NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 24 mai 2024

Xavier HEIM

Titre de la thèse : CD146 : une molécule régulatrice de l'interaction entre la voie WNT et la voie des ROS, co-impliquées dans la fibrose de type sclérodermie systémique

Discipline
Biologie santé

Spécialité
Pathologie vasculaire et nutrition

École doctorale
ED62 : Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
C2VN
INSERM 1263
INRAE 1260
Aix-Marseille Université

Composition du jury

Cécile CONTIN-BORDES Université de Bordeaux	Rapporteuse
Valérie LECUREUR-ROLLAND Université de Rennes	Rapporteuse
Sylvain DUBUCQUOI Université de Lille	Examinateur
Jean-Louis MEGE Aix-Marseille Université	Président du jury
Nathalie BARDIN Aix-Marseille Université	Directrice de thèse
Brigitte GRANEL Aix-Marseille Université	Examinatrice

Affidavit

Je soussigné, Xavier Heim, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Professeur Nathalie Bardin, 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 18 mars 2024



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.

Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences

1) Liste des publications et/ou brevet réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis.
   Kaspi E, **Heim X**, Granel B, Guillet B, Stalin J, Nollet M, Bertaud-Foucault A, Robaglia-Schlupp A, Roll P, Cau P, Leroyer A, Bachelier R, Benyamine A, Dignat- George F, Blot-Chabaud M, Bardin N
   J Allergy Clin Immunol. 2017 Nov;140(5):1448-1451.e6.
2. TH17 cells expressing CD146 are significantly increased in patients with Systemic sclerosis
   Gabsi A, **Heim X**, Dlala A, Gati A, Sakhri H, Abidi A, Amri S, Neili B, Leroyer AS, Bertaud A, Smiti Khanfir M, Said F, Houman MH, Granel B, Blot-Chabaud M, Bardin N, Marrakchi R
   Sci Rep. 2019 Nov 27;9(1):17721.
3. CD146 at the Interface between Oxidative Stress and the Wnt Signaling Pathway in Systemic Sclerosis.
   Heim X, Bermudez J, Joshkon A, Kaspi E, Bachelier R, Nollet M, Vélier M, Dou L, Brodovitch A, Foucault-Bertaud A, Leroyer AS, Benyamine A, Daumas A, Granel B, Sabatier F, Dignat-George F, Blot-Chabaud M, Bardin N.
   J Invest Dermatol. 2022 Dec;142(12):3200-3210.e5.
4. CD146/sCD146 in the Pathogenesis and Monitoring of Angiogenic and Inflammatory Diseases.
   Heim X, Joshkon A, Bermudez J, Bachelier R, Dubrou C, Boucraut J, Foucault-Bertaud A, Leroyer AS, Dignat-George F, Blot-Chabaud M, Bardin N.
   Biomedicines. 2020 Dec 10;8(12):592.
5. Elevated serum Krebs von den Lungen-6 in systemic sclerosis: a marker of lung fibrosis and severity of the disease.
   Benyamine A, **Heim X**, Resseguier N, Bertin D, Gomez C, Ebbo M, Harlé JR, Kaplanski G, Rossi P, Bardin N, Granel B.
   Rheumatol Int. 2018 May;38(5):813-819.

Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by skin and visceral fibrosis with a 10-year survival rate estimated at 60%. Patient management relies on symptomatic treatments due to the lack of specific therapy. The disease's origin, linking immune and vascular dysfunctions to fibrosis, remains poorly understood. Vascular involvement, central to SSc, leads to a pro-vasospasm, pro-adhesive, and pro-coagulant endothelial state where hypoxia and oxidative stress play key roles between the endothelium and connective tissue, disrupting angiogenesis and vasculogenesis. Thus, angiogenic molecules emerge as relevant molecular targets for understanding SSc's pathophysiology and developing new therapeutic strategies.

CD146, an angiogenic and endothelial adhesion molecule expressed on endothelial cells and other cell types, also exists in a soluble form (sCD146). CD146 is involved in inflammation, angiogenesis, and leukocyte migration. By interacting with VEGFR-2 and Wnt5a, CD146 influences angiogenesis and cell migration, respectively. Given CD146's functions, particularly in inflammation and angiogenesis, and its strategic endothelium location, we hypothesized that CD146 plays a role in systemic sclerosis. This thesis aims to highlight CD146 and sCD146's role and characterize the cellular signaling pathways regulated by CD146 during SSc fibrosis, to develop new therapeutic targets in SSc.

