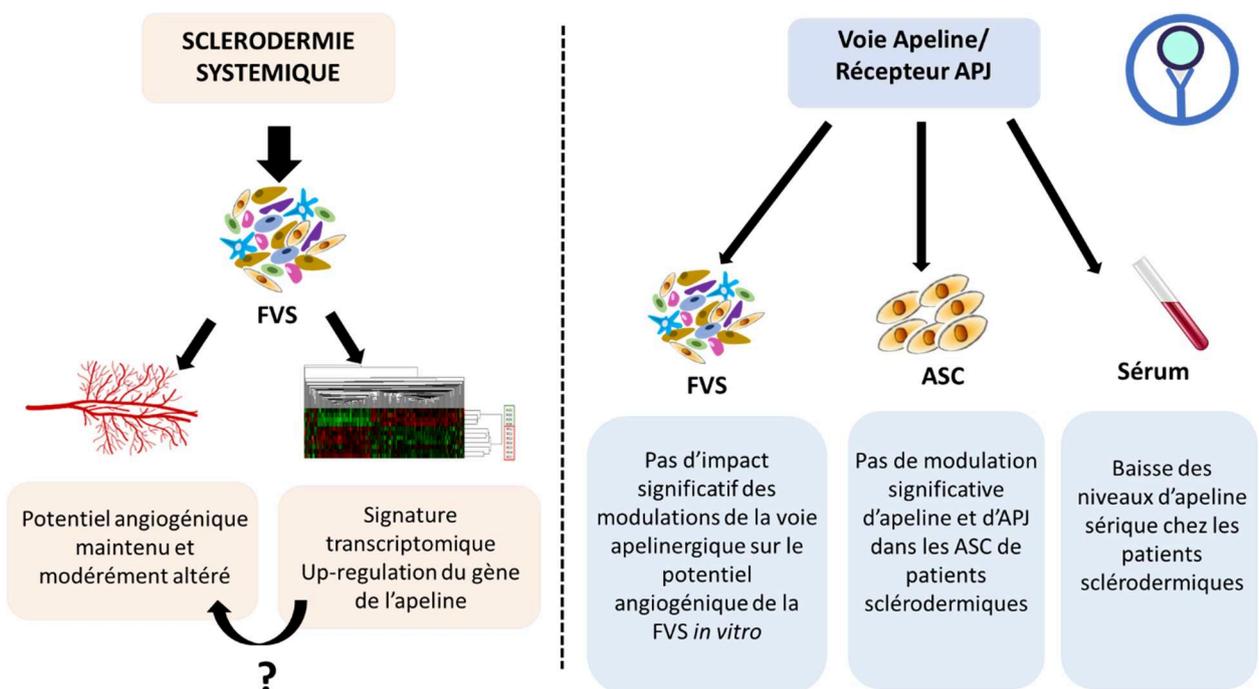


Figure 36 : Principaux résultats obtenus sur les modulations de la voie apelinergique dans les progéniteurs du tissu adipeux au cours de la ScS

- Stratégies d'isolement des progéniteurs endothéliaux

A ce jour, les études évaluant l'impact de la ScS sur les propriétés biologiques des CSM isolées du TA et expansées *ex vivo* rapportent des conclusions hétérogènes. Cependant, il est important de souligner que ces résultats ne peuvent pas être extrapolés à la FVS considérée dans son ensemble. Au-delà d'une forte proportion de CSM, la FVS est une source particulièrement intéressante de progéniteurs endothéliaux de type *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC). Nous pouvons ainsi considérer que **la FVS possède deux « substances actives » : les CSM et les ECFC**, dont l'action synergique sur la régénération vasculaire est mal documentée en contexte sclérodermique.

En addition des effets biologiques multiples qui lui sont attribués et qui en font un produit thérapeutique intéressant, la FVS peut également être considérée comme un modèle d'étude de la vasculopathie sclérodermique *ex vivo*. Pour ces deux raisons, nous avons mis au point **une méthode d'isolement des ECFC depuis des FVS saines par des méthodes de séparations immunomagnétiques. Malheureusement, les tentatives d'isolement des ECFC extraites à partir de FVS de patients sclérodermiques ont été des échecs** et aucune étude publiée à ce jour ne documente les caractéristiques des ECFC du TA de patients sclérodermiques. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations. D'abord les ECFC pourraient présenter une altération de leur potentiel clonogénique et prolifératif en contexte sclérodermique. Cela justifierait la forte contamination par les CSM lors des tentatives d'isolement depuis des FVS de patients sclérodermiques, puisque le potentiel prolifératif des CSM est conservé au cours de la ScS. Cependant, certains groupes ont réussi à isoler des progéniteurs endothéliaux, notamment à partir de biopsies cutanées grâce à des tris de cellules CD31 positives. Cela questionne également sur le choix du marqueur utilisé pour les tris immunomagnétique. En effet, une baisse d'expression de la VE-Cadhérine (CD144) par clivage et internalisation à la surface des cellules endothéliales est documentée en contexte sclérodermique³⁹.

- Perspectives du travail

Le manque d'efficacité de la FVS autologue en clinique, notamment dans l'essai SCLERADEC 2, incite à imaginer des stratégies d'optimisation. La mise en évidence de modulations de voies moléculaires au cours de la ScS est une piste pour mieux anticiper le possible impact délétère du contexte pathologique sclérodermique sur les propriétés de la FVS. Parmi les gènes identifiés, nos travaux à venir s'intéresseront particulièrement aux voies impliquées dans les processus angiogéniques et fibrotiques.

Cependant, la réduction modérée du potentiel angiogénique de la FVS issue de patients sclérodermiques n'est pas suffisante pour expliquer l'absence de supériorité de l'approche par FVS autologue *versus* placebo. La caractérisation des propriétés trophiques, anti-apoptotiques et antifibrotiques des FVS de patients sclérodermiques permettrait d'évaluer d'avantage la possible altération du potentiel thérapeutique des cellules progénitrices du tissu adipeux au cours de la ScS.

De plus, les résultats de l'essai de phase II STAR soulignent l'importance de l'hétérogénéité inter-patients. En effet, l'administration de FVS autologues au niveau des doigts de patients sclérodermiques montre un bénéfice significatif contre placebo pour les patients atteints de forme cutanée diffuse. Cela incite à mieux identifier les patients bon répondeurs à travers des tests de *screening* non invasifs.

Aussi, des approches d'ingénierie cellulaire sont envisagées, notamment celles par tris cellulaires qui pourraient sélectionner des cellules d'intérêt ou éliminer les cellules délétères à l'efficacité de la FVS. Par exemple, notre équipe a généré des données préliminaires sur la fraction cellulaire triée CD45+ de FVS issues de patients sclérodermiques. L'exposition de cellules endothéliales à cette population leucocytaire issue de la FVS conduit à une activation endothéliale ainsi qu'à la libération accrue de microvésicules endothéliales comparativement à des fractions cellulaires CD45+ de FVS saines.

Par ailleurs, une étude approfondie et systématique des différentes populations cellulaires de la FVS (et notamment des populations endothéliales) en contexte sclérodermique permettrait de mieux comprendre les potentiels déficits fonctionnels et donc de les corriger. Pour cela, nous cherchons des solutions alternatives pour isoler des cellules endothéliales à partir de la FVS puisque les approches de sélections immunomagnétiques se sont révélées à ce jour inefficaces pour les échantillons extraits de patients sclérodermiques. Parmi les stratégies possibles, l'emploi de techniques de reprogrammation génétique à partir de CSM pour l'obtention de cellules souches pluripotentes induites qui seraient ensuite différenciées en cellules endothéliales constitue une piste attractive. Au-delà d'une meilleure compréhension des propriétés thérapeutiques de la FVS en contexte sclérodermique, l'isolement de cellules endothéliales de patients ouvre des perspectives physiopathologiques ; avec notamment la caractérisation plus approfondie de la vasculopathie ischémique au cours de la ScS.

Au total, ce travail permet de mieux appréhender l'impact de la ScS sur les propriétés biologiques des cellules progénitrices de la FVS du TA. Les résultats de ce travail supportent globalement le développement d'approches autologues dérivées du TA dans la ScS. De plus, ils ouvrent des perspectives vers l'optimisation des stratégies d'ingénierie cellulaire ou moléculaire dans le but de renforcer l'efficacité thérapeutique de ces produits de thérapie cellulaire.

Annexes

Annexe 1 : *Supplemental data de l'article original n°1*

Materials and Methods

Donor specifications

The inclusion criteria were as follows: patients > 18 years with diffuse or limited SSc according to the EULAR criteria and a Cochin hand function scale (CHFS) score >20. The exclusion criteria were a body mass index <18, major finger skin tightening, severe tendon retraction, digital infection, contraindication to surgery, pulmonary arterial hypertension, and oxygen-dependent pulmonary fibrosis. The clinical data available at the time of SVF collection included the CHFS score, hand pain assessed with the visual analogical scale (VAS), the modified Rodnan skin score, the Raynaud's phenomenon condition score, the Scleroderma Health Assessment Questionnaire (SHAQ) and the Medsger severity scale score.

Isolation of the stromal vascular fraction

Adipose tissue harvesting was performed using a standardized method in a closed circuit with a 3 mm Coleman cannula. Once harvesting was complete, the bag was immediately transported to the registered Cell Therapy Unit. SVF was obtained within 2 h after lipoaspiration using the Celution800/CRS automated processing system (Cytori Therapeutics, San Diego, California, USA) and according the manufacturer instruction. The collected lipoaspirate was washed with Ringer Lactate (Baxter Inc, Opelika, AL, USA) and enzymatically digested with Celase® GMP collagenase (Worthington, Lakewood, NJ, USA). The cells were concentrated, washed, aseptically recovered and resuspended in lactate Ringer's solution. The final cell suspension was transferred to 10 syringes (1 ml) for injection into SSc patients. The remaining volume was used for sterility testing, biological characterization, and biobanking. Total viable nucleated cells, CFU-F assay, flow cytometry analysis were performed on fresh SVF for both SSc patients and healthy controls. Transcriptomic analysis and gene expression by RT-PCR were performed after lysis of freshly isolated SVF cells. Functional tests including tube formation assays, spheroid based sprouting assays and *in vivo* vasculogenesis experiments were performed on frozen/thawed for both patients and controls. These experiments were performed i) after checking viability of thawed SVF cells and ii) by systematically associated one SSc patient to a paired healthy donor in a given set of experiments in order to avoid any bias linked to manipulations.

Total viable nucleated cells and CFU-F assay

Total viable nucleated cell recovery and the viability percentage were determined using a Nucleocounter NC100 (ChemoMetec, Denmark). The clonogenic potential of the MSCs from the SVF was assessed using the CFU-F assay, as follows: 500 SVF cells were seeded into a six well plate in triplicate in proliferation medium : 45%DMEM / 45%HAMS-F12/ 10%fetal bovine serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), GlutaMAX® (100X, Gibco)

gentamicin (Panpharma Luitré, France) penicillin G (Panpharma Luitré, France), fungizone (Bristol-Meyers Squibb, New York, NY, USA). The colonies were then grown for 10 to 14 days, depending on the growth rate of the cells. At the end of the assay, the culture dishes were rinsed twice with phosphate-buffered saline (Gibco), fixed with 10% neutral buffered formalin for 20 minutes, and then stained with 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Cell colonies were counted using phase-contrast microscopy. All three culture dishes were counted, and the average and standard deviation were calculated to generate the final frequency percentage value expressed as the colony-forming efficiency by division by the number of cells seeded $\times 100$.

Flow cytometry analysis of SVF cell subsets

Characterization of the SVF cell subpopulations was performed according to the recommendations of the International Federation of Adipose Therapeutics and Sciences (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy [1]. Briefly, the SVF suspension was digested with 10 U/ml DNase I (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA) in DPBS Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-free medium (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), containing 0.1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA), 25 mM Hepes (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), and 1% Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), for 15 minutes at 37°C, followed by filtration through a 70 μ m nylon cell strainer (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) to eliminate the majority of cell aggregates. The cells were then centrifuged, resuspended and labeled for 20 minutes at 4°C with the following fluorochrome-conjugated antibodies: CD14-FITC, CD90-FITC, CD146-PE, CD34-ECD, CD45-PC5, CD56-PC7, and CD3-APC-A750 (Respective clones RMO52, F15-42-1-5, TEA 1/34, 581, J33, N901 and UCHT1 from Beckman Coulter, Miami, FL, USA), or their isotype controls, to determine nonspecific binding. Red blood cells were lysed in NH₄Cl for 10 minutes at 4°C before the cells were centrifuged and resuspended in DPBS Ca⁺⁺/Mg⁺⁺. Then, NucBlue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), which allows the discrimination of viable and dead cells, was added for 5 minutes prior to flow cytometry analysis on a NAVIOS flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). CD45- cells were discriminated as CD34-CD146+CD90- pericytes, CD34+/-CD146+CD90+ transitional cells, CD34+CD146+ endothelial cells, or CD34+CD146-CD90+ stromal cells. For the CD45+ cells, after the identification of monocytes and macrophages, lymphocytes and polymorphonuclear cells were classically discriminated based on CD14+ expression using their CD45 expression levels and side-scatter characteristics. Finally, lymphocytes were discriminated as CD34-CD3- or CD34-CD3+ T lymphocytes. The gating strategy is provided in online supplementary Figure 1.

Tube formation assay

The SVFs from HDs (n=4) and SSc patients (n=4) were loaded at a density of 20,000 cells/well in a μ -slide angiogenesis (81506, IBIDI) system coated with 10 μ l of growth factor-reduced MatrigelTM (6 mg/ml) (Corning[®] Matrigel[®] Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, Phenol Red Free, 356231), previously polymerized for 30min, and were maintained

in endothelial basal cell culture medium-2 (EBM2) supplemented with MV SingleQuots (EGM2-MV) (Lonza, Clonetics, Walkersville, MD, USA) at 37°C with 5% CO₂. Capillary-like structures were recorded after 72 h using a Leica DMI8 video-imaging inverted microscope equipped with an Incubator I8 at 5X magnification and were captured using Leica Application Suite X software (Las X 3.0.2.16120). The network and length of tubes as well as the nodes were quantified using NIH ImageJ software with the Angiogenesis Analyzer plug-in [2]. Each experiment was performed in triplicate.

Spheroid-based sprouting assay

Angiogenic sprouting was analyzed *in vitro* using SVF in a collagen gel matrix as previously described by Korff *et al* [3]. Briefly, SVF from HDs (n=8) and SCL (n=8) was suspended in culture medium containing 0.2% (wt/vol) carboxymethylcellulose (M0512, Sigma, Munich, Germany), which was then seeded in non-adherent round-bottom 96-well plates (82.1582.001, Sartstedt), leading to the formation of spheroids with a defined cell number. After 48 h, the spheroids were collected and embedded in collagen gels (354236, Corning® Collagen I, Rat Tail). The spheroid containing gel was rapidly transferred into pre-warmed Labtek II slides (NUNC 54534, ThermoFisher) and allowed to polymerize (30 minutes), then 100µl of EGM2-MV medium were added on the top of the gel. Following 24 h of culture in EGM2-MV medium, the spheroids were fixed 30 minutes in 4% paraformaldehyde at room temperature. After washing and permeabilization 2 hours at 4°C with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% BSA, the spheroids were immunolabeled *overnight* at 4°C with phalloidin coupled to Alexa-647 (A22287, ThermoFisher Scientific) (1/100), and nuclei were stained with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1/5000) diluted in PBS 1% BSA. After washing, we then captured a fluorescent optical image stack along the z-axis at 20X magnification using two lasers in sequential mode under a Leica DMI8 microscope (n=10 spheroids per condition). Las X software was used during all image acquisition procedures. Image processing prior to image measurements was performed with Huygens Essential deconvolution software (Scientific Volume Imaging) using up to 40 iterations of the classical maximum likelihood estimation algorithm, with a theoretical PSF and automatic background correction. The images were then analyzed using the Sprout Analysis plug-in developed by Eglinger J *et al* [4] in the Fiji distribution of ImageJ, to evaluate the different vascular parameters, such as sprout length and branch points.

In vivo vasculogenesis experiments

Animals

The care and treatment of athymic male Rj:NMRI-nu nu/nu mice at 7 weeks of age (Janvier Labs, Le Genest, France) were approved by the local ethics committee (authorization APAFIS # 14656) and were conducted according to the recommendations of the Helsinki Declaration. All the mice were housed in a pathogen-free environment, and the animal experiments were approved by the Institution's Animal Care and Use Committee (Aix Marseille University). SVF

(10^6 cells/ml) from HDs (n=4) and SSc (n=4) was added to 500 μ l of growth factor-reduced Matrigel™. The plugs were subcutaneously injected in the lateral groin areas of the nu/nu mice according to Melero-Martin *et al* [5].

Abdominal ultrasound and echocardiography

Two weeks after the injections, the animals were anesthetized using isoflurane (1.5-2.0%). The mice were secured to a heated animal handling platform allowing ECG, respiration, and temperature monitoring of the animals. An ultrasound gel (Aquasonic 100; Parker Laboratories, Fairfield, NJ) was used to provide a coupling interface between the ultrasound probe and the animal. The ultrasonic measurements of the Matrigel plug volume and the percentage of vessels were completed using a VisualSonics Vevo 2100 ultrasound system (VisualSonics, Toronto, ON, Canada). All the examinations were performed by a single experienced operator. The Vevo 2100 High Resolution Ultrasound Imaging System (VisualSonics Inc, Toronto, Canada) was used to acquire all images. The MS-550D (22-55 MHz, axial resolution 40 μ m) probe was used to acquire all images.

3D volumetric data

3D volumetric data were obtained using Vevo Lab workstation 1.7.1 software (Visualsonic Inc, Toronto, Canada) according to the image acquisition protocol, with 3D image reconstruction. 2D images were acquired at regular times (respiratory-gated) and spatial intervals (0.076 mm). Thereafter, the 3D images were constructed and displayed through the parallel 2D image planes. To determine the volume of the Matrigel plug, an area was reconstructed every five images.

Color Doppler imaging modes

Doppler imaging is used during ultrasound examination to detect the presence of blood flow in vessels larger than 40 μ m. The percentage of vessels was calculated in 70-80% of the area behind the borders of the Matrigel plugs to avoid any vessels present near the site of implantation that might interfere with the results.

Immunofluorescence and histology

After the ultrasonic measurements, the mice received 100 μ l of 1 mg/ml Alexa Fluor® 488-dextran (Molecular Probes®, Life Technologies) in physiological NaCl solution intravenously 20 minutes before euthanization, to stain the perfused vessels. The Matrigel plugs were excised after 14 days, then frozen in liquid nitrogen and cryosectioned. For immunohistochemistry, 10 μ m-thick frozen sections were fixed in cold methanol for 5 minutes at RT, blocked with 3% BSA and 10% FCS in PBS, and incubated with DAPI to stain nuclei. Fluorescent images were obtained using a fluorescence microscope (Leica DMI8) and were converted to digital files with NIS. The co-localization of Alexa 488-dextran-positive vessels and DAPI staining allowed us to define perfused blood vessels. Blood vessel infiltration in Matrigel plugs was assessed by H&E staining of serial sections (10 μ m-thick) using microscopy, and the plugs were examined for

structures containing red blood cells.

Microvessel density analysis

Vessel-like structures (i.e., cavities surrounded by cells and cells arrayed in-line but without cavities) were detected by immunohistochemical staining and were counted at 50 μm from the edge of 5 nonoverlapping microscopic fields in 5 separate sections under a Leica inverted microscope. Counting was performed in a low-magnification field (10X) using Fiji software.

Transcriptomic analysis

Red blood cells were lysed in NH_4Cl for 10 minutes at 4°C , and 0.5 to 3×10^6 SVF cells were used to extract total RNA from SVF using RNeasy Mini kits (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), including a DNase I digestion step to remove genomic DNA. The Agilent RNA ScreenTape assay and the Agilent 2,200 TapeStation system (both Agilent, Stockport UK) were employed to determine the RNA integrity number equivalent. Total RNA from 4 HDs and 7 SCL was used to generate an oligo dT-enriched library with the Illumina TruSeq RNA Library Preparation kit v2.0 (Illumina, Cambridge UK). The quality and quantity of the DNA library were assessed using an Agilent 2,100 Bioanalyzer (Agilent, Stockport UK) and Qubit (Thermo Fisher Scientific, Renfrew UK), respectively. The library was run on the Illumina NextSeq 500 platform using the High Output (75 cycles) kit (2×36 cycles, paired-end reads, single index) (both from Illumina, Cambridge UK).

RNA sequence analysis

The quality control checks of the raw RNA-Seq data files were conducted with fastqc v0.10.1 and fastq_screen v0.4.2. The RNA-Seq reads were aligned to human genome build GRCh38 with TopHat2.0.1313, and genome annotation, using GRCh38.82.gtf. BAM files, was further processed with HTseq0.6.1p1. The differential analysis of the count data was performed with the DESeq2 package (DESeq2)¹⁴. Regularized log transformation was employed to transform the DESeq2 data for principal component analysis (PCA). The results are expressed as fragments per kilobase per million sequenced reads (FPKM) and \log_2 (fold-change) values between scleroderma and healthy conditions. The genes presenting a stringent difference corresponding to a \log_2 (FC) > 2 or < -2 were selected according to their relationship with SSc physiopathology.

Gene expression analysis by quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from the SVF of HD ($n=7$) and SSc ($n=7$) samples using RNeasy Mini kits (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), including a DNase I digestion to step remove genomic DNA. The total RNA ($5 \mu\text{g}$) was converted to cDNA using 200 U of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR amplification was performed with the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche), as recommended by the manufacturer, on a LightCycler 480 instrument (Roche). The cycling conditions were as follows: 10 minutes at 95°C (hot-start PCR) followed by 40 cycles of 10 s at 95°C (denaturation), 15 s at 62°C (annealing) and 20 s at 72°C (elongation). A melting curve analysis was performed to check the specificity of the

amplification. The primers used for gene-specific amplification are described in Supplemental Table 1. The reported values are expressed as the relative number of specific transcripts detected per 10^6 GAPDH transcripts.