Our work evidenced CD146/sCD146's role in SSc for the first time. We conducted *in vivo* tests on a murine model of bleomycin-induced SSc from wild type (WT) and CD146 deficient (KO) mice and we conducted *in vitro* tests using MEFs extracted from WT and KO mice. We confirmed these results on human on cutaneous fibroblast explants, PBMCs, and sera from SSc patients compared to controls.

Our results demonstrated CD146/sCD146's role in SSc as KO mice were more prone to develop skin fibrosis, whereas sCD146 injection prevented fibrosis. We demonstrated higher sCD146 concentrations in SSc patients compared to controls and an inverse correlation between sCD146 and disease severity. We linked sCD146 concentrations with circulating Th17 lymphocyte levels and showed sCD146 *in vitro* induces CD146 expression on Th17 lymphocytes' surface. Lastly, we revealed a deregulation of the Wnt pathway and a pro-fibrotic Wnt signature in the absence of CD146, oxidative stress enhancement by CD146 deficiency, and CD146's protective role against Wnt5a degradation by oxidative stress. We showed for the first time a neo-expression of CD146 on SSc patients' fibroblasts and identified an autoimmunity against CD146.

In conclusion, our findings indicate CD146 plays a key role in SSc, affecting fibrosis and auto-immunity. This research underscores CD146's significance as a potential target for new therapeutic approaches in SSc.

Key word: CD146 ; systemic sclerosis ; fibrosis ; biomarker ; Wnt pathway ; ROS ; Th17 ; auto-immunity

Résumé

La sclérodermie systémique (SSc) est une maladie auto-immune caractérisée par une fibrose cutanée et viscérale avec un taux de survie de 60% sur 10 ans. Le suivi des patients repose sur des traitements symptomatiques faute de thérapie spécifique. Son origine reste mal comprise, liant des dysfonctionnements immunitaires et vasculaires à une fibrose. L'atteinte vasculaire, centrale dans la SSc, mène à un état endothélial pro-vasospasme, pro-adhésif et pro-coagulant, où l'hypoxie et le stress oxydant jouent un rôle clé entre l'endothélium et le tissu conjonctif, perturbant l'angiogenèse et la vasculogenèse. Les molécules angiogéniques représentent donc de nouvelles cibles moléculaires pertinentes pour la compréhension de la physiopathologie de cette maladie et l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

CD146, molécule angiogénique d'adhérence endothéliale, exprimée sur les cellules endothéliales et autres types cellulaires, existe aussi sous forme soluble (CD146s). CD146 est impliqué dans l'inflammation, l'angiogenèse et la migration leucocytaire. En interagissant avec VEGFR-2 et Wnt5a, CD146 influence l'angiogenèse et la migration cellulaire respectivement. Au regard des différentes fonctions de CD146, en particulier dans l'inflammation et l'angiogenèse, et sa localisation stratégique sur l'endothélium, nous avons posé l'hypothèse que CD146 est un acteur de la sclérodermie systémique. Les objectifs de mon travail de thèse étaient de mettre en évidence le rôle de CD146 et CD146 soluble et de caractériser les voies de signalisations cellulaires régulées par CD146 au cours de la fibrose de la sclérodermie systémique afin de pouvoir développer de nouvelles cibles thérapeutiques dans la SSc.

Notre travail mis en évidence pour la première fois le rôle de CD146/CD146s dans la SSc. Nous avons pour cela réalisé des tests, *in vivo* sur un modèle murin de SSc induite par la bléomycine chez des souris sauvages (WT) et déficientes en CD146 (KO) et *in vitro* à l'aide de MEFs extraits de souris WT et KO. Nous confirmons ces résultats chez l'homme sur des explants de fibroblastes cutanés, des PBMC et des sérums de patients SSc en comparaison à des témoins. Nos résultats ont démontré le rôle de CD146/sCD146 dans la SSc car les souris KO étaient plus susceptibles de développer une fibrose cutanée, l'injection de CD146s prévenait la fibrose. Nous avons montré une élévation des concentrations de CD146s chez les patients atteints de SSc par rapport à des témoins et une corrélation inverse entre CD146s et la gravité de la maladie. Nous avons corrélé les concentrations de CD146s avec les taux de lymphocytes Th17 circulants et montré que CD146s induit *in vitro* l'expression de CD146 à la surface des lymphocytes Th17. Enfin, nous avons mis en évidence une dérégulation de la voie Wnt ainsi qu'une signature Wnt pro-fibrosante en l'absence de CD146, que l'absence de CD146 favorise le stress oxydatif et que CD146 protège Wnt5a de sa dégradation par le stress oxydatif. Nous avons confirmé ces résultats chez l'homme. Nous montrons pour la première fois une néo-expression de CD146 sur les fibroblastes de patients SSc. Enfin, nous avons mis en évidence l'apparition d'une auto-immunité dirigée contre CD146, probablement liée à l'apparition d'un stress oxydatif en lien avec l'exposition à la silice.

En conclusion, nos résultats indiquent que CD146 joue un rôle clé dans la SSc sur la fibrose et l'auto-immunité. Cette recherche souligne l'importance de CD146 comme cible potentielle pour de nouvelles approches thérapeutiques dans la SSc.

Mots clef : CD146 ; sclérodermie systémique ; fibrose ; biomarqueur ; Wnt ; ROS ; Th17 ; auto-immunité

Remerciements

Angéline, je te remercie pour ces années passées ensemble. Il m'est simplement impossible d'écrire en quelques lignes comment est la vie avec toi. 愛してる

Je remercie le professeur Jean-Louis Mège pour la confiance qu'il a placé en moi et pour son soutien dans mon parcours hospitalier et mon parcours universitaire. J'espère que vous ne serez pas déçu.

Je remercie le professeur Lecureur-Rolland pour avoir spontanément accepté de juger ce travail et de m'honorer de leur présence dans mon jury de thèse.

Je remercie le docteur Contin-Bordes d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie chaleureusement pour la bienveillance que vous avez eu à mon égard au cours des auditions du CNU.

Je remercie le professeur Dubucquoi pour sa disponibilité et pour avoir spontanément accepté de juger ce travail.

Je remercie le professeur Granel qui m'honore de sa présence et ses collaborations avec Nathalie et moi dans le domaine de la sclérodermie. Tu n'avais pas pu siéger dans mon jury de thèse d'exercice mais tu as pu être présente pour la thèse de science.

Au professeur Nathalie Barin : Nathalie, je te remercie pour ton aide quotidienne, ton franc parler, ton implication en tant qu'encadrant et pour plein d'autres choses. J'ai déjà souligné ton engagement pour tes étudiants. Un grand merci de m'avoir fait confiance ce jour d'avril 2016 quand nous nous sommes rencontrés au bâtiment Cornil.

Un grand merci aux membres du C2VN avec qui j'ai travaillé pendant toutes ces années et avec qui je continuerai de travailler tous les jours.

Un grand merci à l'équipe technique et biologique avec qui je travaille tous les jours à l'hôpital.

Je ne remercierai jamais assez mes maîtres qui m'ont appris et qui m'apprennent encore tous les jours sur le plan médicale, scientifique, humain et organisationnel qu'ils soient biologistes, techniciens ou internes.

Un grand merci à mes amis qui m'ont soutenu dans les difficultés professionnelles et personnelles qu'ils soient proches ou éloignés. La distance rend l'amitié plus chère, et l'absence la rend plus douce.

Merci à Meïwakan et Meïseïkan pour leur énergie et leur motivation de tous les jours.

Merci à mes parents, ma famille et ma belle-famille qui sont là pour moi.

Merci à Lui אֶהְיֶה אֲשֶׁר אֶהְיֶה

"L'échec est la clé du succès : chaque erreur nous apprend quelque chose."

Morihei Ueshiba, O-Sensei

"J’ai demandé à Dieu la force pour atteindre le succès,

Et Dieu m’a rendu faible afin que j’apprenne humblement à obéir.

J’ai demandé la santé pour faire de grandes choses,

Et Dieu m’a donné l’infirmité pour que je fasse des choses merveilleuses.

J’ai demandé la richesse pour pouvoir être heureux,

Et Dieu m’a donné la pauvreté pour pouvoir être sage.

J’ai demandé la puissance pour obtenir l’estime des hommes,

Et Dieu m’a donné la faiblesse afin que j’éprouve le besoin de Dieu.

J’ai demandé un compagnon afin de ne pas vivre seul,

Et Dieu m’a donné un cœur afin que je puisse aimer tous mes frères.