Single-cell mRNA sequencing

SVF cells from HDs (n=2) and SSc (n=2) samples were chosen to gather one limited and one diffuse form of SSc and to display characteristics representative of the cohort. SVF samples were partitioned into nanoliter-scale Gel Bead-In-Emulsions (GEMs) with a Chromium Single Cell Controller (10x Genomics), where all the generated cDNAs shared a common 10x barcode. Libraries were generated and sequenced from the cDNA, and the 10x Barcodes were used to associate individual reads with individual partitions. An analysis using molecular indexing information provides an absolute digital measurement of gene expression levels. Sequencing was performed using a NextSeq Illumina device (2 multiplexed samples). The NextSeq data were demultiplexed using the 10x Genomics Cell Ranger 2.0.1 suite, specifically with the mkfastq function. This first level of analysis generated quality metrics (Q30, number of reads by sample) and FASTQ files. Then, Cell Ranger counting was performed on each library (sample) that was demultiplexed. This second level of analysis consisted of mapping with STAR against the human reference genome, detecting the number of cells and genes per cell and finally quantifying gene expression. The results from each sample were pooled with the aggregate function of Cell Ranger using the mapped normalization method, by subsampling reads from higher-depth libraries until they all presented an equal number of confidently mapped reads per cell. The normalization and analysis steps were conducted using R (<https://www.r-project.org>), specifically employing several functions of the SEURAT single-cell analysis package [6]. The cells exhibiting unique gene counts (nGene) over 2,500, or more than 0.5% of mitochondrial genes expressed (percent.mito), or a unique molecular index count (nUMI) over 18,000 were filtered out. The gene expression measurements for each cell were then log-normalized with a scale factor of 10,000. Highly variable genes were identified, which were the focus of the downstream analysis. To remove unwanted sources of variation, cell-cell variation in gene expression was regressed out, driven by the number of detected molecules and mitochondrial gene expression. Next, PCA was performed on the scaled data using the highly variable genes. The most significant principal components (PCs) were identified via a JackStraw procedure. The first 12 principal components were retained to reduce the dimensionality of the dataset. According to this dimensional reduction, clusters of cells were identified with a shared nearest neighbor (SNN) modularity optimization-based clustering algorithm. For nonlinear dimensional reduction to visualize and explore these datasets, a t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) algorithm was employed. Differentially expressed genes between clusters or subclusters were expressed as the log₂-fold-change using the nonparametric Wilcoxon rank sum test with Bonferroni correction for p-value adjustment. Assignment of genes to a dedicated cluster was considered only for populations expressing at least 5% of the gene of interest compared to other populations.

Secretome

A total of 1×10^6 SVF cells from the HD (n=10) and SSc (n=13) samples were plated in a 6-well plate with 2.5 ml of deprived media (DMEM/1% FBS) at 37°C under 5% CO₂. The supernatant was collected at 24 h and then centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes to remove any debris and remaining cells before freezing at -80°C. Quantitative measurement of the secreted proteins in the SVF was performed in duplicate employing commercially available multiplex assays using Luminex® technology (Milliplex assays from Millipore Corp., Burlington, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. The 96-well plates were run on a Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader using Bio-Plex Manager software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Concentrations were calculated based on 7-point standard curves using a five-parametric fit algorithm. Only data that fell within the documented assay range and passed the quality control measures provided by the manufacturer were considered. The analytes and Milliplex kits used in these assays were as follows: ADAMTS13, GDF-15, sICAM-1, P-selectin, sVCAM-1, and SAA from the Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 2 Milliplex MAP Kit (Cat. #HCVD2MAG-67K), Fibrinogen, PF4/CXCL4, and vWF from the Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 3 (Acute Phase) Milliplex MAP Kit (Cat. #HCVD3MAG-67K), MCP-1, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, VEGF, FGF-2, Fractalkine, GRO, and IL-6 from the human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Milliplex MAP Kit (Cat. #HCYTOMAG-60K), Apelin and LIF from the human Myokine Magnetic Bead Panel (Cat. #HMYOMAG-56K), Endoglin and Endothelin-1 from the Human Angiogenesis/Growth Factor Magnetic Bead Panel Milliplex MAP Kit (Cat. #HAGP1MAG-12K), and TGFB-1 from the Human Single Plex Magnetic Bead Kit (Cat. #TGFBMAG-64K-01).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA) and IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 (Armonk, NY: IBM Corp). Quantitative variables are reported as the mean \pm SEM or the median 25-75th percentile according to the normality of their distribution. Continuous variables were compared using Student's t-test or the nonparametric Mann-Whitney t-test. One-way analysis of variance (ANOVA) was employed to compare more than two groups. The associations between the continuous variables were analyzed through Spearman's rank correlation analysis. The categorical variables were reported as counts or percentages and were compared using the chi-square test (or Fisher's exact test). A *p* value < 0.05 was considered to represent a statistically significant difference. The associations between SSc and the clinical, demographic and analytical variables were assessed via univariate analysis.

Supplementary References

1. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013 Jun; 15(6):641-648.
2. (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ>, G. Carpentier, *Image J News*, 20 October 2012).
3. Korff T, Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J*. 2001;15(2):447-457.
4. Eglinger J., 2017 Quantitative assessment of angiogenesis and pericyte coverage in human cell-derived vascular sprouts. *Inflammation and regeneration*, 37(1),2
5. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*. 2007 Jun 1; 109(11):4761-4768.
6. Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol*. 2015 May; 33(5):495-502.

Supplemental Table 1. Primer sequences for real time PCR

GAPDH	Forward	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA
	Reverse	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT
ACE	Forward	CATGAAGGCCCTCTGCACAAATG
	Reverse	CAACATTTTCCAATGCTAGGGTCCAG
APLN	Forward	AATCTGCGGCTCTGCGTGC
	Reverse	GAATTTCTCCGACCTCCCTGC
IDO	Forward	CCATATTGATGAAGAAGTGGGCTTTGC
	Reverse	GCAAGGCGCTGTGACTTGTG
SAA1	Forward	CCTTGGTCCTGGGTGTCAGC
	Reverse	CAGGTCGGAAGTGATTGGGGT
HAS1	Forward	CCCATGGCACTGCTGGAG
	Reverse	ACCAGGCCTCAAGAACTGCTG
GDF15	Forward	GCCAACCAGAGCTGGGAAGATT
	Reverse	GGCCCGAGAGATACGCAGGT

Supplemental Table 2. Upregulated genes in SVF of SSc patients

Gene_name	Locus	Log2(fold_change)	p_value
RP1-34B20.4	6:26202155-26202654	NA	5.00E-05
IGHV2-26	14:106301395-106301862	4.3	5.00E-05
PTCHD4	6:47878027-48068689	3.6	0.0001
IDO1	8:39902274-40016391	3.2	5.00E-05
GDF15	19:18374730-18389176	3.2	5.00E-05
HOXD10	2:176104215-176119942	3.1	5.00E-05
HIST1H2AE	6:26216974-26217483	3.1	5.00E-05
SAA1	11:18266173-18269977	3.1	5.00E-05
CTC-575D19.1-001	5:168616351-168616996	3.0	5.00E-05
VAT1L	16:77788529-77980107	3.0	5.00E-05
APLN	X:129645258-129654937	2.9	5.00E-05
HIST1H2BD	6:26158145-26184655	2.8	0.0001
HIST1H2BG	6:26215158-26216692	2.8	5.00E-05
OIT3	10:72893580-72933033	2.6	0.0002
HES5	1:2528744-2530245	2.6	0.0002
MMRN1	4:89879531-89954629	2.6	5.00E-05
CBLN4	20:55997439-56005472	2.6	5.00E-05
LAMC3	9:131009081-131094473	2.5	5.00E-05
IGLV3-1	22:22880705-22881396	2.4	5.00E-05
HIST1H2AC	6:26124144-26139116	2.4	5.00E-05

MPZL2	11:118253402-118264536	2.3	5.00E-05
ACE2	X:15561032-15602148	2.2	5.00E-05
SLC14A1	18:45212994-45752520	2.1	5.00E-05
EPHX4	1:92029981-92063536	2.1	0.0002
PTGDS	9:136977504-136981742	2.0	5.00E-05
HIST2H2AA4	1:149851060-149851624	2.0	0.0001
HIST3H2BB	1:228458106-228460470	1.9	0.0001
ADCYAP1	18:894434-912172	1.9	5.00E-05
SOX18	20:64047581-64049641	1.8	5.00E-05
TACSTD2	1:58575422-58577773	1.8	5.00E-05
CHST1	11:45648876-45665622	1.8	5.00E-05
TNFSF18	1:172775904-173064015	1.8	5.00E-05
HIST1H2BC	6:26114872-26123926	1.8	5.00E-05
L1TD1	1:62194830-62212328	1.8	0.0001
PLA1A	3:119597841-119629811	1.8	5.00E-05
LRRC4B	19:50516891-50568045	1.7	5.00E-05
FOXS1	20:31844300-31845619	1.6	5.00E-05
CETP	16:56961849-56983845	1.5	5.00E-05
LINGO1	15:77613026-77820900	1.5	5.00E-05
SMAD6	15:66702227-66782848	1.5	5.00E-05
APLNR	11:57233576-57237314	1.4	5.00E-05
HIST2H2BE	1:149884458-149886652	1.4	5.00E-05
LINC00924	15:95433094-95507847	1.4	5.00E-05
ISG15	1:1001137-1014541	1.4	5.00E-05
MMP15	16:58025565-58046901	1.4	5.00E-05
PRND	20:4721909-4728460	1.4	5.00E-05
LEP	7:128241283-128257628	1.3	0.0002
SERPINI1	3:167735242-167825568	1.3	5.00E-05
CBX2	17:79778131-79787983	1.3	0.0001
FMO3	1:171090876-171117819	1.3	5.00E-05
CCL3L3	17:36183234-36196758	1.3	0.0002
PGF	14:74941833-74955784	1.3	5.00E-05
LINC01436	21:36005337-36007838	1.3	5.00E-05
VWA1	1:1434860-1442882	1.3	5.00E-05
HIST1H2BK	6:27146417-27146798	1.3	5.00E-05
CCND1	11:69641086-69675416	1.3	5.00E-05
HIST1H1C	6:26055786-26056428	1.3	5.00E-05
ELFN1	7:1688118-1747954	1.2	5.00E-05
MCAM	11:119206275-119321521	1.2	5.00E-05
SLCO2A1	3:133932695-134052184	1.2	5.00E-05

MALL	2:110083869-110116566	1.2	5.00E-05
N4BP3	5:178113442-178126087	1.2	5.00E-05
ABI3	17:49202790-49223225	1.2	5.00E-05
IGLC2	22:22900975-22901437	1.2	5.00E-05
TCF15	20:603796-610398	1.1	5.00E-05
IGF2	11:2129111-2161341	1.1	0.0002
ID1	20:31605282-31606515	1.1	0.0001
RAMP3	7:45157790-45186302	1.1	5.00E-05
CCDC184	12:48183583-48185926	1.1	5.00E-05
CDH6	5:31093976-31329146	1.1	5.00E-05
HEY1	8:79764009-79767863	1.1	5.00E-05
NR2F2	15:95990581-96340263	1.1	0.00015
TM4SF18	3:149229355-149334414	1.1	5.00E-05
MEOX1	17:43640387-43661954	1.1	5.00E-05
PALD1	10:70478820-70568449	1.1	5.00E-05
GRPEL2	5:149345429-149357642	1.1	5.00E-05
NRARP	9:137300481-137302251	1.1	5.00E-05
VEGFC	4:176669620-176792727	1.1	5.00E-05
GJA5	1:147756198-147773362	1.1	5.00E-05
MDK	11:46380755-46383837	1.0	5.00E-05
HYAL2	3:50317789-50328251	1.0	5.00E-05
LURAP1L	9:12685438-12822131	1.0	5.00E-05
IER5L	9:129175551-129210548	1.0	0.0001
HEYL	1:39624152-39639945	1.0	5.00E-05
C2CD4B	15:62163534-62165283	1.0	5.00E-05
TESC	12:117038922-117099479	1.0	0.0001
PCDH12	5:141943584-141990291	1.0	5.00E-05
RP11-389C8.2	5:72439902-72442387	1.0	5.00E-05
CCL19	9:34689566-34691277	1.0	0.00015
AGRN	1:1020122-1056118	1.0	5.00E-05
CLEC14A	14:38254102-38256369	0.9	5.00E-05
NES	1:156668762-156677397	0.9	5.00E-05
RAI14	5:34656236-34832627	0.9	0.0001
ALPL	1:21509371-21578412	0.9	5.00E-05
SLC16A14	2:230034973-230068999	0.9	5.00E-05
RP11-588K22.2	4:155734447-155737062	0.9	5.00E-05
CLIC5	6:45898450-46080395	0.9	5.00E-05
DUSP7	3:52048918-52056550	0.9	5.00E-05
NRP2	2:205681989-205798133	0.9	0.0002
THEM6	8:142727202-142736927	0.9	5.00E-05

IER2	19:13150414-13154908	0.9	0.00015
CCDC85B	11:65890111-65891635	0.9	5.00E-05
IGFBP2	2:216632827-216664436	0.8	5.00E-05
MARCKSL1	1:32333831-32336379	0.8	5.00E-05
NLK	17:28041736-28196381	0.8	5.00E-05
ZMAT3	3:179017222-179072279	0.8	5.00E-05
RASIP1	19:48720586-48740721	0.8	5.00E-05
GIPC3	19:3585552-3593541	0.8	0.00015
SPRY4	5:142310426-142698070	0.8	0.0001
ENG	9:127815011-127854756	0.8	0.0001
HLX	1:220832762-220885059	0.8	0.0001
CXorf36	X:45148373-45333917	0.8	5.00E-05
FAM198B	4:158124473-158255411	0.8	0.00015
CASQ2	1:115700006-115768781	0.7	0.0002
DLL4	15:40929339-40939072	0.7	5.00E-05
HES1	3:194136144-194138732	0.7	5.00E-05
PXDN	2:1631886-1744852	0.7	0.0001
RBP7	1:9997205-10016020	0.7	0.0002
MEOX2	7:15611211-15686812	0.7	5.00E-05
RNF152	18:61808062-61894247	0.7	0.00015
BCL6B	17:7023019-7030290	0.7	0.0001
PDGFB	22:39223358-39244751	0.7	5.00E-05
OTUD1	10:23439457-23442390	0.7	0.00015

Supplemental Table 3. Downregulated genes in SVF of SSc patients

Gene_name	Locus	Log2(fold_change)	p_value
DKK1	10:52314295-52318042	-2.9	5.00E-05
HAS1	19:51713111-51723994	-2.8	5.00E-05
PRTFDC1	10:24848606-24952604	-2.7	5.00E-05
MT1A	16:56638665-56640087	-2.6	5.00E-05
SERPINA3	14:94612296-94624646	-2.5	5.00E-05
MYF6	12:80707497-80709474	-2.4	5.00E-05
COLGALT2	1:183929853-184037729	-2.2	5.00E-05
NFATC2	20:51386956-51562831	-2.2	5.00E-05
LRRC15	3:194355246-194369743	-2.1	5.00E-05
RAB27B	18:54717859-54898083	-2.1	5.00E-05
MACC1	7:19918980-20217404	-2.0	5.00E-05

MT1X	16:56682423-56688052	-2.0	5.00E-05
RP4-737E23.5	20:23148085-23149939	-1.9	5.00E-05
HAS2	8:121612115-121644693	-1.9	5.00E-05
TRIM63	1:26051303-26068436	-1.9	0.00015
PADI4	1:17308194-17364004	-1.9	5.00E-05
-	17:18511220-18625617	-1.9	0.00015
TNFAIP6	2:151357591-151380048	-1.9	5.00E-05
CXCL5	4:73995641-73998779	-1.9	0.0002
PLA2G2A	1:19975430-19980416	-1.8	5.00E-05
GSDMA	17:39953262-39977766	-1.8	5.00E-05
FOSL1	11:65892048-65900573	-1.8	5.00E-05
LUCAT1	5:91303028-91314402	-1.8	5.00E-05
HMOX1	22:35380360-35394214	-1.7	5.00E-05
SLC39A14	8:22367248-22434129	-1.7	5.00E-05
CYP4F3	19:15615217-15662825	-1.7	5.00E-05
MRGPRX2	11:19054454-19060681	-1.7	0.00015
ARC	8:142611043-142614472	-1.7	5.00E-05
MT1M	16:56632232-56633986	-1.7	5.00E-05
TFCP2L1	2:121216586-121285207	-1.7	5.00E-05
LIF	22:30239193-30246998	-1.7	5.00E-05
TREM1	6:41267925-41286719	-1.6	5.00E-05
SLC10A6	4:86823467-86849263	-1.6	5.00E-05
GPRC5A	12:12890781-12917937	-1.6	5.00E-05
IL1R2	2:101991843-102028544	-1.6	5.00E-05
GCSAML	1:247507057-247747062	-1.6	5.00E-05
H3F3C	12:31791184-31792241	-1.6	0.00015
C5AR2	19:47332146-47347327	-1.6	5.00E-05
MS4A2	11:60088260-60098466	-1.6	5.00E-05
GSTM5	1:109712254-109775428	-1.6	5.00E-05
CCL22	16:57358771-57366190	-1.6	5.00E-05
AREG	4:74445133-74455009	-1.6	5.00E-05
TPSB2	16:1228335-1230184	-1.6	5.00E-05
UGDH	4:39498754-39639090	-1.5	5.00E-05
AC114730.2	2:241844379-241845036	-1.5	0.0002
CLDN4	7:73799541-73832693	-1.5	5.00E-05
SLC19A2	1:169463908-169486003	-1.5	5.00E-05
F2RL3	19:16888859-16892606	-1.5	5.00E-05
SFRP4	7:37683795-38025695	-1.5	5.00E-05
ARSI	5:150296342-150339307	-1.5	5.00E-05
SPSB1	1:9292879-9369532	-1.5	5.00E-05

KCNA1	12:4909904-4931361	-1.5	5.00E-05
S100A12	1:153373705-153375649	-1.5	5.00E-05
HMCN2	9:130265881-130434123	-1.5	5.00E-05
GRHL1	2:9951692-10002277	-1.5	5.00E-05
ERRFI1	1:8004403-8026308	-1.5	5.00E-05
PTX3	3:157175222-157533619	-1.5	5.00E-05
CILP	15:65194757-65211488	-1.5	5.00E-05
CCL18	17:36064279-36072032	-1.4	5.00E-05
ABCB11	2:168922937-169031322	-1.4	0.00015
PANX1	11:94128927-94181972	-1.4	5.00E-05
PDK4	7:95583498-95596491	-1.4	5.00E-05
TIPARP	3:156671861-156706770	-1.4	0.00015
AFF3	2:99545418-100142739	-1.4	0.0002
LONRF3	X:118974613-119018355	-1.4	5.00E-05
MLF1	3:158571162-158607252	-1.4	5.00E-05
SCNN1B	16:23278230-23381299	-1.3	5.00E-05
FAM43B	1:20552438-20555010	-1.3	0.0002
TSC22D3	X:107713220-107777342	-1.3	5.00E-05
MEDAG	13:30881932-30977623	-1.3	5.00E-05
-	13:91347819-91354579	-1.3	5.00E-05
HMGA1	6:34236872-34246231	-1.3	5.00E-05
STC1	8:23841914-23854807	-1.3	5.00E-05
FKBP5	6:35573584-35728583	-1.3	5.00E-05
CPA3	3:148791101-148960112	-1.3	5.00E-05
GALNT13	2:153871912-154457438	-1.3	5.00E-05
CDCP1	3:45082277-45146422	-1.3	5.00E-05
IGF1	12:102120184-102480645	-1.2	5.00E-05
SLA	8:132866957-133134903	-1.2	5.00E-05
CMA1	14:24501593-24508688	-1.2	5.00E-05
CYP1B1	2:37923186-38239590	-1.2	5.00E-05
LRRC2	3:46515422-46582463	-1.2	5.00E-05
FABP3	1:31365624-31376850	-1.2	5.00E-05
FAM180B	11:47586692-47589194	-1.2	5.00E-05
NAMPTP1-001	10:36521720-36524234	-1.2	5.00E-05
FAP	2:162159761-162245151	-1.2	5.00E-05
HPGD	4:174490176-174523154	-1.2	5.00E-05
ZNF460	19:57267219-57294469	-1.2	0.00015
RGS1	1:192575726-192580031	-1.2	5.00E-05
MARCO	2:118942165-118994660	-1.2	5.00E-05
CXCL3	4:74036588-74038807	-1.2	5.00E-05

NPTX2	7:98617296-98629868	-1.2	0.0001
NPTXR	22:38818451-38843982	-1.1	0.00015
WNT9A	1:227918655-227947898	-1.1	5.00E-05
NRIP3	11:8980575-9004049	-1.1	0.00015
CTSG	14:24573521-24576260	-1.1	5.00E-05
ADRA2B	2:96112874-96116245	-1.1	5.00E-05
F3	1:94529224-94541800	-1.1	5.00E-05
REL	2:60881520-60931610	-1.1	5.00E-05
FAM107A	3:58564116-58666848	-1.1	5.00E-05
FGF14	13:101452592-102402457	-1.1	5.00E-05
NAMPT	7:106248284-106286326	-1.1	5.00E-05
SRXN1	20:646614-676179	-1.1	5.00E-05
B4GALT1	9:33104081-33179983	-1.1	5.00E-05
PLP1	X:103773717-103792619	-1.1	5.00E-05
SLAMF1	1:160608099-160647295	-1.1	5.00E-05
PER2	2:238231683-238300620	-1.0	5.00E-05
GCLM	1:93885204-93909456	-1.0	5.00E-05
PLAU	10:73909176-73922777	-1.0	5.00E-05
TLR2	4:153701499-153705699	-1.0	5.00E-05
ANKRD20A17P-001	4:49502144-49506022	-1.0	0.00015
CHI3L1	1:203178930-203186749	-1.0	5.00E-05
CXCL8	4:73740505-73743716	-1.0	5.00E-05
PTGER2	14:52314304-52328606	-1.0	5.00E-05
SDS	12:113392444-113438276	-1.0	5.00E-05
SORL1	11:121447330-121633693	-1.0	5.00E-05
VNN1	6:132681589-132714049	-1.0	0.0002
PLAUR	19:43646094-43670547	-1.0	5.00E-05
GALNT15	3:16174648-16231992	-1.0	0.00015
S100A8	1:153390031-153391188	-1.0	5.00E-05
BACH1	21:29193479-29940033	-1.0	5.00E-05
IL7R	5:35852694-35879603	-1.0	5.00E-05
CTSL	9:87725518-87731393	-1.0	5.00E-05
GTF2B	1:88852931-88891944	-0.9	5.00E-05
ALOX5AP	13:30713477-30764426	-0.9	5.00E-05
GJA1	6:121435691-121449727	-0.9	5.00E-05
MT1E	16:56625474-56627112	-0.9	0.0002
KDM6B	17:7839903-7854796	-0.9	5.00E-05
THEMIS2	1:27872542-27886685	-0.9	5.00E-05
PLIN2	9:19108374-19149290	-0.9	5.00E-05

GFPT2	5:180300689-180353387	-0.9	5.00E-05
CXCL2	4:74097034-74099293	-0.9	5.00E-05
LYZ	12:69348340-69354234	-0.9	0.00015
C14orf132	14:96039323-96093889	-0.9	5.00E-05
XPNPEP2	X:129738973-129769538	-0.9	5.00E-05
DPP4	2:161992240-162075169	-0.9	5.00E-05
GAS7	17:9910608-10198551	-0.9	5.00E-05
DDX21	10:68956127-68985073	-0.9	5.00E-05
FEM1C	5:115520907-115544894	-0.9	5.00E-05
FGL2	7:76959834-77416400	-0.9	5.00E-05
ITPKC	19:40691528-40750553	-0.9	5.00E-05
HMCN1	1:185734550-186190949	-0.9	5.00E-05
SLCO2B1	11:75099171-75206549	-0.9	0.0001
THBD	20:23045632-23049741	-0.9	5.00E-05
ZDHC9	X:129803287-129843909	-0.9	0.00015
MFAP5	12:8634366-8662888	-0.9	0.00015
THBS1	15:39581078-39599466	-0.9	5.00E-05
RLIM	X:74585216-74614617	-0.9	5.00E-05
STX11	6:144150525-144188370	-0.9	5.00E-05
FNDC4	2:27491882-27495245	-0.8	0.0001
TMEM132C	12:128267402-128707915	-0.8	5.00E-05
SSC5D	19:55488403-55519098	-0.8	5.00E-05
CHL1	3:195757-409417	-0.8	5.00E-05
C7	5:40909251-40982939	-0.8	5.00E-05
GPC6	13:93226611-94407401	-0.8	5.00E-05
COQ10B	2:197453422-197475308	-0.8	5.00E-05
MT2A	16:56608198-56609497	-0.8	0.00015
MTURN	7:30134809-30162762	-0.8	0.00015
PRKAR2B	7:107044648-107161811	-0.8	5.00E-05
TP53BP2	1:223779898-223845972	-0.8	0.0001
C5AR1	19:47290022-47322066	-0.8	5.00E-05
SAMSN1	21:14485227-14658821	-0.8	0.0002
PPP1R15B	1:204377849-204494724	-0.8	5.00E-05
MAMDC2	9:70033920-70258866	-0.8	5.00E-05
IPMK	10:58191516-58267934	-0.8	5.00E-05
APOL6	22:35648394-35668409	-0.8	5.00E-05
MB21D2	3:192796814-192918161	-0.8	0.00015
LTBP2	14:74498169-74612378	-0.8	0.0001
TNFRSF10D	8:23135587-23164030	-0.8	5.00E-05
SESN2	1:28259526-28282491	-0.8	5.00E-05

KREMEN1	22:29073077-29168333	-0.8	5.00E-05
CRISPLD2	16:84819983-84909510	-0.8	5.00E-05
XG	X:2752049-2815927	-0.8	0.0001
IL6R	1:154402327-154469450	-0.8	5.00E-05
B3GNT5	3:183178042-183428778	-0.8	5.00E-05
PTGS2	1:186671790-186680427	-0.8	5.00E-05
SYNE3	14:95407265-95475836	-0.8	0.0001
XYLT1	16:17101768-17470881	-0.8	0.0001
FST	5:53480408-53487134	-0.7	0.0001
PRELP	1:203475827-203491352	-0.7	5.00E-05
PIM1	6:37170202-37175426	-0.7	0.00015
PPTC7	12:110533244-110583320	-0.7	5.00E-05
AKIRIN1	1:38991222-39006059	-0.7	5.00E-05
LAPTM5	1:30732468-30757820	-0.7	0.0001
MAFB	20:40685847-40689240	-0.7	5.00E-05
SERTAD2	2:64631620-64751005	-0.7	0.0001
TSKU	11:76782250-76798154	-0.7	5.00E-05
MFHAS1	8:8783353-8893645	-0.7	5.00E-05
ZNF267	16:31873757-31917357	-0.7	5.00E-05
SEMA3C	7:80742537-80922359	-0.7	5.00E-05
YWHAG	7:76326793-76359031	-0.7	0.0002
UST	6:148747327-149076990	-0.7	0.0001
C1orf21	1:184387057-184629020	-0.7	0.00015
TXN	9:110243810-110256640	-0.7	5.00E-05
B4GALT5	20:49632944-49713878	-0.7	0.0001
CEBPB	20:50184597-50192689	-0.7	5.00E-05
PELI1	2:64092651-64252859	-0.7	0.0001
AOX1	2:200585867-200677064	-0.6	0.00015

Supplemental Table 4. Gene Ontology analysis for classification of the genes upregulated in SSc based on the biological process

Term	PValue	Genes	Fold Enrichment
GO:0003208~cardiac ventricle morphogenesis	1.83E-05	HEY1, DLL4, HEYL, ENG	71.8
GO:0035912~dorsal aorta morphogenesis	0.001018492	HEY1, DLL4, ENG	60.5
GO:0003184~pulmonary valve morphogenesis	0.001623798	HEY1, SMAD6, HEYL	48.4

GO:0050678~regulation of epithelial cell proliferation	0.002362582	HES1, HES5, TACSTD2	40.4
GO:0003198~epithelial to mesenchymal transition involved in endocardial cushion formation	0.002780997	HEY1, HEYL, ENG	37.3
GO:0002227~innate immune response in mucosa	1.53E-05	HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BK, HIST2H2BE, HIST1H2BG	32.3
GO:0003203~endocardial cushion morphogenesis	0.004227472	HEY1, HEYL, ENG	30.3
GO:0050767~regulation of neurogenesis	0.005952459	HES5, DLL4, BCL6B	25.5
GO:0048844~artery morphogenesis	0.007251997	HES1, ENG, GJA5	23.1
GO:0060412~ventricular septum morphogenesis	7.29E-04	HES1, HEY1, HEYL, GJA5	22.3
GO:0046427~positive regulation of JAK-STAT cascade	0.007945487	LEP, HES1, HES5	22.0
GO:0019731~antibacterial humoral response	1.50E-04	HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BK, HIST2H2BE, HIST1H2BG	18.3
GO:0048469~cell maturation	0.001381414	HES1, HES5, CCL19, SOX18	17.9
GO:0001569~patterning of blood vessels	0.012695183	NRARP, DLL4, ENG	17.3
GO:0003281~ventricular septum development	0.012695183	HES1, SMAD6, GJA5	17.3
GO:0048247~lymphocyte chemotaxis	0.012695183	SAA1, CCL3L3, CCL19	17.3
GO:0051781~positive regulation of cell division	1.94E-04	VEGFC, PDGFB, PGF, IGF2, MDK	17.2
GO:0045909~positive regulation of vasodilation	0.013581545	GJA5, APLN, ADCYAP1	16.7
GO:0045746~negative regulation of Notch signaling pathway	0.013581545	HEY1, NRARP, DLL4	16.7
GO:0045776~negative regulation of blood pressure	0.014494031	VEGFC, GJA5, APLN	16.1

GO:2000379~positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	0.014494031	LEP, PDGFB, ACE2	16.1
GO:0030513~positive regulation of BMP signaling pathway	0.015432295	HES1, HES5, ENG	15.6
GO:0046677~response to antibiotic	0.016395992	ALPL, HYAL2, ID1	15.1
GO:0045747~positive regulation of Notch signaling pathway	0.017384781	HES1, HES5, DLL4	14.7
GO:0003151~outflow tract morphogenesis	0.002809583	HES1, HEYL, SOX18, GJA5	14.0
GO:0050918~positive chemotaxis	0.019436288	VEGFC, PDGFB, SAA1	13.8
GO:0043407~negative regulation of MAP kinase activity	0.02049834	HYAL2, SPRY4, DUSP7	13.5
GO:0042517~positive regulation of tyrosine phosphorylation of Stat3 protein	0.022693396	LEP, HES1, HES5	12.7
GO:0007519~skeletal muscle tissue development	0.003770047	MEOX2, HLX, NR2F2, HOXD10	12.7
GO:0001938~positive regulation of endothelial cell proliferation	8.50E-04	NRP2, VEGFC, PDGFB, NRARP, PGF	11.7
GO:0002548~monocyte chemotaxis	0.027358318	PDGFB, CCL3L3, CCL19	11.5
GO:0007219~Notch signaling pathway	6.77E-06	HES1, HEY1, HES5, NRARP, DLL4, HEYL, MDK, CDH6	11.2
GO:0007565~female pregnancy	2.17E-04	LEP, PGF, CLIC5, IDO1, IGFBP2, ADCYAP1	10.9
GO:0006342~chromatin silencing	0.031087569	HIST1H2AC, HIST2H2AA4, HIST1H2AE	10.8
GO:0007179~transforming growth factor beta receptor signaling pathway	2.54E-04	PDGFB, ID1, SMAD6, NLK, GDF15, ENG	10.5
GO:0051384~response to glucocorticoid	0.007433803	ALPL, PTGDS, IGFBP2, MDK	9.9

GO:0050830~defense response to Gram-positive bacterium	0.001847413	HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BK, HIST2H2BE, HIST1H2BG	9.5
GO:0006334~nucleosome assembly	9.12E-05	HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BK, HIST1H1C, HIST2H2BE, HIST1H2BG, HIST3H2BB	9.5
GO:0032355~response to estradiol	0.002371218	LEP, CCND1, MMP15, IGF2, NR2F2	8.9
GO:0001525~angiogenesis	1.21E-07	NRP2, LEP, VEGFC, HEY1, MEOX2, ID1, PGF, DLL4, RASIP1, SOX18, MCAM, GJA5	8.7
GO:0001570~vasculogenesis	0.046313743	RASIP1, SOX18, ENG	8.6
GO:0002576~platelet degranulation	0.025482143	VEGFC, PDGFB, IGF2, MMRN1	6.3
GO:0030198~extracellular matrix organization	0.03257068	PXDN, PDGFB, LAMC3, AGRN, VWA1	4.1
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	5.79E-04	LEP, HES1, VEGFC, PDGFB, HES5, PGF, MARCKSL1, HLX, IGF2, APLN, ADCYAP1	3.8
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1.25E-04	HIST1H1C, CBX2, LEP, HES1, CCND1, HEY1, HES5, NRARP, ID1, DLL4, HEYL, BCL6B, SOX18, NR2F2, ENG	3.4
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-templated	0.003566252	RAMP3, HES1, HEY1, PDGFB, ID1, CCDC85B, HEYL, SOX18, NR2F2, FOXS1	3.2
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	0.035073152	VEGFC, HIST1H2AC, TESC, SMAD6, DLL4, HIST1H2AE, CCL3L3	2.9
GO:0007155~cell adhesion	0.022853263	NRP2, HES1, HES5, LAMC3, MMRN1, MCAM, ENG, CDH6	2.8

Supplemental Table 5. Gene Ontology analysis for classification of the genes downregulated in SSc based on the biological process

Term	PValue	Genes	Fold Enrichment
GO:0002544~chronic inflammatory response	9.23E-05	S100A8, GJA1, VNN1, THBS1	41.9

GO:0002237~response to molecule of bacterial origin	0.003788478	CXCL2, TLR2, CXCL8	31.4
GO:0010038~response to metal ion	0.004702884	MT1A, MT2A, MT1X	28.3
GO:0002003~angiotensin maturation	0.005708295	CPA3, CMA1, CTSG	25.7
GO:0045926~negative regulation of growth	4.09E-05	MT1M, MT1A, MT2A, MT1E, MT1X	24.8
GO:0071294~cellular response to zinc ion	4.09E-05	MT1M, MT1A, MT2A, MT1E, MT1X	24.8
GO:0030728~ovulation	0.006802715	TNFAIP6, PTGS2, HPGD	23.6
GO:0071276~cellular response to cadmium ion	7.02E-04	MT1A, HMOX1, MT1E, MT1X	22.2
GO:0019372~lipoxygenase pathway	0.007984176	PTGS2, ALOX5AP, HPGD	21.8
GO:0002526~acute inflammatory response	0.007984176	B4GALT1, S100A8, VNN1	21.8
GO:0006691~leukotriene metabolic process	0.010600511	ALOX5AP, TLR2, CYP4F3	18.9
GO:0090023~positive regulation of neutrophil chemotaxis	0.001530047	C5AR1, CXCL3, CXCL2, CXCL8	17.2
GO:0070542~response to fatty acid	0.013542183	PTGS2, FABP3, TLR2	16.6
GO:0036120~cellular response to platelet-derived growth factor stimulus	0.015130429	HAS1, HAS2, ERFF1	15.7
GO:0046697~decidua lization	0.018532807	LIF, PTGS2, STC1	14.2
GO:0032570~response to progesterone	7.36E-04	PTGER2, CLDN4, TLR2, THBS1, FOSL1	12.1
GO:0030593~neutrophil chemotaxis	5.92E-06	CCL22, C5AR1, S100A8, CXCL3, CXCL8, TREM1, CCL18, S100A12	11.4
GO:0034612~response to tumor necrosis factor	0.028276378	PTGS2, CHI3L1, AFF3	11.3

GO:0032148~activation of protein kinase B activity	0.030424027	TXN, IGF1, ADRA2B	10.9
GO:0050832~defense response to fungus	0.032634268	S100A8, CTSG, S100A12	10.5
GO:0015721~bile acid and bile salt transport	0.032634268	ABCB11, SLC10A6, SLCO2B1	10.5
GO:0010575~positive regulation of vascular endothelial growth factor production	0.032634268	CYP1B1, C5AR1, PTGS2	10.5
GO:0043388~positive regulation of DNA binding	0.03490556	TXN, IGF1, PLAUR	10.1
GO:0018146~keratan sulfate biosynthetic process	0.03490556	B4GALT1, PRELP, B4GALT5	10.1
GO:0043542~endothelial cell migration	0.037236386	CYP1B1, FAP, DPP4	9.8
GO:0048661~positive regulation of smooth muscle cell proliferation	4.20E-04	NAMPT, PTGS2, HMOX1, IGF1, IL6R, THBS1	9.4
GO:0030449~regulation of complement activation	0.039625253	C7, C5AR2, C5AR1	9.4
GO:0060325~face morphogenesis	0.039625253	DKK1, CRISPLD2, TIPARP	9.4
GO:0002548~monocyte chemotaxis	0.009779045	CCL22, IL6R, CCL18, S100A12	9.0
GO:0006024~glycosaminoglycan biosynthetic process	0.009779045	HAS1, XYLT1, GPC6, UGDH	9.0
GO:0071347~cellular response to interleukin-1	9.13E-04	CCL22, CEBPB, CHI3L1, CXCL8, HAS2, CCL18	8.0
GO:0070098~chemokine-mediated signaling pathway	9.13E-04	CCL22, CXCL5, CXCL3, CXCL2, CXCL8, CCL18	8.0

GO:0006935~chemotaxis	5.76E-06	C5AR2, CCL22, C5AR1, CXCL5, CXCL2, CXCL8, FOSL1, CCL18, PLAUR	7.7
GO:0007565~female pregnancy	3.55E-04	NAMPT, THBD, CLDN4, TFCP2L1, ADRA2B, FOSL1, HPGD	7.4
GO:0042542~response to hydrogen peroxide	0.016561235	HMOX1, AREG, PPP1R15B, FOSL1	7.4
GO:0032496~response to lipopolysaccharide	1.33E-06	PTGER2, PELI1, THBD, C5AR1, S100A8, CXCL5, PTGS2, TNFRSF10D, CXCL3, CXCL2, TLR2, CTSG	6.9
GO:0006954~inflammatory response	3.00E-14	S100A8, CXCL5, PTGS2, CXCL3, CXCL2, TLR2, CXCL8, CCL22, REL, SERPINA3, MS4A2, VNN1, THBS1, PTX3, PLP1, PTGER2, C5AR2, CEBPB, C5AR1, CHI3L1, LYZ, CCL18, S100A12, TNFAIP6, TNFRSF10D, AOX1, THEMIS2	6.7
GO:0050830~defense response to Gram-positive bacterium	0.002043113	C5AR1, PLA2G2A, LYZ, TLR2, IL6R, SSC5D	6.7
GO:0007612~learning	0.022231261	PRKAR2B, ARC, PTGS2, FOSL1	6.6
GO:0006928~movement of cell or subcellular component	0.002151028	PTGS2, TXN, CXCL8, IGF1, VNN1, PLAUR	6.6
GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	2.16E-04	CYP1B1, C5AR1, F3, HMOX1, CHI3L1, CXCL8, CMA1, THBS1	6.6
GO:0050729~positive regulation of inflammatory response	0.007382477	S100A8, PLA2G2A, TLR2, CCL18, S100A12	6.5
GO:0043433~negative regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	0.025414705	HMOX1, SFRP4, PIM1, RLIM	6.3

GO:0045669~positive regulation of osteoblast differentiation	0.025414705	CEBPB, IGF1, GJA1, IL6R	6.3
GO:0016266~O-glycan processing	0.025414705	B3GNT5, GALNT15, GALNT13, B4GALT5	6.3
GO:0098869~cellular oxidant detoxification	0.037694601	PTGS2, TXN, SESN2, SRXN1	5.4
GO:0071356~cellular response to tumor necrosis factor	0.006179111	CCL22, CHI3L1, CXCL8, HAS2, THBS1, CCL18	5.1
GO:0006955~immune response	1.05E-07	IL1R2, C7, C5AR1, CEBPB, CXCL5, CXCL3, CXCL2, TLR2, CXCL8, IL7R, CCL18, LIF, CCL22, RGS1, TNFRSF10D, MS4A2, SEMA3C, CMA1, THBS1, CTSG	4.5
GO:0007267~cell-cell signaling	8.15E-05	NAMPT, TNFAIP6, CCL22, PANX1, CXCL5, FGF14, TXN, GJA1, ADRA2B, AREG, WNT9A, CCL18	4.5
GO:0006979~response to oxidative stress	0.029081231	PTGS2, HMOX1, VNN1, GCLM, SRXN1	4.3
GO:0030335~positive regulation of cell migration	0.00340147	TNFAIP6, F3, IGF1, SEMA3C, HAS2, THBS1, LRRC15, PLAU	4.1
GO:0070374~positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	0.010672819	C5AR2, CCL22, C5AR1, PLA2G2A, CHI3L1, SLAMF1, CCL18	3.8
GO:0007596~blood coagulation	0.045476078	PRKAR2B, F2RL3, THBD, F3, PLAU, PLAUR	3.1
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	0.009394731	LIF, B4GALT1, CYP1B1, PTGS2, SFRP4, FABP3, TLR2, CXCL8, WNT9A, HMGA1, FOSL1	2.6
GO:0042493~response to drug	0.042353996	PLIN2, PTGS2, FABP3, SEMA3C, THBS1, NFATC2, GCLM, FOSL1	2.5
GO:0045087~innate immune response	0.01596424	MARCO, S100A8, REL, TLR2, VNN1, PADI4, TREM1, PTX3, SSC5D, SLAMF1, S100A12	2.4

GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	0.026132451	LIF, NAMPT, CXCL5, IGF1, HAS2, IL6R, AREG, THBS1, SLAMF1, FOSL1, DPP4	2.2
GO:0007165~signal transduction	2.11E-04	NAMPT, F2RL3, CXCL5, CLDN4, FGF14, SORL1, FST, TLR2, CXCL8, GJA1, IL7R, GPRC5A, CCL22, C5AR1, TP53BP2, IGF1, TRIM63, SLAMF1, CCL18, PLAUR, TNFAIP6, THBD, RGS1, TNFRSF10D, TXN, PLAU, CHL1	2.2
GO:0006508~proteolysis	0.039389906	CTSL, NRIP3, FAP, CPA3, LONRF3, FGL2, TPSB2, DPP4, PLAU, CTSG, XPNPEP2	2.1
GO:0006366~transcription from RNA polymerase II promoter	0.045507648	MYF6, BACH1, CEBPB, REL, MAFB, DDX21, NFATC2, GRHL1, HMGA1, FOSL1, GTF2B	2.0

Supplemental Table 6. Pathways enriched in modulated genes in SSc samples (upregulated genes in red, downregulated genes in green)

KEGG Pathways	Genes
Cytokine-cytokine receptor interaction (hsa04060)	CXCL2 , CXCL3, IL6R, IL7R, CXCL8, LEP, LIF, PDGFB, CCL3L3, CCL18, CCL19, CCL22, , VEGFC, IL1R2, TNFRSF10D, TNFSF18
Pathways in cancer (hsa05200)	LAMC3, FGF14, IGF1, CXCL8, PDGFB, PGF, PTGER2, PTGS2, CCND1, VEGFC, WNT9A, F2RL3
PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151)	LAMC3, FGF14 IGF1 IL6R IL7R PDGFB PGF CCND1 THBS1 TLR2 VEGFC YWHAG
Proteoglycans in cancer (hsa05205)	CTSL HOXD10 IGF1 IGF2 PLAU PLAUR CCND1 THBS1 TLR2 WNT9A
Rap1 signaling pathway (hsa04015)	FGF14 ID1 IGF1 PDGFB PGF THBS1 VEGFC F2RL3
Ras signaling pathway hsa04014	FGF14 IGF1 PLA1A PDGFB PGF PLA2G2A REL VEGFC
Wnt signaling pathway hsa04310	DKK1 NFATC2 NLK CCND1 SFRP4 WNT9A FOSL1
Jak-STAT signaling pathway hsa04630	AOX1 IL6R IL7R LEP; LIF PIM1 CCND1

Complement and coagulation cascades hsa04610	F3 PLAU PLAUR THBD C5AR1 C7 F2RL3
hsa04668 TNF signaling pathway	CEBPB CXCL2 CXCL3 LIF PTGS2 CXCL5 VEGFC
Hippo signaling pathway hsa04390	ID1 AREG CCND1 TP53BP2 WNT9A YWHAG
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications hsa04933	F3 CXCL8 PIM1 CCND1 THBD VEGFC
MAPK signaling pathway hsa04010	DUSP7 FGF14 PDGFB NLK IL1R2
p53 signaling pathway hsa04115	IGF1 CCND1 ZMAT3 THBS1 SESN2
NF-kappa B signaling pathway hsa04064	CXCL2 CXCL8 PLAU PTGS2 CCL19
FoxO signaling pathway hsa04068	IGF1 IL7R NLK CCND1
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells hsa04550	ID1 IGF1 LIF WNT9A
Renin-angiotensin system hsa04614	CMA1 CPA3 CTSG ACE2
TGF-beta signaling pathway hsa04350	FST ID1 SMAD6 THBS1 PDGFB LTBP2 NLK GDF15 ENG HPGD
hsa04330 Notch signaling pathway	HES1 HES5 DLL4 HES5 NRARP HEYL MDK CDH6

Supplemental Table 7. Genes localization among SVF cells based on RNASeq Single Cells analysis and differential expression between SSc and HD samples.