J’ai demandé toutes les choses qui pourraient réjouir ma vie,

Et j’ai reçu la vie afin que je puisse me réjouir de toutes choses.

Je n’ai rien eu de ce que j’avais demandé,

Mais j’ai reçu tout ce que j’avais espéré. Presque en dépit de moi-même, les prières que je n’avais pas formulées ont été exaucées. Je suis parmi les hommes le plus richement comblé. "

Hans Viscardi. Texte gravé sur une tablette en bronze dans un institut de réadaptation, à New York

1 Table des matières

Affidavit 2
Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences 3
Abstract 4
Résumé 5
Remerciements 6
2 Table des illustrations 11
3 Abbréviations 13
4 Introduction 14
Chapitre I : La sclérodermie systémique 16
5 Epidémiologie 16
6 Facteurs génétiques 16
7 Facteurs environnementaux 17
7.1 La sclérodermie systémique d'exposition professionnelle 18
8 Présentation clinique 20
8.1 Diagnostic 21
8.2 Atteinte cutanée : 23
8.3 Atteinte musculosquelettique 26
8.4 Atteinte pulmonaire 27
8.5 Atteinte rénale 29
8.6 L'atteinte digestive 29
8.7 Atteinte cardiovasculaire 29
8.8 Cancer dans la SSc 31
9 Physiopathologie 31
9.1 L'activation du système immunitaire 32
9.1.1 Activation lymphocytaire 33
9.1.2 Production d'Auto-anticorps 35
9.2 L'atteinte endothéliale 40
9.3 L'apparition de fibrose 43
9.4 Les fibroblastes, cellules de la réparation tissulaire 43
Chapitre II : Les ROS, la voie Wnt et la fibrose 47
10 Les ROS 47
11 La voie Wnt 48
11.1 Les protéines Wnt 49
11.1.1 Les activateurs de la voie Wnt 49
11.1.2 Les inhibiteurs de la voie Wnt 49
11.2 Les voies de signalisation 49
11.2.1 Voie canonique 50
11.2.2 Voie non canonique 51

11.3 Activation de la voie Wnt dans la SSc 52
11.4 Wnt et ROS 54
Chapitre III : CD146 57
12 Structure 57
12.1 Génomique : 57
12.2 Protéique : 58
12.2.1 Structure globale 58
12.2.2 Formes membranaires 60
12.2.3 Formes solubles 61
13 Localisation 61
13.1 Localisation vasculaire de CD146 62
13.1.1 Localisation endothéliale 62
13.1.2 Cellules musculaires lisses 63
13.1.3 Péricytes 63
13.2 Stroma médullaire et tissu adipeux 64
13.2.1 Cellules souches mésenchymateuses 64
13.2.2 Tissu adipeux 64
13.2.3 Fibroblastes 65
13.3 Système immunitaire 66
13.3.1 Cellules lymphocytaires 66
13.3.2 Autres cellules immunitaires 67
13.4 Expression de CD146 à l'interface materno-foetale 67
13.5 Système nerveux central 68
13.6 Cancer 68
14 Rôles de CD146 69
14.1 Rôle dans l'intégrité et perméabilité vasculaire 69
14.2 Rôle dans l'angiogenèse 70
14.3 Rôle sur le cytosquelette et la migration cellulaire 71
14.4 Inflammation et Fibrose 73
14.4.1 CD146 dans le cancer 75
14.4.2 Rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse et la transition endothélio-mésenchymateuse 76
15 Facteur modifiant l'expression de CD146 77
16 Partenaires de CD146 80
Résultats 86
17 Partie I : Identification de CD146/CD146 soluble comme acteur de la sclérodermie systémique 87
18 Partie II : CD146 au carrefour de deux voies fibrosantes : les ROS et la voie Wnt 108
19 Partie III : auto-anticorps anti-CD146 126
Discussion 137

Perspectives du travail 146
Conclusion générale 148
Annexes 149
Bibliographie 151