Gene	Localization	Expression in SSc samples compared to HD
ACE2	Pericytes (79,6%) Endothelial Cluster 1 (12,4%) Stromal cells (6,1%)	- - -
Apelin	Endothelial cluster 1 (71,7%) Stromal cells (11,1%) Endothelial Cluster 2 (9,0%) Pericytes (6,6%)	Up (p=10 ⁻⁵) - - -
IDO1	Endothelial Cluster 1 (79,9%) Stromal cells (7,7%) Monocytes (5,9%)	- - -
SAA1	Stromal cells (36,4%) Pericytes (30,4%) Endothelial Cluster 1 (26,0%)	Up (p=10 ⁻¹⁸) Up (p=0.0045) -
GDF15	Endothelial Cluster 1 (58,0%) Stromal cells (31,9%) Pericytes (5,2%)	Up (p=10 ⁻⁸) - -
HAS1	Stromal cells (91,1%)	Down (p=10 ⁻⁸¹)

Supplemental Table 8. Comparative results of secretome analysis between SVF from SSc patients and HD

	SSc (n=13)	CTL (n=10)	p value
FGF2 (pg/ml)	136 (108-268)	168 (117-333)	0.420
Fractalkine (pg/ml)	148 (103-226)	110 (97-157)	0.204
GRO (pg/ml)	4545(3240-9830)	1707(380-11760)	0.476
PDGFAA (pg/ml)	5 (4-7)	7 (4-10)	0.352
PDGFBB (pg/ml)	38 (32-49)	36 (22-45)	0.368
IL6 (pg/ml)	4746(2483-9122)	1496 (549-8475)	0.278
MCP1 (pg/ml)	13517 (8237-14243)	12124 (4599-15094)	0.975
VEGFA (pg/ml)	135(126-158)	128 (70-152)	0.336
GDF15 (pg/ml)	45(35-63)	23 (15-36)	0.062 (t)
ICAM1 (pg/ml)	605 (458-698)	375 (308-483)	0.0324*
VCAM1 (pg/ml)	280 (203-435)	93 (40-151)	0.0039**
SAA (pg/ml)	610 (80-1793)	80 (80-80)	0.004**
P-Selectin (pg/ml)	805 (590-1028)	230 (230-575)	0.002**
ADAMST13 (pg/ml)	200 (163-463)	50 (50-170)	0.008**
Fibrinogen (pg/ml)	380 (285-478)	240 (163-375)	0.088 (t)
PF4 (pg/ml)	350 (173-515)	315 (99-565)	0.756
vWF (pg/ml)	105 (75-123)	123 (49-182)	0.306
Endoglin (pg/ml)	OOR	OOR	-
Endothelin (pg/ml)	1 (0-2)	2 (1-2)	0.271
TGFb (pg/ml)	101 (87-127)	107 (92-114)	0.556
LIF (pg/ml)	32 (20-120)	14 (2-100)	0.129
Apelin (pg/ml)	OOR	OOR	-
t (trend) : p<0.1	*<0.05 **<0.01		
OOR : out of range	- : not applicable		

Annexe 2 : Réponse à Di Benedetto *et al.*

Correspondence response

Response to: 'Adipose stromal vascular fraction and regenerative therapy in SSc: response to the article by Magalon *et al.*' by Di Benedetto *et al.*

We would like to thank Di Benedetto *et al.*¹ for their constructive comments on our recent publication in *Annals of Rheumatic Disease* entitled 'Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis'.²

Di Benedetto *et al.* mentioned that the profibrotic signature of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from patients with the diffuse cutaneous form of systemic sclerosis (dc-SSc) has been established from previous works. In line with this, they discussed the potential risk of increasing the fibrotic burden by using autologous adipose-derived stromal vascular fraction (ADSVF) in which MSCs are highly represented.

Although this is a fair question in the context of developing MSCs-based therapy for SSc, we would like to emphasise the fact that the biological findings referred to by Di Benedetto *et al.*, may not be fully extrapolated to the ADSVF used in our study. Indeed, the mentioned studies rather relate to MSCs derived in culture from the bone marrow using research-grade reagents that are very different from the mesenchymal cell compartment that we aimed to describe in the non-cultured clinical-grade ADSVF. Indeed, the use of MSCs necessitate an *in vitro* amplification procedure which can have a major impact on the differentiation and characteristics of MSCs,^{3,4} thereby limiting the comparison between native MSCs present within ADSVF. ADSVF is also a complex product whose biological properties result from multiple interactions between various cell subpopulations, and the role of each cell subset remains to be identified. In addition, it is well established that cultured MSCs derived from bone marrow and adipose tissue are quite different populations⁵ and to our knowledge, such a profibrotic profile of MSCs derived from the adipose tissue of patients with SSc was not reported, as recently confirmed by the review from Rozier *et al.*⁶ In 2017, report from the team of the Department of Biotechnological and Applied Clinical Sciences (l'Aquila University, Italy) indicated that MSCs isolated from adipose tissue of dc-SSc may represent a possible therapeutic option as they show similar biological properties compared with MSCs from healthy donors.⁷

From a clinical point of view, we are surprised that Benedetto *et al.* omitted to mention that autologous ADSVF, injected in the fingers of 12 patients with SSc (including five dc-SSc) displaying hand disability, was shown to have a good safety profile and a potential efficacy.⁸ In particular, results of Rodnan score applied to the hands, with a follow-up until 2 years, did not indicate any worsening of the fibrosis aspect.⁹

We would also like to emphasise that the potential strength of our study was that it was performed on clinical-grade ADSVF, meaning that the analysed ADSVF correspond to the products potentially injected in the SCLERADEC II randomised placebo-controlled trial (NCT02558543). From our point of view, evaluation of this therapeutic ADSVF makes our findings of particular clinical relevance but limits the amount of ADSVF available for biological investigations. This is the reason why functional angiogenic assays could not be performed on a larger number of samples prepared from various forms of the disease. We fully agree that additional studies are needed to consider whether the limited or diffuse cutaneous form of SSc have a similar impact on ADSVF properties. As suggested by Benedetto *et al.*, refinements in the characterisation of SSc-ADSVF profile is still required. Beyond transcriptomic and phenotypic signature, further work should implement accurate

in vitro and *in vivo* functional assays to address the contribution of each of the cellular subsets and their interactive benefit in the modulation of fibrosis, angiogenesis and inflammation. These targeted approaches, together with outputs from the ongoing clinical trials, are needed to further define the optimal strategies for cell-based therapies of SSc.

Jérémy Magalon ^{1,2} Mélanie Velier,^{1,2} Stéphanie Simoncini,² Françoise Dignat-George,² Brigitte Granel,^{2,3} Pascale Paul,^{1,2} Florence Sabatier^{1,2}

¹Cell Therapy Department, Hôpital de la Conception, Marseille, France

²Aix Marseille University, Marseille, France

³Internal Medicine Department, Hôpital Nord, Marseille, France

Correspondence to Professor Florence Sabatier, Cell Therapy Department, Hôpital de la Conception, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Marseille 13005, France; florence.sabatier@ap-hm.fr

Handling editor Josef S Smolen

Contributors Drafting of the manuscript:JM, MV, SS. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: FDG, BG, PP and FS.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Provenance and peer review Commissioned; internally peer reviewed.

© Author(s) (or their employer(s)) 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.



To cite Magalon J, Velier M, Simoncini S, *et al.* *Ann Rheum Dis* 2020;**79**:e54.

Received 4 February 2019

Revised 5 February 2019

Accepted 5 February 2019

Published Online First 20 February 2019



► <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215113>

Ann Rheum Dis 2020;**79**:e54. doi:10.1136/annrheumdis-2019-215132

ORCID iD

Jérémy Magalon <http://orcid.org/0000-0003-1494-7011>

REFERENCES

- 1 Di Benedetto P, Cipriani P, Ruscitti P, *et al.* Adipose stromal vascular fraction and regenerative therapy in SSc: response to the article by Magalon *et al.* *Ann Rheum Dis* 2020;**79**:e53.
- 2 Magalon J, Velier M, Simoncini S, *et al.* Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2019;**78**:391–8.
- 3 Haggmann S, Moradi B, Frank S, *et al.* Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskelet Disord* 2013;**14**.
- 4 Guimarães-Camboa N, Cattaneo P, Sun Y, *et al.* Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells *In Vivo*. *Cell Stem Cell* 2017;**20**:345–59.
- 5 Noël D, Caton D, Roche S, *et al.* Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 2008;**314**:1575–84.
- 6 Rozier P, Maria A, Goulabchand R, *et al.* Mesenchymal stem cells in systemic sclerosis: allogenic or autologous approaches for therapeutic use? *Front Immunol* 2018;**9**.
- 7 Capelli C, Zaccara E, Cipriani P, *et al.* Phenotypical and functional characteristics of *In Vitro*-Expanded adipose-derived mesenchymal stromal cells from patients with systemic sclerosis. *Cell Transplant* 2017;**26**:841–54.
- 8 Granel B, Daumas A, Jouve E, *et al.* Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Ann Rheum Dis* 2015;**74**:2175–82.
- 9 Daumas A, Magalon J, Jouve E, *et al.* Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. *Curr Res Transl Med* 2017;**65**:40–3.

Annexe 3 : Réponse à Manetti et al.

Correspondence response

Response to: 'Could autologous adipose-derived stromal vascular fraction turn out an unwanted source of profibrotic myofibroblasts in systemic sclerosis?' by Manetti

We would like to thank Dr Manetti for his relevant comments¹ on our recent article in the *Annals of Rheumatic Disease* entitled 'Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis'.² We are pleased that this study has raised such a high interest in the scientific community and allows us to provide additional comments to those recently published^{3,4} in order to discuss the potential profibrotic profile of adipose-derived stem cells (ADSC) derived from patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis (SSc). We agree that SSc is a rare but potentially lethal autoimmune disease that challenges the urgent need to develop novel therapeutic approaches. In this context, autologous fat grafting has been successfully used to limit SSc-associated clinical complications such as SSc-related perioral thickening and mouth opening limitation⁵ facial handicap⁶ or digital ulcers.⁷ These clinical results opened up research perspectives on autologous adipose tissue based therapies for patients suffering from SSc. However, we agree that the question raised by Dr Manetti: 'Could autologous adipose-derived stromal vascular fraction turn out an unwanted source of profibrotic myofibroblasts in systemic sclerosis?' is of a major concern.

Indeed, some studies performed on skin biopsies in patients with SSc suggested that perivascular cells from the mesenchymal lineage were prone to myofibroblastic differentiation.⁸ However, recent investigations regarding the impact of SSc disease on the disorganisation of the adipose tissue architecture⁹ or altered differentiation capabilities⁹ and reduced proliferation rate and metabolic activity of ADSC¹⁰ remain controversial. Conversely, Capelli and colleagues showed that ADSC obtained from patients with SSc exhibit phenotypic pattern, proliferation, immunosuppressive properties and differentiation potential that are similar to the ones observed in healthy controls, emphasising the safety of using autologous ADSC grafting as a therapeutic option for SSc.¹¹ The discordance between these studies may be explained by (1) the variable sources and expansion protocols that allow to derive ADSC and (2) the high interindividual heterogeneity between patients with SSc in terms of severity, duration and manifestations of the disease and ongoing treatment. Moreover, these preliminary studies have concerned investigation at the cellular levels whereas it is now well established that the mechanisms sustaining the function of ADSC mainly rely on the secretion of factors able to regulate endogenous cell activity. Although ADSC is one of the most represented cell subtype in adipose-derived stromal vascular fraction (ADSVF), we believe that conclusions driven from ADSC derived in culture from patients with SSc cannot be extrapolated to the freshly isolated autologous therapeutic ADSVF characterised in our study. In line with this assumption, recent studies have highlighted differences in the paracrine content of expanded and non-expanded ADSC and suggest that ADSVF may secrete a larger panel of soluble factors with beneficial properties for cell therapy than ADSC.¹²

Furthermore, although pathogenesis of SSc is not fully understood, it is now recognised that endothelial

dysfunction constitutes the *primum movens* for fibrosis progression. Thus, the SCLERADEC phase I clinical trial (NCT:01813279) and the preserved proangiogenic activity of SSc-ADSVF described in our study suggest that the presence of regenerative endothelial progenitors cells in ADSVF is a major advantage in preventing and/or limiting SSc-associated vasculopathy.^{2,13} In addition, transcriptomic and molecular signatures of SSc are not strictly correlated to the *in vivo* properties of progenitor cells. Indeed, we have found several markers of endothelial activation and dysregulation in the secretome of ADSVF from patients with SSc, without compromising its vascular repair capacity compared with ADSVF from healthy donors.

Nonetheless, we agree with Dr Manetti that implementation of *in vitro* and/or *in vivo* potency assays addressing both vascular and fibrotic properties of ADSVF are needed to define the optimal cellular-based strategies in SSc. From our point of view, such developments can benefit from investigations conducted using a pharmaceutical grade cell therapy product infused in the frame of a controlled clinical trial in order to integrate not only the patients and disease characteristics but also the possible impact of the manufacturing process.

Melanie Velier,^{1,2} Jeremy Magalon ,^{1,2} Stephanie Simoncini,² Françoise Dignat-George,² Brigitte Granel,^{2,3} Pascale Paul,^{1,2} Florence Sabatier^{1,2}

¹Cell Therapy Department, Hopital de la Conception, Marseille, France

²Cardiovascular and Nutrition Research Center, INSERM, INRA, Aix-Marseille Université, Marseille, France

³Internal Medicine Department, Hopital Nord, Marseille, France

Correspondence to Professor Florence Sabatier, Marseille, France; florence.sabatier@ap-hm.fr

Handling editor Josef S Smolen

Contributors Drafting of the manuscript: JM, MV, SS. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: FD-G, BG, PP and FS.

Funding The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Provenance and peer review Commissioned; internally peer reviewed.

© Author(s) (or their employer(s)) 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.



To cite Velier M, Magalon J, Simoncini S, et al. *Ann Rheum Dis* 2020;**79**:e56.

Received 18 March 2019

Accepted 18 March 2019

Published Online First 9 April 2019



► <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215288>

Ann Rheum Dis 2020;**79**:e56. doi:10.1136/annrheumdis-2019-215288

ORCID iD

Jeremy Magalon <http://orcid.org/0000-0003-1494-7011>

REFERENCES

- 1 Manetti M et al. Could autologous adipose-derived stromal vascular fraction turn out an unwanted source of profibrotic myofibroblasts in systemic sclerosis? *Ann Rheum Dis* 2020;**79**:e55.
- 2 Magalon J, Velier M, Simoncini S, et al. Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2019;**78**:391–8.

Annexe 4 : Résultats complémentaires sur la micrograisse émulsifiée

Les données présentées dans cette partie font l'objet de résultats non publiés à ce jour.

La micrograisse émulsifiée peut-elle être une alternative à la FVS dans la prise en charge de la ScS ?

1. Contexte scientifique

A ce jour, les options thérapeutiques pour la prise en charge du handicap des mains et du visage pour les patients sclérodermiques sont extrêmement limitées. Depuis plusieurs années, de nouvelles stratégies de thérapie cellulaire se développent dans la prise en charge des lésions tissulaires (vasculaires et fibrotiques), avec notamment l'injection locale de produits cellulaires dérivés du TA autologue. Les essais cliniques pionniers de notre équipe évaluant l'efficacité de la FVS autologue dans la prise en charge de la vasculopathie et de la sclérose des mains n'ont pas été concluants⁴⁸². De plus, l'obtention de FVS par digestion enzymatique d'un prélèvement de TA sous-cutané est un procédé techniquement lourd et coûteux, qui répond à la définition des MTI selon le règlement européen CE 1394/2007.

En 2013, Tonnard *et al.* ont décrit une nouvelle méthode de traitement du TA avant réinjection : la « *nanofat* »⁵³¹. Ce procédé s'affranchit de l'étape de digestion enzymatique tout en permettant de recueillir un produit extrêmement fluide, riche en cellules progénitrices de la FVS. La production de *nanofat* repose sur une émulsification mécanique du TA suivie d'une filtration, réalisée dans le même temps opératoire que le prélèvement (Figure 37).



Figure 37 : Procédé d'émulsification de la micrograisse pour obtention de la *nanofat*

Cette technique présente les avantages d'être plus rapide, moins contraignante sur le plan logistique, et moins coûteuse. Elle permet également de mieux préserver l'intégrité de la niche de progéniteurs présents dans les microvaisseaux. En outre, la fluidité de l'effluent obtenu

permet une injection plus régulière, dans des aiguilles de plus petits calibres, adaptées au visage ou aux extrémités digitales.

Malgré une utilisation croissante de la *nanofat* en chirurgie réparatrice, peu de données expérimentales sont disponibles sur les propriétés biologiques de ce produit. L'efficacité de la *nanofat* comme source de cellules progénitrices sans manipulation substantielle a été démontrée dans quelques situations cliniques (correction des rides, traitement des cicatrices, lichen scléreux, lésions inflammatoires de la sphère génito-anale, pathologies dégénératives ostéoarticulaires ...) ⁵³²⁻⁵³⁴. Cet effet semble être la résultante des propriétés des cellules contenues dans la FVS, en l'absence d'effet volumateur possible du fait de la disparition des adipocytes lors de la préparation de la *nanofat*. Cependant aucune étude ne documente les propriétés angiogéniques et antifibrotiques de la *nanofat* dans le contexte de la ScS.

2. Matériels, méthodes et résultats

Les prélèvements de TA, considérés comme « déchets opératoires » ont été obtenus à partir de donneurs sains et de patients sclérodermiques au cours d'opérations de lipoaspirations ou de lipofillings lorsque que le TA était excédentaire. Un formulaire de non-opposition pour utilisation des déchets opératoires à des fins scientifiques a été signé par tous les participants.

Ces prélèvements ont été réalisés par les chirurgiens du service de chirurgie réparatrice du Pr. Casanova à l'hôpital de la Conception à Marseille. Les prélèvements étaient effectués dans la région abdominale ou au niveau des hanches, après anesthésie locale par infiltration à la lidocaïne/adréraline à 1%, au moyen de la canule du kit St'rim (Thiebaud Biomedical Devices), permettant l'obtention de « micrograisse ».

Dans les suites directes du prélèvement, le TA était mécaniquement émulsifié à l'aide d'un dispositif médical marqué CE (Kit Hy-Tissue Nanofat, Fidia), à usage unique en système clos. Un premier lavage au Ringer Lactate à 37°C permettait d'éliminer les liquides d'infiltration, de rinçage et le sang restants dans le prélèvement. L'émulsification était ensuite réalisée en effectuant 30 passages de la micrograisse d'une seringue à l'autre au travers d'un connecteur de 2 mm de diamètre. Enfin, l'émulsion était filtrée (120µm) avant sa caractérisation.

2.1. La nanofat présente une cellularité réduite par rapport à la FVS enzymatique

▪ Matériels et méthodes

Pour déterminer la composition cellulaire et la répartition des différentes sous-populations cellulaires, les *nanofat* obtenues étaient soumises à une digestion enzymatique à la collagénase (0,25 U/ml) pendant 45 minutes. Ceci a permis d'extraire les cellules contenues dans la *nanofat* dans l'objectif de déterminer : (i) la quantité de cellules nucléées et la viabilité cellulaire au moyen d'un compteur automatique cellulaire incluant de l'iodure de propidium et de l'acridine orange (Luna®, Logos Biosystems) et (ii) la répartition des sous-populations cellulaires par une approche de cytométrie en flux multiparamétrique après immunomarquages directs (CD90, CD146, CD34, CD45, DRAQ5)

▪ Résultats

Les résultats issus de neuf prélèvements de micrograisse montrent que la quantité de CNV par millilitre de TA est significativement réduite dans les préparations de *nanofat* (Nanofat-DS) par rapport aux cellules de FVS (FVS-DS) extraites par méthode enzymatique des mêmes donneurs. Cependant, l'émulsification n'impacte pas la viabilité cellulaire.

L'étude de la répartition des sous-populations cellulaires met en évidence des différences de distribution dont une proportion plus importante de cellules endothéliales et une réduction de celle des CSM dans la *nanofat* (n=7) comparativement aux cellules de FVS (n=7). Ceci suggère un impact significatif de l'émulsification du TA sur la répartition cellulaire. Ces résultats sont présentés dans la Figure 38 ci-dessous.

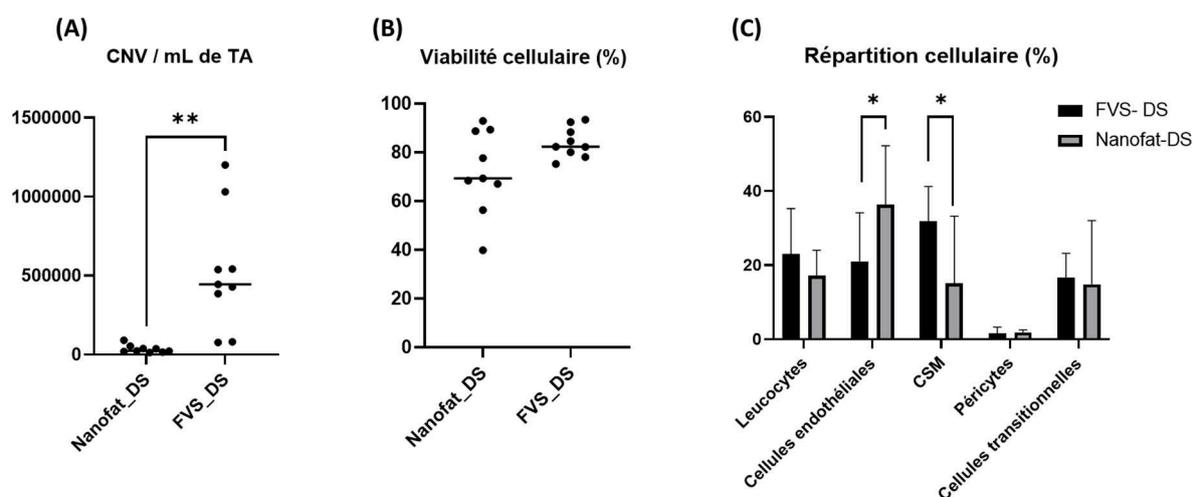


Figure 38 : Caractéristiques cellulaires générales de *nanofat* et de FVS enzymatiques issues de donneurs sains (n=9) : (A) Quantité de CNV par ml de TA, (B) Viabilité cellulaire, (C) Répartition cellulaire par approche de cytométrie en flux

2.2. Les *nanofat* issues de patients atteints de ScS présentent des caractéristiques similaires à celles de donneurs sains

L'impact de la ScS sur le rendement cellulaire de la procédure de *nanofat* a été analysé sur des prélèvements de micrograisse issus de 9 donneurs sains et 7 patients sclérodermiques. L'étude des caractéristiques cellulaires de la *nanofat* n'a pas révélé de différence entre les *nanofat* de patients atteints de ScS et celles issues de donneurs sains en termes de CNV/ml de TA et de viabilité cellulaire. Par ailleurs, les rendements évaluant le volume de *nanofat* obtenue par rapport au volume de TA émulsifié (%v/v) étaient similaires pour les échantillons témoins et pathologiques. Enfin, l'analyse des sous-populations cellulaires obtenues après digestion enzymatique des *nanofat* saines et sclérodermiques ne montre pas de différence significative entre les deux groupes (Figure 39).

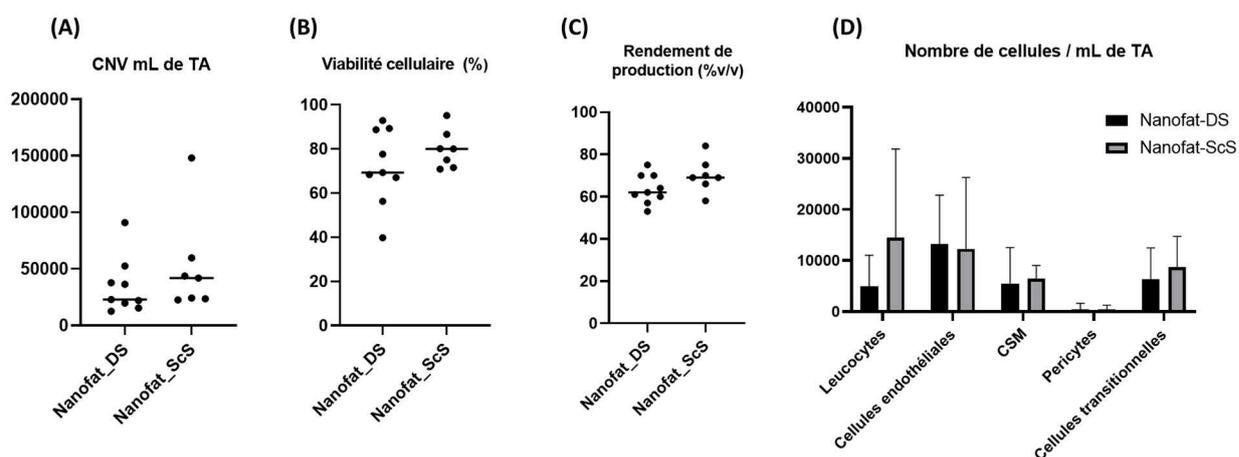


Figure 39 : Caractéristiques cellulaires générales de *nanofat* de donneurs sains (n=9) et de patients sclérodermiques (n=7) : (A) Quantité de CNV par ml de TA, (B) Viabilité cellulaire, (C) Rendement de production de la *nanofat* et (D) Répartition cellulaire par approche de cytométrie en flux

2.3. Impact de l'émulsification sur l'architecture du tissu adipeux

▪ Matériels et méthodes

Un prélèvement de *nanofat* et de TA non émulsifié ont été transportés à 4°C dans le laboratoire de Biologie Cellulaire du Pr. Roll à l'hôpital de la Timone, Marseille. Des étalements sur lame ont été réalisés après dilution du TA et de la *nanofat* avec du PBS. Une coloration au May-Grünwald Giemsa et des immunomarquages CD144 et DAPI ont été réalisés après

fixation en paraformaldéhyde 4%. Une analyse en microscopie à fluorescence a permis de visualiser le réseau microvasculaire (architecture, densité) et la teneur en cellules endothéliales. Les photos ont été prises à l'objectif X20.

▪ Résultats

Les résultats histologiques comparant le TA natif et la *nanofat* révèlent une désorganisation de l'architecture tissulaire après émulsification. Cela est objectivé par la rupture des adipocytes de plus grande taille dans l'échantillon de *nanofat* par rapport au TA et une densité cellulaire réduite. L'analyse par immunofluorescence a montré que, contrairement à une disposition régulière de cellules endothéliales (co-marquées au DAPI (bleu) et au CD144 (vert)) autour des lobules adipeux, la *nanofat* conservait une proportion importante de cellules endothéliales, malgré la désorganisation du tissu (Figure 40).

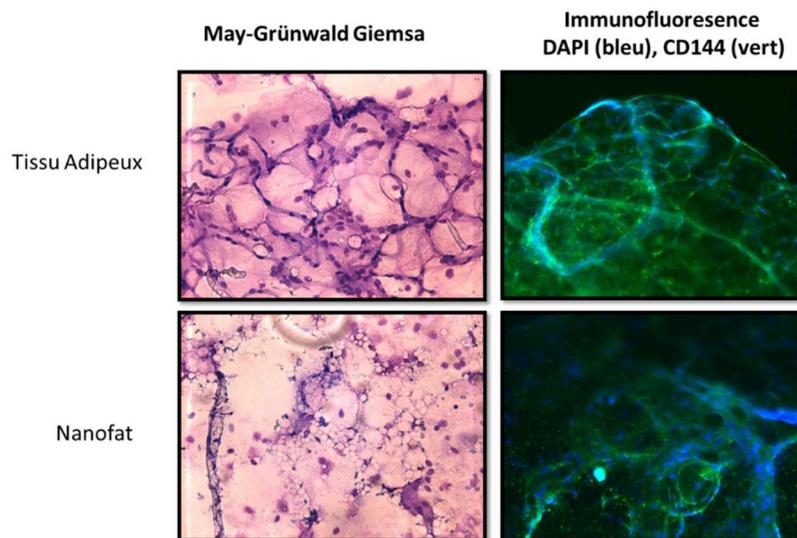


Figure 40 : Photos représentatives des analyses histologiques et des immunomarquages réalisées sur le tissu adipeux et sur la *nanofat*

2.4. Analyse du sécrétome de *nanofat* saine et sclérodermique

▪ Matériels et méthodes

L'analyse de plusieurs facteurs a été réalisée sur les milieux conditionnés de *nanofat*. Ces derniers ont été obtenus par ensemencement de 100 000 cellules de *nanofat* dans un volume fixe de milieu DMEM-1% sérum de veau fœtal à 37°C. Après 72h, le surnageant était récupéré puis centrifugé à 300g pendant 5min. Les concentrations de 16 cytokines et autres molécules solubles ont été déterminées avec la technologie multiplex Luminex® d'après les instructions du fournisseur. Chaque échantillon (25µL) était incubé avec des billes magnétiques couplées à des anticorps spécifiques sous agitation. Après lavages, des étapes d'incubation avec des

anticorps anti-humain biotinylés puis avec la streptavidine- phycoérythrine étaient réalisées.
La lecture des niveaux de fluorescence a été faite sur le lecteur Magpix® (ThermoFisher).

▪ Résultats

Les sécrétomes de *nanofat* de patients sclérodermiques présentent des niveaux plus élevés de 7 molécules : IFN γ , CD40L soluble (sCD40L), IL-8, *Growth/Differentiation Factor 15* (GDF15), TGF β , HGF et Ang2 comparativement à des sécrétomes de *nanofat* de donneurs sains, suggérant une empreinte de la maladie sur le profil de sécrétion (Tableau 12).

	Concentrations		p-value
	Mediane [25%–75% quartile]		
	Nanofat-ScS (n=3)	Nanofat-DS (n=6)	
IFN γ (pg/mL)	4,91 [4,640-7,210]	1,33 [0,69-2,03]	0,0238
sCD40L (pg/mL)	85,13 [74,54-101,40]	28,10 [0-68,11]	0,0238
IL-8 (pg/mL)	670,2 [567,0-1186]	115,9 [22,7-242,2]	0,0238
GDF15 (ng/mL)	0,14 [0,07-0,15]	0,035 [0,0175-0,0775]	0,0476
TGF β (pg/mL)	103,8 [77,39-636,3]	44,19 [17,08-68,54]	0,0238
HGF (pg/mL)	231,2 [146,7-243,1]	106,3 [63,75-134,4]	0,0476
Ang 2 (pg/mL)	177,6 [111,5-234,8]	0 [0-106,1]	0,0238
IL-6 (pg/mL)	41,6 [36,48-95,31]	19,41 [9,30-72,61]	0,262
PDGF (pg/mL)	15,81 [0-71,34]	0 [0-18,93]	0,464
MMP-2 (pg/mL)	0 [0-558,4]	516,2 [317,6-752,7]	0,536
MMP-9 (pg/mL)	413,6 [347,5-810]	634,6 [310,5-2063]	0,905
ICAM-1 (ng/mL)	5,63 [2,73-6,42]	2,42 [1,518-4,213]	0,381
VCAM-1 (ng/mL)	0,08 [0,08-0,19]	0,115 [0,09-0,145]	0,881
P-selectine (ng/mL)	0,43 [0,33-0,89]	0,415 [0,18-0,44]	0,536
FGF-1 (pg/mL)	24,3 [22,69-78,5]	15,5 [0-36,79]	0,238
VEGF-A (pg/mL)	1,54 [0,89-3,35]	0,1 [0-1,36]	0,083

Tableau 12 : Concentrations d'un panel de molécules évaluées dans les sécrétomes de *nanofat* extraites de patients sclérodermiques (n=3) et de donneurs sains (n=6)

Les données préliminaires sur la caractérisation cellulaire de la micrograisse émulsifiée mettent en évidence plusieurs points de conclusions intermédiaires :

- 1) L'émulsification du TA réduit drastiquement le nombre de cellules isolées depuis le TA par rapport à la digestion enzymatique, sans impacter la viabilité cellulaire.
- 2) La répartition des sous-populations cellulaires de la *nanofat* diffère de celle de la FVS enzymatique, principalement sur les proportions de cellules régénératives
- 3) L'émulsification de la micrograisse modifie significativement l'architecture du TA mais permet une conservation des cellules endothéliales dans la *nanofat*
- 4) La ScS n'impacte pas la composition cellulaire quantitative et qualitative de la *nanofat* mais elle en modifie le profil sécrétoire.
- 5) Ces données préliminaires descriptives nécessitent d'être complétées par une étude fonctionnelle comparant les *nanofat* de donneurs sains et de patients sclérodermiques

Résumé

La Sclérodémie Systémique (ScS) est une maladie auto-immune rare caractérisée par une vasculopathie ischémique et des lésions de fibrose touchant la peau et les organes profonds. Les thérapeutiques conventionnelles sont limitées, justifiant la recherche de nouvelles stratégies. Notre équipe est pionnière dans le développement de la Fraction Vasculaire Stromale (FVS) du tissu adipeux autologue, concentré de cellules régénératives non adipocytaires, pour la prise en charge du handicap des mains et du visage de ces patients. Les résultats mitigés des essais cliniques imposent de mieux comprendre les propriétés biologiques sous-tendant l'efficacité thérapeutique de la FVS dans un contexte de ScS.

L'objectif de ce travail est de rechercher un éventuel impact du contexte autologue de la ScS sur le potentiel angiogénique et antifibrotique de la FVS et des progéniteurs mésenchymateux du tissu adipeux. Nous montrons que le potentiel angiogénique de la FVS extraite chez des patients sclérodermiques est maintenu, bien que légèrement réduit, et ce malgré la mise en évidence d'une signature transcriptomique différentielle. De plus, la FVS de donneurs sains permet de réduire l'expression de marqueurs de fibrose *in vitro*. Par ailleurs, les propriétés paracrines de la composante mésenchymateuse de la FVS de patients sclérodermiques sont similaires à celles de donneurs sains.

Au total, les résultats supportent le développement d'approches autologues dérivées du tissu adipeux dans la ScS. Ce travail ouvre des perspectives d'ingénierie cellulaire ou moléculaire dans le but de renforcer l'efficacité thérapeutique de ces produits de thérapie cellulaire.

Mots clés : Sclérodémie systémique, Fraction vasculaire stromale, Cellules souches mésenchymateuses, Thérapie cellulaire, Angiogenèse, Fibrose

Abstract

Systemic scleroderma (SSc) is a rare autoimmune disease characterized by an ischemic vasculopathy and fibrosis lesions affecting the skin and deep organs. Conventional therapies are limited, justifying the search for new strategies. Our team is a pioneer in the development of Stromal Vascular Fraction (SVF) from autologous adipose tissue, a concentrate of non-adipose regenerative cells, for the management of hand and facial disability in these patients. The mixed results of clinical trials require a better understanding of the biological properties underlying the therapeutic efficacy of SVF in the context of SSc.

The objective of this work is to investigate a possible impact of the autologous context of SSc on the angiogenic and antifibrotic potential of SVF and adipose-derived mesenchymal stem cells. We show that the angiogenic potential of SVF extracted from patients with SSc is maintained, albeit slightly reduced, despite the identification of a differential transcriptomic signature. Moreover, SVF from healthy donors induces a reduction in the expression of fibrosis markers *in vitro*. Furthermore, the paracrine properties of the mesenchymal component of SVF from patients suffering from SSc are similar to those from healthy donors.

Overall, the results support the development of autologous approaches derived from adipose tissue in SSc. This work opens perspectives of cell or molecular engineering approaches in order to enhance the therapeutic efficacy of these cell therapy products.

Keywords: Systemic sclerosis, Stromal vascular fraction, Mesenchymal stem cells, Cell therapy, Angiogenesis, Fibrosis

Références bibliographiques

1. Barnes, J. & Mayes, M. D. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr. Opin. Rheumatol.* **24**, 165–170 (2012).
2. Ranque, B. & Mouthon, L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **9**, A311-318 (2010).
3. Hachulla, E. & Launay, D. Diagnosis and classification of systemic sclerosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **40**, 78–83 (2011).
4. D’Amico, F., Skarmoutsou, E. & Mazzarino, M. C. The sex bias in systemic sclerosis: on the possible mechanisms underlying the female disease preponderance. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **47**, 334–343 (2014).
5. Elhai, M., Meune, C., Avouac, J., Kahan, A. & Allanore, Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **51**, 1017–1026 (2012).
6. Mayes, M. D. *et al.* Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* **48**, 2246–2255 (2003).
7. Elhai, M. *et al.* Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1897–1905 (2017).
8. Godard, D. The needs of patients with systemic sclerosis--what are the difficulties encountered? *Autoimmun. Rev.* **10**, 291–294 (2011).
9. Allanore, Y. *et al.* Systemic sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **1**, 15002 (2015).
10. Allanore, Y., Dieude, P. & Boileau, C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **49**, 203–210 (2010).
11. Feghali-Bostwick, C., Medsger, T. A. & Wright, T. M. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* **48**, 1956–1963 (2003).
12. Rodriguez-Reyna, T. S. *et al.* HLA Class I and II Blocks Are Associated to Susceptibility, Clinical Subtypes and Autoantibodies in Mexican Systemic Sclerosis (SSc) Patients. *PLoS One* **10**, e0126727 (2015).
13. Murdaca, G., Contatore, M., Gulli, R., Mandich, P. & Puppo, F. Genetic factors and systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **15**, 427–432 (2016).
14. Furukawa, H. *et al.* Human Leukocyte Antigen and Systemic Sclerosis in Japanese: The Sign of the Four Independent Protective Alleles, DRB1*13:02, DRB1*14:06, DQB1*03:01, and DPB1*02:01. *PLoS One* **11**, e0154255 (2016).
15. Xu, Y., Wang, W., Tian, Y., Liu, J. & Yang, R. Polymorphisms in STAT4 and IRF5 increase the risk of systemic sclerosis: a meta-analysis. *Int. J. Dermatol.* **55**, 408–416 (2016).

16. Bossini-Castillo, L. *et al.* Genomic Risk Score impact on susceptibility to systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **80**, 118–127 (2021).
17. Tsou, P.-S., Varga, J. & O'Reilly, S. Advances in epigenetics in systemic sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat. Rev. Rheumatol.* **17**, 596–607 (2021).
18. Makino, T. & Jinnin, M. Genetic and epigenetic abnormalities in systemic sclerosis. *J. Dermatol.* **43**, 10–18 (2016).
19. Tsou, P.-S. *et al.* Histone Deacetylase 5 Is Overexpressed in Scleroderma Endothelial Cells and Impairs Angiogenesis via Repression of Proangiogenic Factors. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68**, 2975–2985 (2016).
20. Tsou, P.-S. *et al.* Inhibition of EZH2 prevents fibrosis and restores normal angiogenesis in scleroderma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 3695–3702 (2019).
21. Angiolilli, C. *et al.* New insights into the genetics and epigenetics of systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 657–673 (2018).
22. Miller, F. W. *et al.* Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J. Autoimmun.* **39**, 259–271 (2012).
23. Marie, I. & Gehanno, J.-F. Environmental risk factors of systemic sclerosis. *Semin. Immunopathol.* **37**, 463–473 (2015).
24. Marie, I. *et al.* Association of occupational exposure with features of systemic sclerosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **72**, 456–464 (2015).
25. Marie, I. *et al.* Systemic sclerosis and exposure to heavy metals: A case control study of 100 patients and 300 controls. *Autoimmun. Rev.* **16**, 223–230 (2017).
26. Kettaneh, A. *et al.* Occupational exposure to solvents and gender-related risk of systemic sclerosis: a metaanalysis of case-control studies. *J. Rheumatol.* **34**, 97–103 (2007).
27. Janowsky, E. C., Kupper, L. L. & Hulka, B. S. Meta-analyses of the relation between silicone breast implants and the risk of connective-tissue diseases. *N. Engl. J. Med.* **342**, 781–790 (2000).
28. Marie, I. Systemic sclerosis and exposure to heavy metals. *Autoimmun. Rev.* **18**, 62–72 (2019).
29. Volkmann, E. R. *et al.* Association of Systemic Sclerosis With a Unique Colonic Microbial Consortium. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68**, 1483–1492 (2016).
30. Andréasson, K., Alrawi, Z., Persson, A., Jönsson, G. & Marsal, J. Intestinal dysbiosis is common in systemic sclerosis and associated with gastrointestinal and extraintestinal features of disease. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 278 (2016).
31. Koumakis, E. *et al.* Familial autoimmunity in systemic sclerosis -- results of a French-based case-control family study. *J. Rheumatol.* **39**, 532–538 (2012).
32. Hudson, M. *et al.* Polyautoimmunity and familial autoimmunity in systemic sclerosis. *J. Autoimmun.* **31**, 156–159 (2008).
33. Bertolino, J. *et al.* [Systemic sclerosis and macrovascular involvement: Status of the issue in 2019]. *J. Med. Vasc.* **44**, 400–421 (2019).

34. Lescoat, A. *et al.* Ulnar Artery Occlusion and Severity Markers of Vasculopathy in Systemic Sclerosis: A Multicenter Cross-Sectional Study. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 983–990 (2019).
35. Sgonc, R. *et al.* Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J. Clin. Invest.* **98**, 785–792 (1996).
36. Maehara, T. *et al.* Cytotoxic CD4+ T lymphocytes may induce endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* **130**, 2451–2464 (2020).
37. Trojanowska, M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 453–460 (2010).
38. Rabquer, B. J. *et al.* The proadhesive phenotype of systemic sclerosis skin promotes myeloid cell adhesion via ICAM-1 and VCAM-1. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **48**, 734–740 (2009).
39. Flavahan, N. A. New mechanism-based approaches to treating and evaluating the vasculopathy of scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* **33**, 471–479 (2021).
40. Yamane, K. *et al.* Elevated plasma levels of endothelin-1 in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **34**, 243–244 (1991).
41. Vancheeswaran, R., Azam, A., Black, C. & Dashwood, M. R. Localization of endothelin-1 and its binding sites in scleroderma skin. *J. Rheumatol.* **21**, 1268–1276 (1994).
42. Benyamine, A. *et al.* Increased serum levels of fractalkine and mobilisation of CD34+CD45- endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 60 (2017).
43. Kanno, Y., Shu, E., Kanoh, H., Matsuda, A. & Seishima, M. α 2AP regulates vascular alteration by inhibiting VEGF signaling in systemic sclerosis: the roles of α 2AP in vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 22 (2017).
44. Iversen, L. V. *et al.* Cross-sectional study of soluble selectins, fractions of circulating microparticles and their relationship to lung and skin involvement in systemic sclerosis. *BMC Musculoskelet. Disord.* **16**, 191 (2015).
45. Michalska-Jakubus, M., Kowal-Bielecka, O., Smith, V., Cutolo, M. & Krasowska, D. Plasma endothelial microparticles reflect the extent of capillaroscopic alterations and correlate with the severity of skin involvement in systemic sclerosis. *Microvasc. Res.* **110**, 24–31 (2017).
46. Jung, C. *et al.* The association between endothelial microparticles and inflammation in patients with systemic sclerosis and Raynaud’s phenomenon as detected by functional imaging. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **61**, 549–557 (2015).
47. Wermuth, P. J., Piera-Velazquez, S., Rosenbloom, J. & Jimenez, S. A. Existing and novel biomarkers for precision medicine in systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 421–432 (2018).
48. Del Papa, N. *et al.* Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **50**, 1296–1304 (2004).
49. Tinazzi, E. *et al.* Gene expression profiling in circulating endothelial cells from systemic sclerosis patients shows an altered control of apoptosis and angiogenesis that is modified by iloprost infusion. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R131 (2010).

50. Ames, P. R. *et al.* The coagulation/fibrinolysis balance in systemic sclerosis: evidence for a haematological stress syndrome. *Rheumatology* **36**, 1045–1050 (1997).
51. Postlethwaite, A. E. & Chiang, T. M. Platelet contributions to the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **19**, 574–579 (2007).
52. Vancheeswaran, R. *et al.* Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J. Rheumatol.* **21**, 1838–1844 (1994).
53. Ignarro, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **3**, 31–36 (1989).
54. Cutolo, M., Pizzorni, C., Secchi, M. E. & Sulli, A. Capillaroscopy. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **22**, 1093–1108 (2008).
55. Avouac, J. *et al.* Correlations between angiogenic factors and capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R55 (2013).
56. Del Papa, N. *et al.* Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **54**, 2605–2615 (2006).
57. Choi, J.-J. *et al.* Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **30**, 1529–1533 (2003).
58. Hebbbar, M. *et al.* Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **43**, 889–893 (2000).
59. Macko, R. F. *et al.* Increased circulating concentrations of the counteradhesive proteins SPARC and thrombospondin-1 in systemic sclerosis (scleroderma). Relationship to platelet and endothelial cell activation. *J. Rheumatol.* **29**, 2565–2570 (2002).
60. van Bon, L. *et al.* Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 433–443 (2014).
61. Koch, A. E. & Distler, O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **9 Suppl 2**, S3 (2007).
62. Manetti, M. *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.* **109**, e14–26 (2011).
63. Asahara, T. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964–967 (1997).
64. Medina, R. J. *et al.* Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 1316–1320 (2017).
65. Grisar, J. C., Haddad, F., Gomari, F. A. & Wu, J. C. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and chronic inflammation: from biomarker to therapeutic agent. *Biomark. Med.* **5**, 731–744 (2011).
66. Menegazzo, L., Albiero, M., Avogaro, A. & Fadini, G. P. Endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *BioFactors Oxf. Engl.* **38**, 194–202 (2012).
67. Manetti, M. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. (2017).

68. Jimenez, S. A. Role of endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of the vascular alterations in systemic sclerosis. *ISRN Rheumatol.* **2013**, 835948 (2013).
69. Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. C. & Ten Dijke, P. TGF- β -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
70. Nicolosi, P. A. *et al.* Vascular Remodelling and Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis. *Stem Cells Int.* **2016**, 1–12 (2016).
71. Fleming, J. N. *et al.* Capillary regeneration in scleroderma: stem cell therapy reverses phenotype? *PLoS One* **3**, e1452 (2008).
72. Cipriani, P. *et al.* Impaired Endothelium-Mesenchymal Stem Cells Cross-talk in Systemic Sclerosis: a Link Between Vascular and Fibrotic Features. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 442 (2014).
73. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
74. Lescoat, A. *et al.* M1/M2 polarisation state of M-CSF blood-derived macrophages in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, e127–e127 (2019).
75. Kräling, B. M., Maul, G. G. & Jimenez, S. A. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* **63**, 48–56 (1995).
76. Ishikawa, O. & Ishikawa, H. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **19**, 1202–1206 (1992).
77. Seibold, J. R., Giorno, R. C. & Claman, H. N. Dermal mast cell degranulation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **33**, 1702–1709 (1990).
78. Barnes, T. C., Spiller, D. G., Anderson, M. E., Edwards, S. W. & Moots, R. J. Endothelial activation and apoptosis mediated by neutrophil-dependent interleukin 6 trans-signalling: a novel target for systemic sclerosis? *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 366–372 (2011).
79. Foerster, J. *et al.* Neutrophil respiratory burst is decreased in scleroderma and normalized by near-infrared mediated hyperthermia. *Clin. Exp. Dermatol.* **31**, 799–806 (2006).
80. Ho, Y. Y., Lagares, D., Tager, A. M. & Kapoor, M. Fibrosis--a lethal component of systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 390–402 (2014).
81. Kim, D. *et al.* Induction of interferon- α by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I: Association of higher interferon- α activity with lung fibrosis. *Arthritis Rheum.* **58**, 2163–2173 (2008).
82. Roumm, A. D., Whiteside, T. L., Medsger, T. A. J. & Rodnan, G. P. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum.* **27**, 645–653 (1984).
83. Sakkas, L. I. *et al.* Oligoclonal T Cell Expansion in the Skin of Patients with Systemic Sclerosis. *J. Immunol.* **168**, 3649–3659 (2002).
84. Wynn, T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 583–594 (2004).

85. Mavalia, C. *et al.* Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am. J. Pathol.* **151**, 1751–1758 (1997).
86. Ricard, L. *et al.* Circulating follicular helper T cells are increased in systemic sclerosis and promote plasmablast differentiation through the IL-21 pathway which can be inhibited by ruxolitinib. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 539–550 (2019).
87. Brembilla, N. C. & Chizzolini, C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. *Eur. Cytokine Netw.* **23**, 128–139 (2012).
88. Truchetet, M.-E., Brembilla, N. C., Montanari, E., Allanore, Y. & Chizzolini, C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R166 (2011).
89. Okamoto, Y. *et al.* Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis Rheum.* **64**, 3726–3735 (2012).
90. Truchetet, M.-E. *et al.* Interleukin-17A+ Cell Counts Are Increased in Systemic Sclerosis Skin and Their Number Is Inversely Correlated With the Extent of Skin Involvement. *Arthritis Rheum.* **65**, 1347–1356 (2013).
91. Hinchcliff, M. *et al.* Molecular signatures in skin associated with clinical improvement during mycophenolate treatment in systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1979–1989 (2013).
92. Mehra, S., Walker, J., Patterson, K. & Fritzler, M. J. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **12**, 340–354 (2013).
93. Elhai, M. *et al.* Outcomes of patients with systemic sclerosis treated with rituximab in contemporary practice: a prospective cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 979–987 (2019).
94. Matsushita, T. *et al.* Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum.* **54**, 192–201 (2006).
95. Taher, T. E. *et al.* Association of Defective Regulation of Autoreactive Interleukin-6-Producing Transitional B Lymphocytes With Disease in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **70**, 450–461 (2018).
96. Desallais, L. *et al.* Targeting IL-6 by both passive or active immunization strategies prevents bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R157 (2014).
97. Bhattacharyya, S., Wei, J. & Varga, J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 42–54 (2011).
98. Kirk, T. Z., Mark, M. E., Chua, C. C., Chua, B. H. & Mayes, M. D. Myofibroblasts from Scleroderma Skin Synthesize Elevated Levels of Collagen and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP-1) with Two Forms of TIMP-1. *J. Biol. Chem.* **270**, 3423–3428 (1995).
99. Manetti, M. Fli1 deficiency and beyond: a unique pathway linking peripheral vasculopathy and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Exp. Dermatol.* **24**, 256–257 (2015).

100. Svegliati, S. *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.* **280**, 36474–36482 (2005).
101. van Caam, A., Vonk, M., van den Hoogen, F., van Lent, P. & van der Kraan, P. Unraveling SSc Pathophysiology; The Myofibroblast. *Front. Immunol.* **9**, 2452 (2018).
102. Lafyatis, R. Transforming growth factor β --at the centre of systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 706–719 (2014).
103. Morse, C. *et al.* Proliferating SPP1/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **54**, 1802441 (2019).
104. Valenzi, E. *et al.* Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myofibroblasts in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 1379–1387 (2019).
105. Chang, H. Y. *et al.* Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12877–12882 (2002).
106. Abraham, D. Connective tissue growth factor: growth factor, matricellular organizer, fibrotic biomarker or molecular target for anti-fibrotic therapy in SSc? *Rheumatology* **47**, v8–v9 (2008).
107. Mori, Y., Chen, S.-J. & Varga, J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **48**, 1964–1978 (2003).
108. Servettaz, A. *et al.* [Systemic sclerosis: pathophysiology of a multifaceted disease]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 **35**, 1903–1915 (2006).
109. Hong, K.-H. *et al.* Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* **146**, 362–370 (2006).
110. Kawakami, T. *et al.* Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 47–51 (1998).
111. Kubo, M., Ihn, H., Yamane, K. & Tamaki, K. Up-regulated expression of transforming growth factor beta receptors in dermal fibroblasts in skin sections from patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* **44**, 731–734 (2001).
112. Chen, S.-J. *et al.* The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *J. Biol. Chem.* **281**, 21183–21197 (2006).
113. Bhattacharyya, S. *et al.* Smad-independent transforming growth factor-beta regulation of early growth response-1 and sustained expression in fibrosis: implications for scleroderma. *Am. J. Pathol.* **173**, 1085–1099 (2008).
114. Bhattacharyya, S. *et al.* A non-Smad mechanism of fibroblast activation by transforming growth factor-beta via c-Abl and Egr-1: selective modulation by imatinib mesylate. *Oncogene* **28**, 1285–1297 (2009).
115. Yasuoka, H. *et al.* The fibrotic phenotype induced by IGFBP-5 is regulated by MAPK activation and egr-1-dependent and -independent mechanisms. *Am. J. Pathol.* **175**, 605–615 (2009).

116. Lassègue, B. *et al.* Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ. Res.* **88**, 888–894 (2001).
117. Sturrock, A. *et al.* Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**, L661–L673 (2006).
118. Murrell, G. A., Francis, M. J. & Bromley, L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* **265**, 659–665 (1990).
119. Bellocq, A. *et al.* Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor-beta1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 128–136 (1999).
120. Bhattacharyya, S. *et al.* Tenascin-C drives persistence of organ fibrosis. *Nat. Commun.* **7**, 11703 (2016).
121. Bhattacharyya, S. *et al.* FibronectinEDA promotes chronic cutaneous fibrosis through Toll-like receptor signaling. *Sci. Transl. Med.* **6**, 232ra50 (2014).
122. Zhou, Y. *et al.* Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **123**, 1096–1108 (2013).
123. Fertin, C. *et al.* Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell. Mol. Biol.* **37**, 823–829 (1991).
124. Ong, C. J. *et al.* A role for T helper 2 cells in mediating skin fibrosis in tight-skin mice. *Cell. Immunol.* **196**, 60–68 (1999).
125. Biondi, M. L., Marasini, B., Bianchi, E. & Agostoni, A. Plasma free and intraplatelet serotonin in patients with Raynaud’s phenomenon. *Int. J. Cardiol.* **19**, 335–339 (1988).
126. Dees, C. *et al.* Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J. Exp. Med.* **208**, 961–972 (2011).
127. Koch, A. E. *et al.* In situ Expression of Cytokines and Cellular Adhesion Molecules in the Skin of Patients with Systemic Sclerosis. *Pathobiology* **61**, 239–246 (1993).
128. Needleman, B. W., Wigley, F. M. & Stair, R. W. Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor α , and Interferon- γ Levels in Sera from Patients With Scleroderma. *Arthritis Rheum.* **35**, 67–72 (1992).
129. 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.* **27**, 140–146 (2001).
130. Hasegawa, M., Sato, S., Nagaoka, T., Fujimoto, M. & Takehara, K. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. *Dermatol. Basel Switz.* **207**, 141–147 (2003).
131. Riccieri, V. *et al.* Interleukin-13 in systemic sclerosis: relationship to nailfold capillaroscopy abnormalities. *Clin. Rheumatol.* **22**, 102–106 (2003).
132. Granel, B. *et al.* Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis. *Immunogenetics* **58**, 693–699 (2006).

133. Servettaz, A. *et al.* Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. *Am. J. Pathol.* **177**, 187–196 (2010).
134. Kuroda, K. & Shinkai, H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch. Dermatol. Res.* **289**, 567–572 (1997).
135. Maurer, B. *et al.* MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **62**, 1733–1743 (2010).
136. Honda, N. *et al.* miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin beta3. *Am. J. Pathol.* **182**, 206–216 (2013).
137. Makino, K. *et al.* The downregulation of microRNA let-7a contributes to the excessive expression of type I collagen in systemic and localized scleroderma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 3905–3915 (2013).
138. Rajkumar, V. S., Sundberg, C., Abraham, D. J., Rubin, K. & Black, C. M. Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud’s phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **42**, 930–941 (1999).
139. Rajkumar, V. S. *et al.* Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R1113-1123 (2005).
140. Khanna, D. *et al.* Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2**, 11–18 (2017).
141. Denton, C. P. & Khanna, D. Systemic sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* **390**, 1685–1699 (2017).
142. Rannou, F. *et al.* Assessing disability and quality of life in systemic sclerosis: construct validities of the Cochin Hand Function Scale, Health Assessment Questionnaire (HAQ), Systemic Sclerosis HAQ, and Medical Outcomes Study 36-Item Short Form Health Survey. *Arthritis Rheum.* **57**, 94–102 (2007).
143. Magalon, G. *et al.* Regenerative Approach to Scleroderma with Fat Grafting. *Clin. Plast. Surg.* **42**, 353–364, viii–ix (2015).
144. Meier, C. *et al.* Serum metabolites as biomarkers in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Sci. Rep.* **10**, 21912 (2020).
145. Wells, A. U., Steen, V. & Valentini, G. Pulmonary complications: one of the most challenging complications of systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **48 Suppl 3**, iii40-44 (2009).
146. Bussone, G. & Mouthon, L. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **10**, 248–255 (2011).
147. Le Pavec, J., Launay, D., Mathai, S. C., Hassoun, P. M. & Humbert, M. Scleroderma lung disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **40**, 104–116 (2011).
148. Hachulla, E. *et al.* The three-year incidence of pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis in a multicenter nationwide longitudinal study in France. *Arthritis Rheum.* **60**, 1831–1839 (2009).

149. Launay, D. *et al.* Survival in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1940–1946 (2013).
150. Sitia, S. *et al.* Cardiovascular involvement in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **8**, 281–286 (2009).
151. Mouthon, L. *et al.* Scleroderma renal crisis: a rare but severe complication of systemic sclerosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **40**, 84–91 (2011).
152. Bussone, G., Bérezné, A., Pestre, V., Guillevin, L. & Mouthon, L. The scleroderma kidney: progress in risk factors, therapy, and prevention. *Curr. Rheumatol. Rep.* **13**, 37–43 (2011).
153. Gyger, G. & Baron, M. Systemic Sclerosis: Gastrointestinal Disease and Its Management. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **41**, 459–473 (2015).
154. Tiev, K. P. & Cabane, J. Digestive tract involvement in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **11**, 68–73 (2011).
155. Rosato, E. *et al.* Nutritional status measured by BMI is impaired and correlates with left ventricular mass in patients with systemic sclerosis. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **30**, 204–209 (2014).
156. Codullo, V. *et al.* Disease-related malnutrition in systemic sclerosis: evidences and implications. *Clin. Exp. Rheumatol.* **33**, S190–194 (2015).
157. Doerfler, B. *et al.* Medical Nutrition Therapy for Patients With Advanced Systemic Sclerosis (MNT PASS): A Pilot Intervention Study. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **41**, 678–684 (2017).
158. Harrison, E., Herrick, A. L., Dibb, M., McLaughlin, J. T. & Lal, S. Long-term outcome of patients with systemic sclerosis requiring home parenteral nutrition. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **34**, 991–996 (2015).
159. Stanga, Z. *et al.* Home parenteral nutrition is beneficial in systemic sclerosis patients with gastrointestinal dysfunction. *Scand. J. Rheumatol.* **45**, 32–35 (2016).
160. Clements, P. J., Allanore, Y., Khanna, D., Singh, M. & Furst, D. E. Arthritis in systemic sclerosis: systematic review of the literature and suggestions for the performance of future clinical trials in systemic sclerosis arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **41**, 801–814 (2012).
161. Czompoly, T., Simon, D., Czirjak, L. & Nemeth, P. Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **8**, 692–696 (2009).
162. Perosa, F. *et al.* Anti-centromere protein A antibodies in systemic sclerosis: Significance and origin. *Autoimmun. Rev.* **15**, 102–109 (2016).
163. Sobanski, V. *et al.* Prevalence of anti-RNA polymerase III antibodies in systemic sclerosis: New data from a French cohort and a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 407–417 (2014).
164. Cutolo, M., Pizzorni, C., Sulli, A. & Smith, V. Early Diagnostic and Predictive Value of Capillaroscopy in Systemic Sclerosis. *Curr. Rheumatol. Rev.* **9**, 249–253 (2013).
165. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* **23**, 581–590 (1980).

166. LeRoy, E. C. *et al.* Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* **15**, 202–205 (1988).
167. LeRoy, E. C. & Medsger, T. A. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **28**, 1573–1576 (2001).
168. van den Hoogen, F. *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1747–1755 (2013).
169. Scussel-Lonzetti, L. *et al.* Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore)* **81**, 154–167 (2002).
170. Wooten, M. Systemic sclerosis and malignancy: a review of the literature. *South. Med. J.* **101**, 59–62 (2008).
171. Maria, A. T. J. *et al.* Intriguing Relationships Between Cancer and Systemic Sclerosis: Role of the Immune System and Other Contributors. *Front. Immunol.* **9**, 3112 (2018).
172. Batteux, F., Kavian, N. & Servettaz, A. New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **23**, 511–518 (2011).
173. Yamamoto, T. & Nishioka, K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp. Dermatol.* **14**, 81–95 (2005).
174. Yamamoto, T. & Katayama, I. Vascular changes in bleomycin-induced scleroderma. *Int. J. Rheumatol.* **2011**, 270938 (2011).
175. Servettaz, A. *et al.* Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 5855–5864 (2009).
176. Kavian, N. *et al.* Pantethine Prevents Murine Systemic Sclerosis Through the Inhibition of Microparticle Shedding: PANTETHINE TREATS SYSTEMIC SCLEROSIS. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 1881–1890 (2015).
177. Christner, P. J., Artlett, C. M., Conway, R. F. & Jiménez, S. A. Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride. *Arthritis Rheum.* **43**, 2598–2605 (2000).
178. Gruschwitz, M. S. *et al.* Antinuclear antibody profile in UCD line 200 chickens: a model for progressive systemic sclerosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **100**, 307–313 (1993).
179. Gershwin, M. E. *et al.* Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J. Exp. Med.* **153**, 1640–1659 (1981).
180. Green, M. C., Sweet, H. O. & Bunker, L. E. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am. J. Pathol.* **82**, 493–512 (1976).
181. Christner, P. J. *et al.* A high-resolution linkage map of the tight skin 2 (Tsk2) locus: a mouse model for scleroderma (SSc) and other cutaneous fibrotic diseases. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* **7**, 610–612 (1996).

182. Maurer, B. *et al.* Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation* **120**, 2367–2376 (2009).
183. Asano, Y. *et al.* Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 425–434 (2009).
184. Wei, J. *et al.* Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum.* **63**, 1707–1717 (2011).
185. Denton, C. P. *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.* **278**, 25109–25119 (2003).
186. Skert, C. *et al.* Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, predictors and outcome. *Haematologica* **91**, 258–261 (2006).
187. Kitko, C. L., White, E. S. & Baird, K. Fibrotic and sclerotic manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **18**, S46-52 (2012).
188. Jaffee, B. D. & Claman, H. N. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell. Immunol.* **77**, 1–12 (1983).
189. Ruzek, M. C., Jha, S., Ledbetter, S., Richards, S. M. & Garman, R. D. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. *Arthritis Rheum.* **50**, 1319–1331 (2004).
190. de Boer, S. *et al.* Endothelial characteristics in healthy endothelial colony forming cells; generating a robust and valid ex vivo model for vascular disease. *J. Thromb. Haemost. JTH* **18**, 2721–2731 (2020).
191. Avouac, J. *et al.* Angiogenesis in systemic sclerosis: impaired expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in endothelial progenitor-derived cells under hypoxic conditions. *Arthritis Rheum.* **58**, 3550–3561 (2008).
192. Manetti, M. *et al.* Decreased expression of the endothelial cell-derived factor EGFL7 in systemic sclerosis: potential contribution to impaired angiogenesis and vasculogenesis. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R165 (2013).
193. Henrot, P. *et al.* Decreased CCN3 in Systemic Sclerosis Endothelial Cells Contributes to Impaired Angiogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **140**, 1427-1434.e5 (2020).
194. Gholami, S. *et al.* A Novel Insight into Endothelial and Cardiac Cells Phenotype in Systemic Sclerosis Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell. *Cell J.* **23**, 273–287 (2021).
195. Le, E. N., Wigley, F. M., Shah, A. A., Boin, F. & Hummers, L. K. Long-term experience of mycophenolate mofetil for treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1104–1107 (2011).
196. Pope, J. E. *et al.* A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* **44**, 1351–1358 (2001).

197. Panopoulos, S. T. *et al.* Mycophenolate versus cyclophosphamide for progressive interstitial lung disease associated with systemic sclerosis: a 2-year case control study. *Lung* **191**, 483–489 (2013).
198. Sircar, G., Goswami, R. P., Sircar, D., Ghosh, A. & Ghosh, P. Intravenous cyclophosphamide vs rituximab for the treatment of early diffuse scleroderma lung disease: open label, randomized, controlled trial. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **57**, 2106–2113 (2018).
199. Lam, G. K., Hummers, L. K., Woods, A. & Wigley, F. M. Efficacy and safety of etanercept in the treatment of scleroderma-associated joint disease. *J. Rheumatol.* **34**, 1636–1637 (2007).
200. 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.* **23**, 155 (2021).
201. Wollin, L. *et al.* Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **45**, 1434–1445 (2015).
202. Huang, J. *et al.* Nintedanib inhibits fibroblast activation and ameliorates fibrosis in preclinical models of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 883–890 (2016).
203. Distler, O. *et al.* Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N. Engl. J. Med.* **380**, 2518–2528 (2019).
204. Khanna, D. *et al.* Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in systemic sclerosis: results from the open-label period of a phase II randomised controlled trial (faSScinate). *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 212–220 (2018).
205. Khanna, D. *et al.* Tocilizumab in systemic sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir. Med.* **8**, 963–974 (2020).
206. Schioppa, E. *et al.* Safety and tolerability of an anti-CD19 monoclonal antibody, MEDI-551, in subjects with systemic sclerosis: a phase I, randomized, placebo-controlled, escalating single-dose study. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 131 (2016).
207. Silver, R. M. *et al.* Safety and Tolerability of Thrombin Inhibition in Scleroderma-Associated Interstitial Lung Disease. *ACR Open Rheumatol.* **1**, 403–411 (2019).
208. Lafyatis, R. *et al.* Inhibition of β -Catenin Signaling in the Skin Rescues Cutaneous Adipogenesis in Systemic Sclerosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of C-82. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 2473–2483 (2017).
209. Mantero, J. C. *et al.* Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of IL1-trap, rilonacept, in systemic sclerosis. A phase I/II biomarker trial. *Clin. Exp. Rheumatol.* **36 Suppl 113**, 146–149 (2018).
210. Fuschiotti, P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. *Cytokine* **56**, 544–549 (2011).
211. Allanore, Y. *et al.* A randomised, double-blind, placebo-controlled, 24-week, phase II, proof-of-concept study of romilkimab (SAR156597) in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **79**, 1600–1607 (2020).
212. Tofacitinib in early diffuse cutaneous systemic sclerosis—results of phase I/II investigator-initiated, double-blind randomized placebo-controlled trial. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 1–5420 (2019).

213. Rice, L. M. *et al.* Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* **125**, 2795–2807 (2015).
214. Khanna, D. *et al.* An Open-label, Phase II Study of the Safety and Tolerability of Pirfenidone in Patients with Scleroderma-associated Interstitial Lung Disease: the LOTUSS Trial. *J. Rheumatol.* **43**, 1672–1679 (2016).
215. Spiera, R. *et al.* Safety and Efficacy of Lenabasum in a Phase II, Randomized, Placebo-Controlled Trial in Adults With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* **72**, 1350–1360 (2020).
216. Spiera, R. *et al.* A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study of lenabasum in diffuse cutaneous systemic sclerosis: RESOLVE-1 design and rationale. *Clin. Exp. Rheumatol.* **39 Suppl 131**, 124–133 (2021).
217. Khanna, D. *et al.* Abatacept in Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis: Results of a Phase II Investigator-Initiated, Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **72**, 125–136 (2020).
218. Chung, L. *et al.* Safety and efficacy of abatacept in early diffuse cutaneous systemic sclerosis (ASSET): open-label extension of a phase 2, double-blind randomised trial. *Lancet Rheumatol.* **2**, e743–e753 (2020).
219. Gordon, J. K. *et al.* Belimumab for the Treatment of Early Diffuse Systemic Sclerosis: Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Trial. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 308–316 (2018).
220. Ghofrani, H.-A. *et al.* Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **369**, 330–340 (2013).
221. Khanna, D. *et al.* Riociguat in patients with early diffuse cutaneous systemic sclerosis (RISE-SSc): randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *Ann. Rheum. Dis.* **79**, 618–625 (2020).
222. Allanore, Y. *et al.* Lysophosphatidic Acid Receptor 1 Antagonist SAR100842 for Patients With Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis: A Double-Blind, Randomized, Eight-Week Placebo-Controlled Study Followed by a Sixteen-Week Open-Label Extension Study. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 1634–1643 (2018).
223. Pugnet, G. *et al.* Indications et suivi des autogreffes de cellules souches hématopoïétiques dans les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull. Cancer (Paris)* **104**, S169–S180 (2017).
224. Alexander, T. *et al.* Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* **113**, 214–223 (2009).
225. Farge, D. *et al.* Analysis of immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **52**, 1555–1563 (2005).
226. Abrahamsson, S. & Muraro, P. A. Immune re-education following autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmunity* **41**, 577–584 (2008).

227. Snowden, J. A. *et al.* Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: updated guidelines of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **47**, 770–790 (2012).
228. Baraut, J. *et al.* Peripheral blood regulatory T cells in patients with diffuse systemic sclerosis (SSc) before and after autologous hematopoietic SCT: a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* **49**, 349–354 (2014).
229. Michel, L. *et al.* Evolution of serum cytokine profile after hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients. *Bone Marrow Transplant.* **51**, 1146–1149 (2016).
230. Muraro, P. A. *et al.* Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **13**, 391–405 (2017).
231. Burt, R. K. *et al.* Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* **378**, 498–506 (2011).
232. van Laar, J. M. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA* **311**, 2490–2498 (2014).
233. Sullivan, K. M. *et al.* Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* **378**, 35–47 (2018).
234. Oliveira, M. C. *et al.* Does *ex vivo* CD34+ positive selection influence outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients? *Bone Marrow Transplant.* **51**, 501–505 (2016).
235. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230–247 (1968).
236. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F. & Keiliss-Borok, I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**, 331–340 (1974).
237. Andrzejewska, A., Lukomska, B. & Janowski, M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells* **37**, 855–864 (2019).
238. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **9**, 641–650 (1991).
239. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
240. Viswanathan, S. *et al.* Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* **21**, 1019–1024 (2019).
241. Magalon, J. *et al.* Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018. *Rev. Francoph. Lab.* **2018**, 34–43 (2018).

242. Abreu, S. C., Weiss, D. J. & Rocco, P. R. M. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: a therapeutic option in respiratory diseases? *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 53 (2016).
243. Bronckaers, A. *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* **143**, 181–196 (2014).
244. Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H.-F. & Lian, Q. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy: Current Status and Perspectives. *Cell Transplant.* **23**, 1045–1059 (2014).
245. Spees, J. L., Lee, R. H. & Gregory, C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 125 (2016).
246. Costela-Ruiz, V. J. *et al.* Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 6356 (2022).
247. Heo, J. S., Choi, Y., Kim, H.-S. & Kim, H. O. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int. J. Mol. Med.* **37**, 115–125 (2016).
248. Du, W. J. *et al.* Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 163 (2016).
249. Brown, C. *et al.* Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **13**, 1738–1755 (2019).
250. Krause, D. S. *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369–377 (2001).
251. Marquez-Curtis, L. A. & Janowska-Wieczorek, A. Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis. *BioMed Res. Int.* **2013**, 1–15 (2013).
252. Theise, N. D. On experimental design and discourse in plasticity research. *Stem Cell Rev.* **1**, 9–13 (2005).
253. Huang, K. *et al.* Conversion of bone marrow mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells reduces pulmonary fibrosis by decreasing oxidative stress in rats. *Mol. Med. Rep.* **11**, 1685–1692 (2015).
254. von Bahr, L. *et al.* Analysis of Tissues Following Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Humans Indicates Limited Long-Term Engraftment and No Ectopic Tissue Formation. *Stem Cells* **30**, 1575–1578 (2012).
255. He, A. *et al.* The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. *Can. J. Cardiol.* **25**, 353–358 (2009).
256. Kwon, S. *et al.* Anti-apoptotic Effects of Human Wharton’s Jelly-derived Mesenchymal Stem Cells on Skeletal Muscle Cells Mediated via Secretion of XCL1. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **24**, 1550–1560 (2016).

257. Imberti, B. *et al.* Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **18**, 2921–2928 (2007).
258. Rehman, J. *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292–1298 (2004).
259. Nakagami, H. *et al.* Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2542–2547 (2005).
260. Planat-Benard, V. *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656–663 (2004).
261. Bai, K., Huang, Y., Jia, X., Fan, Y. & Wang, W. Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations. *J. Biomech.* **43**, 1176–1181 (2010).
262. De Luca, A. *et al.* Role of the EGFR ligand/receptor system in the secretion of angiogenic factors in mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* **226**, 2131–2138 (2011).
263. Crisostomo, P. R. *et al.* Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **294**, C675-682 (2008).
264. Potapova, I. A. *et al.* Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 1761–1768 (2007).
265. Gruber, R. *et al.* Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng.* **11**, 896–903 (2005).
266. Duffy, G. P., Ahsan, T., O'Brien, T., Barry, F. & Nerem, R. M. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Angiogenic Processes in a Time- and Dose-Dependent Manner *In Vitro*. *Tissue Eng. Part A* **15**, 2459–2470 (2009).
267. Au, P., Tam, J., Fukumura, D. & Jain, R. K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* **111**, 4551–4558 (2008).
268. Liew, A. & O'Brien, T. Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia. *Stem Cell Res. Ther.* **3**, 28 (2012).
269. Han, K.-H., Kim, A.-K. & Kim, D. Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells for Treating Ischemic Limb Diseases. *Int. J. Stem Cells* **9**, 163–168 (2016).
270. Ma, X. *et al.* Human mesenchymal stem cells increases expression of α -tubulin and angiopoietin 1 and 2 in focal cerebral ischemia and reperfusion. *Curr. Neurovasc. Res.* **10**, 103–111 (2013).
271. Miyahara, Y. *et al.* Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.* **12**, 459–465 (2006).
272. Ni, K. *et al.* PD-1/PD-L1 Pathway Mediates the Alleviation of Pulmonary Fibrosis by Human Mesenchymal Stem Cells in Humanized Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **58**, 684–695 (2018).

273. Donizetti-Oliveira, C. *et al.* Adipose tissue-derived stem cell treatment prevents renal disease progression. *Cell Transplant.* **21**, 1727–1741 (2012).
274. Wu, Y. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int. Wound J.* **11**, 701–710 (2014).
275. Horton, J. A. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation. *Stem Cells Dayt. Ohio* **31**, 2231–2241 (2013).
276. Chen, W. *et al.* Adipose tissue-derived stem cells ameliorates dermal fibrosis in a mouse model of scleroderma. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **10**, 52–56 (2017).
277. Okamura, A. *et al.* Adipose-derived stromal/stem cells successfully attenuate the fibrosis of scleroderma mouse models. *Int. J. Rheum. Dis.* **23**, 216–225 (2020).
278. Maria, A. T. J. *et al.* Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *J. Autoimmun.* **70**, 31–39 (2016).
279. Maria, A. T. J. *et al.* Antifibrotic, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in HOCl-Induced Systemic Sclerosis: MESENCHYMAL STEM CELLS IN MURINE SSc. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 1013–1025 (2016).
280. Maria, A. T. J. *et al.* Fibrosis Development in HOCl-Induced Systemic Sclerosis: A Multistage Process Hampered by Mesenchymal Stem Cells. *Front. Immunol.* **9**, 2571 (2018).
281. Rozier, P. *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.* **22**, 6837 (2021).
282. Fang, S. *et al.* Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal MicroRNAs Suppress Myofibroblast Differentiation by Inhibiting the Transforming Growth Factor- β /SMAD2 Pathway During Wound Healing. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 1425–1439 (2016).
283. Shao, L. *et al.* MiRNA-Sequence Indicates That Mesenchymal Stem Cells and Exosomes Have Similar Mechanism to Enhance Cardiac Repair. *BioMed Res. Int.* **2017**, 4150705 (2017).
284. Rozier, P. *et al.* Mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles alleviate systemic sclerosis via miR-29a-3p. *J. Autoimmun.* **121**, 102660 (2021).
285. Rozier, P. *et al.* Lung Fibrosis Is Improved by Extracellular Vesicles from IFN γ -Primed Mesenchymal Stromal Cells in Murine Systemic Sclerosis. *Cells* **10**, 2727 (2021).
286. Le Blanc, K. *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet Lond. Engl.* **363**, 1439–1441 (2004).
287. Bartholomew, A. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* **30**, 42–48 (2002).
288. Nauta, A. J. & Fibbe, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110**, 3499–3506 (2007).
289. Mohammadpour, H., Pourfathollah, A. A., Zarif, M. N. & Tahoori, M. T. TNF- α modulates the immunosuppressive effects of MSCs on dendritic cells and T cells. *Int. Immunopharmacol.* **28**, 1009–1017 (2015).

290. Rosado, M. M. *et al.* Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells Dev.* **24**, 93–103 (2015).
291. Beyth, S. *et al.* Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* **105**, 2214–2219 (2005).
292. Pittenger, M. F. *et al.* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *Npj Regen. Med.* **4**, 22 (2019).
293. Hwu, P. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 3596–3599 (2000).
294. Spaggiari, G. M. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* **111**, 1327–1333 (2008).
295. DelaRosa, O. *et al.* Requirement of IFN- γ -Mediated Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in the Modulation of Lymphocyte Proliferation by Human Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng. Part A* **15**, 2795–2806 (2009).
296. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–1822 (2005).
297. Akiyama, K. *et al.* Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* **10**, 544–555 (2012).
298. Di Nicola, M. *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838–3843 (2002).
299. Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C. & Guinan, E. C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* **75**, 389–397 (2003).
300. Selmani, Z. *et al.* Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4+CD25highFOXP3+ Regulatory T Cells. *Stem Cells* **26**, 212–222 (2008).
301. Terraza-Aguirre, C. *et al.* Mechanisms behind the Immunoregulatory Dialogue between Mesenchymal Stem Cells and Th17 Cells. *Cells* **9**, 1660 (2020).
302. Krampera, M. Mesenchymal stromal cells: more than inhibitory cells. *Leukemia* **25**, 565–566 (2011).
303. Krampera, M. Mesenchymal stromal cell ‘licensing’: a multistep process. *Leukemia* **25**, 1408–1414 (2011).
304. Galipeau, J. *et al.* International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy* **18**, 151–159 (2016).
305. Bernardo, M. E. & Fibbe, W. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* **13**, 392–402 (2013).

306. Cosenza, S. *et al.* Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics* **8**, 1399–1410 (2018).
307. Jackson, M. V. *et al.* Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells* **34**, 2210–2223 (2016).
308. Cheung, T. S., Galleu, A., von Bonin, M., Bornhäuser, M. & Dazzi, F. Apoptotic mesenchymal stromal cells induce prostaglandin E2 in monocytes: implications for the monitoring of mesenchymal stromal cell activity. *Haematologica* **104**, e438–e441 (2019).
309. Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 383–396 (2012).
310. Usunier, B., Benderitter, M., Tamarat, R. & Chapel, A. Management of Fibrosis: The Mesenchymal Stromal Cells Breakthrough. *Stem Cells Int.* **2014**, 1–26 (2014).
311. Guiducci, S. *et al.* Autologous mesenchymal stem cells foster revascularization of ischemic limbs in systemic sclerosis: a case report. *Ann. Intern. Med.* **153**, 650–654 (2010).
312. Christopeit, M. *et al.* Marked improvement of severe progressive systemic sclerosis after transplantation of mesenchymal stem cells from an allogeneic haploidentical-related donor mediated by ligation of CD137L. *Leukemia* **22**, 1062–1064 (2008).
313. Keyszer, G. *et al.* Treatment of severe progressive systemic sclerosis with transplantation of mesenchymal stromal cells from allogeneic related donors: report of five cases. *Arthritis Rheum.* **63**, 2540–2542 (2011).
314. Zhang, H. *et al.* Sustained benefit from combined plasmapheresis and allogeneic mesenchymal stem cells transplantation therapy in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 165 (2017).
315. Szekanecz, Z. *et al.* Combined plasmapheresis and high-dose intravenous immunoglobulin treatment in systemic sclerosis for 12 months: follow-up of immunopathological and clinical effects. *Clin. Rheumatol.* **28**, 347–350 (2009).
316. Szúcs, G., Szamosi, S., Aleksza, M., Veres, K. & Soltész, P. [Plasmapheresis therapy in systemic sclerosis]. *Orv. Hetil.* **144**, 2213–2217 (2003).
317. Farge, D. *et al.* Safety and preliminary efficacy of allogeneic bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells for systemic sclerosis: a single-centre, open-label, dose-escalation, proof-of-concept, phase 1/2 study. *Lancet Rheumatol.* **4**, e91–e104 (2022).
318. Liang, J. *et al.* Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 312 (2018).
319. Farge, D. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. *Haematologica* **95**, 284–292 (2010).

320. Scuderi, N. *et al.* Human Adipose-Derived Stromal Cells for Cell-Based Therapies in the Treatment of Systemic Sclerosis. *Cell Transplant.* **22**, 779–795 (2013).
321. Onesti, M. G. *et al.* Improvement of Mouth Functional Disability in Systemic Sclerosis Patients over One Year in a Trial of Fat Transplantation versus Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem Cells Int.* **2016**, 2416192 (2016).
322. van Rhijn-Brouwer, F. C. C. *et al.* A randomised placebo-controlled double-blind trial to assess the safety of intramuscular administration of allogeneic mesenchymal stromal cells for digital ulcers in systemic sclerosis: the MANUS Trial protocol. *BMJ Open* **8**, e020479 (2018).
323. Mebarki, M., Abadie, C., Larghero, J. & Cras, A. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products. *Stem Cell Res. Ther.* **12**, 152 (2021).
324. Yin, J. Q., Zhu, J. & Ankrum, J. A. Manufacturing of primed mesenchymal stromal cells for therapy. *Nat. Biomed. Eng.* **3**, 90–104 (2019).
325. Kumamoto, M., Nishiwaki, T., Matsuo, N., Kimura, H. & Matsushima, K. Minimally cultured bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate fibrotic lung injury. *Eur. Respir. J.* **34**, 740–748 (2009).
326. François, M. *et al.* Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy* **14**, 147–152 (2012).
327. Dave, C. *et al.* Comparison of freshly cultured versus cryopreserved mesenchymal stem cells in animal models of inflammation: A pre-clinical systematic review. *eLife* **11**, e75053 (2022).
328. Wang, Y., Chen, X., Cao, W. & Shi, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat. Immunol.* **15**, 1009–1016 (2014).
329. Rozier, P. *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Systemic Sclerosis: Allogenic or Autologous Approaches for Therapeutic Use? *Front. Immunol.* **9**, 2938 (2018).
330. Trivedi, A. *et al.* Bone marrow donor selection and characterization of MSCs is critical for pre-clinical and clinical cell dose production. *J. Transl. Med.* **17**, 128 (2019).
331. François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M. & Galipeau, J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **20**, 187–195 (2012).
332. Chinnadurai, R. *et al.* Potency Analysis of Mesenchymal Stromal Cells Using a Combinatorial Assay Matrix Approach. *Cell Rep.* **22**, 2504–2517 (2018).
333. Bloom, D. D. *et al.* A reproducible immunopotency assay to measure mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression. *Cytotherapy* **17**, 140–151 (2015).
334. Nicotra, T. *et al.* Mesenchymal stem/stromal cell quality control: validation of mixed lymphocyte reaction assay using flow cytometry according to ICH Q2(R1). *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 426 (2020).

335. Lan, Y.-W. *et al.* Oncostatin M-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Alleviate Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis Through Paracrine Effects of the Hepatocyte Growth Factor. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 1006–1017 (2017).
336. Wang, Q. *et al.* N-Acetylcysteine-Pretreated Human Embryonic Mesenchymal Stem Cell Administration Protects Against Bleomycin-Induced Lung Injury. *Am. J. Med. Sci.* **346**, 113–122 (2013).
337. Anderson, J. D. *et al.* Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling. *Stem Cells Dayt. Ohio* **34**, 601–613 (2016).
338. Filho, D. M. *et al.* Enhancing the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells with the CRISPR-Cas System. *Stem Cell Rev. Rep.* **15**, 463–473 (2019).
339. Levy, O. *et al.* Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Sci. Adv.* **6**, eaba6884 (2020).
340. Sethi, J. K. & Vidal-Puig, A. J. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res.* **48**, 1253–1262 (2007).
341. Gesta, S., Tseng, Y.-H. & Kahn, C. R. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* **131**, 242–256 (2007).
342. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
343. Gesta, S. *et al.* Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 6676–6681 (2006).
344. Ghaben, A. L. & Scherer, P. E. Adipogenesis and metabolic health. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 242–258 (2019).
345. Avram, A. S., Avram, M. M. & James, W. D. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**, 671–683 (2005).
346. Ramsay, T. G. Fat cells. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **25**, 847–870 (1996).
347. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
348. Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26746–26749 (1995).
349. Ahima, R. S. & Lazar, M. A. Adipokines and the Peripheral and Neural Control of Energy Balance. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1023–1031 (2008).
350. Maeda, N. *et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* **8**, 731–737 (2002).
351. Fang, H. & Judd, R. L. Adiponectin Regulation and Function. in *Comprehensive Physiology* (ed. Terjung, R.) 1031–1063 (Wiley, 2018).

352. Yang, R.-Z. *et al.* Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **290**, E1253–E1261 (2006).
353. Fasshauer, M. & Blüher, M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 461–470 (2015).
354. Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C. & Lima, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J. Pediatr. (Rio J.)* **83**, S192-203 (2007).
355. Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F. J. & Burrell, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E827-847 (2001).
356. Mohamed-Ali, V., Pinkney, J. H. & Coppack, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **22**, 1145–1158 (1998).
357. Trayhurn, P. & Beattie, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* **60**, 329–339 (2001).
358. Crandall, D. L., Hausman, G. J. & Kral, J. G. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirc. N. Y. N* **1994** **4**, 211–232 (1997).
359. Brakenhielm, E. *et al.* Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ. Res.* **94**, 1579–1588 (2004).
360. Neels, J. G., Thinnes, T. & Loskutoff, D. J. Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 983–985 (2004).
361. Rupnick, M. A. *et al.* Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10730–10735 (2002).
362. Aoki, S., Toda, S., Sakemi, T. & Sugihara, H. Coculture of endothelial cells and mature adipocytes actively promotes immature preadipocyte development in vitro. *Cell Struct. Funct.* **28**, 55–60 (2003).
363. Hutley, L. J. *et al.* Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**, E1037-1044 (2001).
364. Varzaneh, F. E., Shillabeer, G., Wong, K. L. & Lau, D. C. Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation in vitro. *Metabolism.* **43**, 906–912 (1994).
365. Ledoux, S. *et al.* Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes* **57**, 3247–3257 (2008).
366. di Somma, M. *et al.* Role of VEGFs in metabolic disorders. *Angiogenesis* **23**, 119–130 (2020).
367. Zhang, Q. X. *et al.* Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J. Surg. Res.* **67**, 147–154 (1997).
368. Liekens, S., De Clercq, E. & Neyts, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 253–270 (2001).

369. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D. J., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661–671 (2000).
370. Bouloumie, A., Sengenès, C., Portolan, G., Galitzky, J. & Lafontan, M. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* **50**, 2080–2086 (2001).
371. Park, H. Y. *et al.* Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp. Mol. Med.* **33**, 95–102 (2001).
372. Cao, R., Brakenhielm, E., Wahlestedt, C., Thyberg, J. & Cao, Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6390–6395 (2001).
373. Bastelica, D. *et al.* Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 173–178 (2002).
374. Crandall, D. L., Groeling, T. M., Busler, D. E. & Antrilli, T. M. Release of PAI-1 by human preadipocytes and adipocytes independent of insulin and. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 984–988 (2000).
375. Pepper, M. S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1104–1117 (2001).
376. Verseijden, F. *et al.* Angiogenic capacity of human adipose-derived stromal cells during adipogenic differentiation: an in vitro study. *Tissue Eng. Part A* **15**, 445–452 (2009).
377. Thomas, M. & Augustin, H. G. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* **12**, 125–137 (2009).
378. Thurston, G. *et al.* Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.* **6**, 460–463 (2000).
379. Carlson, T. R., Feng, Y., Maisonpierre, P. C., Mrksich, M. & Morla, A. O. Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J. Biol. Chem.* **276**, 26516–26525 (2001).
380. Fiedler, U. *et al.* The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* **103**, 4150–4156 (2004).
381. Fukuhara, S. *et al.* Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol. Histopathol.* **25**, 387–396 (2010).
382. Bell, L. N. *et al.* Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**, E843–848 (2006).
383. Nakamura, Y. *et al.* Expression of local hepatocyte growth factor system in vascular tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 483–488 (1995).
384. Van Belle, E. *et al.* Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* **97**, 381–390 (1998).

385. Teichert-Kuliszewska, K., Hamilton, B. S., Deitel, M. & Roncari, D. A. Augmented production of heparin-binding mitogenic proteins by preadipocytes from massively obese persons. *J. Clin. Invest.* **90**, 1226–1231 (1992).
386. Goto, F., Goto, K., Weindel, K. & Folkman, J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **69**, 508–517 (1993).
387. Tatemoto, K. *et al.* Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 471–476 (1998).
388. Cheng, J., Luo, X., Huang, Z. & Chen, L. Apelin/APJ system: A potential therapeutic target for endothelial dysfunction-related diseases. *J. Cell. Physiol.* **234**, 12149–12160 (2019).
389. Wysocka, M. B., Pietraszek-Gremplewicz, K. & Nowak, D. The Role of Apelin in Cardiovascular Diseases, Obesity and Cancer. *Front. Physiol.* **9**, 557 (2018).
390. Kälin, R. E. *et al.* Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev. Biol.* **305**, 599–614 (2007).
391. Cox, C. M., D’Agostino, S. L., Miller, M. K., Heimark, R. L. & Krieg, P. A. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev. Biol.* **296**, 177–189 (2006).
392. Yoder, M. C. *et al.* Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* **109**, 1801–1809 (2007).
393. Mund, J. A., Estes, M. L., Yoder, M. C., Ingram, D. A. & Case, J. Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1045–1053 (2012).
394. Psaltis, P. J. & Simari, R. D. Vascular wall progenitor cells in health and disease. *Circ. Res.* **116**, 1392–1412 (2015).
395. Zengin, E. *et al.* Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* **133**, 1543–1551 (2006).
396. Ergün, S., Hohn, H.-P., Kilic, N., Singer, B. B. & Tilki, D. Endothelial and Hematopoietic Progenitor Cells (EPCs and HPCs): Hand in Hand Fate Determining Partners for Cancer Cells. *Stem Cell Rev.* **4**, 169–177 (2008).
397. Yoder, M. C. Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1094–1103 (2010).
398. Banno, K. & Yoder, M. C. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair. *Pediatr. Res.* **83**, 283–290 (2018).
399. Poissonnet, C. M., Burdi, A. R. & Garn, S. M. The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum. Dev.* **10**, 1–11 (1984).
400. Poissonnet, C. M., Burdi, A. R. & Bookstein, F. L. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum. Dev.* **8**, 1–11 (1983).
401. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).

402. Farmer, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* **4**, 263–273 (2006).
403. Gupta, R. K. *et al.* Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* **464**, 619–623 (2010).
404. Shao, M. *et al.* Fetal development of subcutaneous white adipose tissue is dependent on Zfp423. *Mol. Metab.* **6**, 111–124 (2017).
405. Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147–1156 (1994).
406. Barak, Y. *et al.* PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* **4**, 585–595 (1999).
407. Plikus, M. V. *et al.* Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* **355**, 748–752 (2017).
408. Marangoni, R. G. *et al.* Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**, 1062–1073 (2015).
409. Medici, D. *et al.* Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat. Med.* **16**, 1400–1406 (2010).
410. Frontini, A., Giordano, A. & Cinti, S. Endothelial cells of adipose tissues: a niche of adipogenesis. *Cell Cycle Georget. Tex* **11**, 2765–2766 (2012).
411. Gil, A., Olza, J., Gil-Campos, M., Gomez-Llorente, C. & Aguilera, C. M. Is adipose tissue metabolically different at different sites? *Int. J. Pediatr. Obes.* **6**, 13–20 (2011).
412. Hauner, H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol. Behav.* **83**, 653–658 (2004).
413. Bank, J., Fuller, S. M., Henry, G. I. & Zachary, L. S. Fat grafting to the hand in patients with Raynaud phenomenon: a novel therapeutic modality. *Plast. Reconstr. Surg.* **133**, 1109–1118 (2014).
414. Del Papa, N. *et al.* Regional implantation of autologous adipose tissue-derived cells induces a prompt healing of long-lasting indolent digital ulcers in patients with systemic sclerosis. *Cell Transplant.* **24**, 2297–2305 (2015).
415. Bene, M. *et al.* Autologous Fat Grafting for Scleroderma-Induced Digital Ulcers. An Effective Technique in Patients with Systemic Sclerosis. *Handchir. · Mikrochir. · Plast. Chir.* **46**, 242–247 (2014).
416. Del Papa, N. *et al.* Regional grafting of autologous adipose tissue is effective in inducing prompt healing of indolent digital ulcers in patients with systemic sclerosis: results of a monocentric randomized controlled study. *Arthritis Res. Ther.* **21**, 7 (2019).
417. Consorti, G., Tieghi, R. & Clauser, L. C. Frontal linear scleroderma: long-term result in volumetric restoration of the fronto-orbital area by structural fat grafting. *J. Craniofac. Surg.* **23**, e263–265 (2012).
418. Roh, M. R., Jung, J. Y. & Chung, K. Y. Autologous fat transplantation for depressed linear scleroderma-induced facial atrophic scars. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. AI* **34**, 1659–1665 (2008).

419. Del Papa, N. *et al.* Autologous fat grafting in the treatment of fibrotic perioral changes in patients with systemic sclerosis. *Cell Transplant.* **24**, 63–72 (2015).
420. Sautereau, N. *et al.* Efficacy of Autologous Microfat Graft on Facial Handicap in Systemic Sclerosis Patients. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open* **4**, e660 (2016).
421. Gheisari, M., Ahmadzadeh, A., Nobari, N., Iranmanesh, B. & Mozafari, N. Autologous Fat Grafting in the Treatment of Facial Scleroderma. *Dermatol. Res. Pract.* **2018**, 1–7 (2018).
422. Almadori, A. *et al.* Stem cell enriched lipotransfer reverses the effects of fibrosis in systemic sclerosis. *PLoS One* **14**, e0218068 (2019).
423. Berl, A. *et al.* Total Facial Autologous Fat Grafting for Treating Skin Manifestations in Scleroderma. *Life* **12**, 1997 (2022).
424. Strong, A. L., Adidharma, W., Brown, O. H. & Cederna, P. S. Fat Grafting Subjectively Improves Facial Skin Elasticity and Hand Function of Scleroderma Patients. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open* **9**, e3373 (2021).
425. Pignatti, M. *et al.* Autologous Fat Grafting for the Oral and Digital Complications of Systemic Sclerosis: Results of a Prospective Study. *Aesthetic Plast. Surg.* **44**, 1820–1832 (2020).
426. Jeon, F. H. K., Griffin, M., Denton, C. P. & Butler, P. E. M. Feasibility study of stem-cell enriched autologous lipotransfer to treat oro-facial fibrosis in systemic sclerosis (Sys-System): Protocol for open-label randomised controlled trial. *Int. J. Surg. Protoc.* **23**, 6–10 (2020).
427. Virzì, F. *et al.* Combined platelet-rich plasma and lipofilling treatment provides great improvement in facial skin-induced lesion regeneration for scleroderma patients. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 236 (2017).
428. Philandrianos, C. *et al.* Combined PRP and microfat graft for facial disability in systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord* **2**, 7–11 (2017).
429. Abellan Lopez, M. *et al.* Assessing the effect of PRP addition to facial micro-lipofilling for patients suffering from Scleroderma: A prospective routine care analysis. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* S0294-1260(22)00118–2 (2022)
430. Zuk, P. A. *et al.* Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–228 (2001).
431. Corvera, S. Cellular Heterogeneity in Adipose Tissues. *Annu. Rev. Physiol.* **83**, 257–278 (2021).
432. Markarian, C. F. *et al.* Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnol. Lett.* **36**, 693–702 (2014).
433. Bourin, P. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **15**, 641–648 (2013).
434. François, P. *et al.* Inter-center comparison of good manufacturing practices-compliant stromal vascular fraction and proposal for release acceptance criteria: a review of 364 productions. *Stem Cell Res. Ther.* **12**, 373 (2021).

435. Szöke, K., Reinisch, A., Østrup, E., Reinholt, F. P. & Brinchmann, J. E. Autologous cell sources in therapeutic vasculogenesis: In vitro and in vivo comparison of endothelial colony-forming cells from peripheral blood and endothelial cells isolated from adipose tissue. *Cytotherapy* **18**, 242–252 (2016).
436. Lin, R.-Z. *et al.* Human white adipose tissue vasculature contains endothelial colony-forming cells with robust in vivo vasculogenic potential. *Angiogenesis* **16**, 735–744 (2013).
437. Szöke, K., Beckstrøm, K. J. & Brinchmann, J. E. Human Adipose Tissue as a Source of Cells with Angiogenic Potential. *Cell Transplant.* **21**, 235–250 (2012).
438. Saito, N. *et al.* Purification and characterization of human adipose-resident microvascular endothelial progenitor cells. *Sci. Rep.* **12**, 1775 (2022).
439. Zhu, X., Shi, W., Tai, W. & Liu, F. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* **350**, 277–287 (2012).
440. Traktuev, D. O. *et al.* Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ. Res.* **104**, 1410–1420 (2009).
441. Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S. & Hopkinson, A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells Dayt. Ohio* **32**, 1380–1389 (2014).
442. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinkas, A., Slaby, O. & Michalek, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* **21**, 2724–2752 (2012).
443. Noël, D. *et al.* Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp. Cell Res.* **314**, 1575–1584 (2008).
444. Li, C. *et al.* Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 55 (2015).
445. Díaz-Flores, L. *et al.* Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol. Histopathol.* **24**, 909–969 (2009).
446. Traktuev, D. O. *et al.* A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* **102**, 77–85 (2008).
447. Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A. & Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 630–638 (2009).
448. Eilken, H. M. *et al.* Pericytes regulate VEGF-induced endothelial sprouting through VEGFR1. *Nat. Commun.* **8**, 1574 (2017).
449. Farrington-Rock, C. *et al.* Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* **110**, 2226–2232 (2004).

450. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313 (2008).
451. Zimmerlin, L., Donnenberg, V. S., Rubin, J. P. & Donnenberg, A. D. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **83**, 134–140 (2013).
452. Cho, K. W., Morris, D. L. & Lumeng, C. N. Flow cytometry analyses of adipose tissue macrophages. *Methods Enzymol.* **537**, 297–314 (2014).
453. Astori, G. *et al.* ‘In vitro’ and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J. Transl. Med.* **5**, 55 (2007).
454. Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B. & Ley, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.* **10**, 1084 (2019).
455. Eto, H. *et al.* Characterization of human adipose tissue-resident hematopoietic cell populations reveals a novel macrophage subpopulation with CD34 expression and mesenchymal multipotency. *Stem Cells Dev.* **22**, 985–997 (2013).
456. Navarro, A., Marín, S., Riol, N., Carbonell-Uberos, F. & Miñana, M. D. Human adipose tissue-resident monocytes exhibit an endothelial-like phenotype and display angiogenic properties. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 50 (2014).
457. Wanjalla, C. N., McDonnell, W. J. & Koethe, J. R. Adipose Tissue T Cells in HIV/SIV Infection. *Front. Immunol.* **9**, 2730 (2018).
458. Guo, J. *et al.* Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **69**, 180–188 (2016).
459. Fu, S. *et al.* Fate of adipose-derived stromal vascular fraction cells after co-implantation with fat grafts: evidence of cell survival and differentiation in ischemic adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* **132**, 363–373 (2013).
460. Han, S.-K., Kim, H.-R. & Kim, W.-K. The treatment of diabetic foot ulcers with uncultured, processed lipoaspirate cells: a pilot study. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **18**, 342–348 (2010).
461. Atalay, S., Coruh, A. & Deniz, K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* **40**, 1375–1383 (2014).
462. Mytsyk, M. *et al.* Paracrine potential of adipose stromal vascular fraction cells to recover hypoxia-induced loss of cardiomyocyte function. *Biotechnol. Bioeng.* **116**, 132–142 (2019).
463. van Boxtel, J., Vonk, L. A., Stevens, H. P. & van Dongen, J. A. Mechanically Derived Tissue Stromal Vascular Fraction Acts Anti-inflammatory on TNF Alpha-Stimulated Chondrocytes In Vitro. *Bioengineering* **9**, 345 (2022).
464. Ramakrishnan, V. M. & Boyd, N. L. The Adipose Stromal Vascular Fraction as a Complex Cellular Source for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* **24**, 289–299 (2018).

465. Zakhari, J. S., Zabonick, J., Gettler, B. & Williams, S. K. Vasculogenic and angiogenic potential of adipose stromal vascular fraction cell populations in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **54**, 32–40 (2018).
466. Koh, Y. J. *et al.* Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1141–1150 (2011).
467. Nunes, S. S. *et al.* Generation of a functional liver tissue mimic using adipose stromal vascular fraction cell-derived vasculatures. *Sci. Rep.* **3**, 2141 (2013).
468. Harada, Y. *et al.* Transplantation of freshly isolated adipose tissue-derived regenerative cells enhances angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* **34**, 23–29 (2013).
469. Bora, P. & Majumdar, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 145 (2017).
470. Poitevin, S. *et al.* Sphingosine kinase 1 expressed by endothelial colony-forming cells has a critical role in their revascularization activity. *Cardiovasc. Res.* **103**, 121–130 (2014).
471. Cai, J., Feng, J., Liu, K., Zhou, S. & Lu, F. Early Macrophage Infiltration Improves Fat Graft Survival by Inducing Angiogenesis and Hematopoietic Stem Cell Recruitment. *Plast. Reconstr. Surg.* **141**, 376–386 (2018).
472. Feuerer, M. *et al.* Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* **15**, 930–939 (2009).
473. Semon, J. A. *et al.* Administration of murine stromal vascular fraction ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 789–796 (2013).
474. Domergue, S. *et al.* Comparison between Stromal Vascular Fraction and Adipose Mesenchymal Stem Cells in Remodeling Hypertrophic Scars. *PLoS One* **11**, e0156161 (2016).
475. Serratrice, N. *et al.* New fat-derived products for treating skin-induced lesions of scleroderma in nude mice. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 138 (2014).
476. Rigotti, G. *et al.* Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.* **119**, 1409–22; discussion 1423–1424 (2007).
477. Granel, B. *et al.* Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 2175–2182 (2015).
478. Guillaume-Jugnot, P. *et al.* Autologous adipose-derived stromal vascular fraction in patients with systemic sclerosis: 12-month follow-up. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **55**, 301–306 (2016).
479. Daumas, A. *et al.* Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. *Curr. Res. Transl. Med.* **65**, 40–43 (2017).

480. Park, Y. *et al.* Clinical Efficacy and Safety of Injection of Stromal Vascular Fraction Derived from Autologous Adipose Tissues in Systemic Sclerosis Patients with Hand Disability: A Proof-Of-Concept Trial. *J. Clin. Med.* **9**, E3023 (2020).
481. Khanna, D. *et al.* Adipose-Derived Regenerative Cell Transplantation for the Treatment of Hand Dysfunction in Systemic Sclerosis: A Randomized Clinical Trial. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **74**, 1399–1408 (2022).
482. Daumas, A. *et al.* Adipose tissue-derived stromal vascular fraction for treating hands of patients with systemic sclerosis: a multicentre randomized trial Autologous AD-SVF versus placebo in systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **61**, 1936–1947 (2022).
483. Kuwana, M., Okazaki, Y., Yasuoka, H., Kawakami, Y. & Ikeda, Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* **364**, 603–610 (2004).
484. Andrigueti, F. V., Arismendi, M. I., Ebbing, P. C. C. & Kayser, C. Decreased numbers of endothelial progenitor cells in patients in the early stages of systemic sclerosis. *Microvasc. Res.* **98**, 82–87 (2015).
485. Zhu, S. *et al.* Transcriptional regulation of Bim by FOXO3a and Akt mediates scleroderma serum-induced apoptosis in endothelial progenitor cells. *Circulation* **118**, 2156–2165 (2008).
486. Patschan, S. *et al.* Early Endothelial Progenitor Cells (eEPCs) in systemic sclerosis (SSc) - dynamics of cellular regeneration and mesenchymal transdifferentiation. *BMC Musculoskelet. Disord.* **17**, 339 (2016).
487. Mok, M. Y. *et al.* Low circulating level of CD133+KDR+cells in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **28**, S19-25 (2010).
488. Avouac, J. *et al.* Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1455–1460 (2008).
489. Allanore, Y. *et al.* Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **25**, 60–66 (2007).
490. Del Papa, N. & Pignataro, F. The Role of Endothelial Progenitors in the Repair of Vascular Damage in Systemic Sclerosis. *Front. Immunol.* **9**, 1383 (2018).
491. Distler, J. H. W. *et al.* EULAR Scleroderma Trials and Research group statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 163–168 (2009).
492. Del Papa, N. *et al.* Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **54**, 2605–2615 (2006).
493. Kuwana, M. & Okazaki, Y. Brief Report: Impaired In Vivo Neovascularization Capacity of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Systemic Sclerosis: Impaired EPC Function in SSc. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 1300–1305 (2014).
494. Shirai, Y. *et al.* Elevated Levels of Pentraxin 3 in Systemic Sclerosis: Associations With Vascular Manifestations and Defective Vasculogenesis. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 498–507 (2015).
495. Romano, E. *et al.* Decreased expression of neuropilin-1 as a novel key factor contributing to peripheral microvasculopathy and defective angiogenesis in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1541–1549 (2016).

496. Larghero, J. *et al.* Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 443–449 (2008).
497. Cipriani, P. *et al.* Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: New insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **56**, 1994–2004 (2007).
498. Guiducci, S. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis in vitro. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 2011–2021 (2011).
499. Cipriani, P. *et al.* Mesenchymal stem cells (MSCs) from scleroderma patients (SSc) preserve their immunomodulatory properties although senescent and normally induce T regulatory cells (Tregs) with a functional phenotype: implications for cellular-based therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **173**, 195–206 (2013).
500. Akiyama, K. *et al.* Mesenchymal-Stem-Cell-Induced Immunoregulation Involves FAS-Ligand-/FAS-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Stem Cell* **10**, 544–555 (2012).
501. Bocelli-Tyndall, C. *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. *Rheumatology* **46**, 403–408 (2007).
502. Vanneaux, V. *et al.* Expression of transforming growth factor β receptor II in mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients. *BMJ Open* **3**, e001890 (2013).
503. Cipriani, P. *et al.* Scleroderma Mesenchymal Stem Cells display a different phenotype from healthy controls; implications for regenerative medicine. *Angiogenesis* **16**, 595–607 (2013).
504. Fonteneau, G. *et al.* Serum-Mediated Oxidative Stress from Systemic Sclerosis Patients Affects Mesenchymal Stem Cell Function. *Front. Immunol.* **8**, 988 (2017).
505. Manetti, M. *et al.* Systemic Sclerosis Serum Steers the Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells Toward Profibrotic Myofibroblasts: Pathophysiologic Implications. *J. Clin. Med.* **8**, 1256 (2019).
506. Scuderi, N. *et al.* Human adipose-derived stromal cells for cell-based therapies in the treatment of systemic sclerosis. *Cell Transplant.* **22**, 779–795 (2013).
507. Griffin, M. *et al.* Characteristics of human adipose derived stem cells in scleroderma in comparison to sex and age matched normal controls: implications for regenerative medicine. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 23 (2017).
508. Kuca-Warnawin, E. *et al.* The Phenotype and Secretory Activity of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) of Patients with Rheumatic Diseases. *Cells* **8**, 1659 (2019).
509. Capelli, C. *et al.* Phenotypical and Functional Characteristics of in Vitro-Expanded Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Systemic Sclerosis. *Cell Transplant.* **26**, 841–854 (2017).

510. Lee, R. *et al.* Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells in systemic sclerosis: Alterations in function and beneficial effect on lung fibrosis are regulated by caveolin-1. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **4**, 127–136 (2019).
511. Di Benedetto, P. *et al.* Mesenchymal stem cells of Systemic Sclerosis patients, derived from different sources, show a profibrotic microRNA profiling. *Sci. Rep.* **9**, 7144 (2019).
512. Graupp, M. *et al.* Establishing principles of macromolecular crowding for in vitro fibrosis research of the vocal fold lamina propria: MMC for Vocal Fold Fibrosis Research. *The Laryngoscope* **125**, E203–E209 (2015).
513. Lv, D., Li, H. & Chen, L. Apelin and APJ, a novel critical factor and therapeutic target for atherosclerosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **45**, 527–533 (2013).
514. Kleinz, M. J., Skepper, J. N. & Davenport, A. P. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul. Pept.* **126**, 233–240 (2005).
515. Wysocka, M. B., Pietraszek-Gremplewicz, K. & Nowak, D. The Role of Apelin in Cardiovascular Diseases, Obesity and Cancer. *Front. Physiol.* **9**, 557 (2018).
516. Ladeiras-Lopes, R., Ferreira-Martins, J. & Leite-Moreira, A. F. The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arq. Bras. Cardiol.* **90**, 343–349 (2008).
517. Helker, C. S. *et al.* Apelin signaling drives vascular endothelial cells toward a pro-angiogenic state. *eLife* **9**, e55589 (2020).
518. Qin, D. *et al.* Early vessel destabilization mediated by Angiopoietin-2 and subsequent vessel maturation via Angiopoietin-1 induce functional neovasculature after ischemia. *PLoS One* **8**, e61831 (2013).
519. Chen, L., Tao, Y., Feng, J. & Jiang, Y. R. Apelin Protects Primary Rat Retinal Pericytes from Chemical Hypoxia-Induced Apoptosis. *J. Ophthalmol.* **2015**, 186946 (2015).
520. Yamazaki, S. *et al.* Apelin/APJ signaling suppresses the pressure ulcer formation in cutaneous ischemia-reperfusion injury mouse model. *Sci. Rep.* **10**, 1349 (2020).
521. Yokoyama, Y. *et al.* Inhibitory Regulation of Skin Fibrosis in Systemic Sclerosis by Apelin/APJ Signaling. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **70**, 1661–1672 (2018).
522. Apostolidis, S. A. *et al.* Single Cell RNA Sequencing Identifies HSPG2 and APLNR as Markers of Endothelial Cell Injury in Systemic Sclerosis Skin. *Front. Immunol.* **9**, 2191 (2018).
523. Aozasa, N. *et al.* Serum apelin levels: clinical association with vascular involvements in patients with systemic sclerosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **27**, 37–42 (2013).
524. Magalon, J. *et al.* Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 391–398 (2019).
525. Velier, M. *et al.* Adipose-Derived Stem Cells from Systemic Sclerosis Patients Maintain Pro-Angiogenic and Antifibrotic Paracrine Effects In Vitro. *J. Clin. Med.* **8**, E1979 (2019).

526. Lee, D. K. *et al.* Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* **146**, 231–236 (2005).
527. Harada, Y. *et al.* Transplantation of freshly isolated adipose tissue-derived regenerative cells enhances angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* **34**, 23–29 (2013).
528. Jiang, D. & Scharffetter-Kochanek, K. Mesenchymal Stem Cells Adaptively Respond to Environmental Cues Thereby Improving Granulation Tissue Formation and Wound Healing. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 697 (2020).
529. Chen, L. *et al.* Apelin-13 induces mitophagy in bone marrow mesenchymal stem cells to suppress intracellular oxidative stress and ameliorate osteoporosis by activation of AMPK signaling pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **163**, 356–368 (2021).
530. Hou, J. *et al.* Apelin promotes mesenchymal stem cells survival and vascularization under hypoxic-ischemic condition in vitro involving the upregulation of vascular endothelial growth factor. *Exp. Mol. Pathol.* **102**, 203–209 (2017).
531. Tonnard, P., Verpaele, A. & Carvas, M. Fat Grafting for Facial Rejuvenation with Nanofat Grafts. *Clin. Plast. Surg.* **47**, 53–62 (2020).
532. Arthurs, J. R., Desmond, C. M., TerKonda, S. P. & Shapiro, S. A. Micro-fragmented adipose tissue for treatment of knee osteoarthritis with Baker’s cyst: a case study. *BMJ Case Rep.* **2018**, bcr-2018-224426 (2018).
533. Tamburino, S., Lombardo, G. A., Tarico, M. S. & Perrotta, R. E. The Role of Nanofat Grafting in Vulvar Lichen Sclerosus: A Preliminary Report. *Arch. Plast. Surg.* **43**, 93–95 (2016).
534. Jan, S. N. *et al.* Unfiltered Nanofat Injections Rejuvenate Postburn Scars of Face. *Ann. Plast. Surg.* **82**, 28–33 (2019).