2 Table des illustrations

Figure 1: Critères de classification ACR-EULAR de la sclérodermie systémique (Protocole National de Diagnostic et de Soins sur la Sclérodermie Systémique de la Haute Autorité de Santé) 22
Figure 2: Critères de classification de la SSc en fonction de l'atteinte cutanée proposés par LeRoy et Medsger (39). 23
Figure 3: Les trois phases d'atteinte cutanée au cours de la sclérodermie systémique. Phase oedémateuse (gauche) phase atrophique (milieu) et phase indurative (droite) (46). 24
Figure 4: Evaluation de la sclérose cutanée par le score de Rodnan modifié (Protocole National de Diagnostic et de Soins sur la Sclérodermie Systémique de la Haute Autorité de Santé). 25
Figure 5: Images d'atteintes cutanées au cours de la SSc correspondant à une télangiectasie cutanée (a), des mégacapillaires (b) une calcinose (c) et un ulcère digital ischémique (d). 26
Figure 6 : Principales atteintes musculosquelettiques. (Gauche) Contracture digitale. (Milieu) Calcinoses. (Droite) Aco-ostéolyse (46). 27
Figure 7: TDM thoracique haute résolution à partir de vues coronales (A) et sagittales (B – D) montrant une pneumopathie interstitielle diffuse non spécifique avec des opacités vitreuses, des réticulations et des bronchectasies de traction avec une distribution périphérique, un gradient apicobasal et une épargne sous-pleurale (65). 28
Figure 8: Apport des lymphocytes T dans le développement de la SSc. ECM, matrice extracellulaire ; CTL, lymphocyte T cytotoxique ; Tfh, lymphocytes T auxiliaires folliculaires T ; Treg, lymphocytes T régulateurs ; Tang, Lymphocytes T angiogéniques (93). 35
Figure 9: Aspect des auto-anticorps antinucléaires sur cellules HEp-2 associés à la SSc. Anticorps anti-centromère (haut droite), anti-topoisomérase I (haut centre), fibrillarine (haut droite), RNA polymérase III (milieu gauche, centre et droite), anti-Th/To (bas gauche), anti-Ku (bas centre) et anti-PM-Scl (bas droite). 37
Figure 10: Auto-anticorps retrouvés dans la physiopathologie de la sclérodermie systémique, adapté de Furue et al (122). 40
Figure 11: Mécanismes de base de la vasculopathie liée à la sclérose systémique. 41
Figure 12: Schéma de la transition endothélio-mésenchymateuse au cours de la Sclérodermie systémique 42
Figure 13: Schéma de la transition epithélio-mésenchymateuse. 46
Figure 14: Signalisation dite « canonique » dépendante de la β-caténine d'après Angers et Moon (198). 51
Figure 15: Signalisation Wnt dite « non canonique » indépendante de la β-caténine d'après Angers et Moon (198). 52
Figure 16: Structure du promoteur de CD146. La région promotrice de CD146 contient quatre motifs AP-2, quatres motifs SP-1, un CREB, deux motifs CArG et un site de liaison au facteur de transcription MyoD adapté de Mintz-Weber et al. (233). 58
Figure 17: A/ Structure du gène codant pour CD146 : organisation des introns, exons et domaines corres-pondants. D1 à D5 : domaines Ig-like ; TM : domaine transmembranaire. B/ Structure de la protéine CD146. V : régions variables ; C2 : régions constantes des domaines Ig-like. Les flèches symbolisent les sites putatifs de N-glycosylation, adapté de Sers et al. (226). 58
Figure 18: Structure en 3 dimensions de CD146 d'après proteinatlas.org (https://www.proteinatlas.org/ENSG00000076706-MCAM/structure) 59
Figure 19: Séquence protéique de CD146 (D'après www.uniprot.org) 60
Figure 20: Représentation schématique des isoformes CD146s-I10 et CD146s-I5-13 par rapport à la forme complète. Résumé des mécanismes de génération et des fonctions des différentes variantes du CD146 soluble dans les cellules endothéliales d'après Nollet et al. (149). 61
Figure 21: Localisation et fonctions des isoformes de CD146 dans les cellules endothéliales adapté de Kebir et al. (5) 62
Figure 22: Illustration résumant les rôles de CD146 et CD146 soluble en physiologie et pathologie (308). 69
Figure 23: Vue générale abrégée des voies de signalisation CD146-ERM-actine et RhoA-PI4P5K-PIP2. En réponse à une stimulation, le facteur d'échange de nucléotidiques va recruter la protéine RhoA et phosphoryler le phosphatidylinositol monophosphate par la voie RhoA-PI4P5K-PIP2 (1). La moésine

(2) va se lier à CD146 et former un complexe CD146/moésine/PIP2 (3). Le recrutement de RhoGDI1 (4) va renforcer l'ancrage de CD146 au cytosquelette, ce qui conduit finalement au mouvement cellulaire (236). 73
Figure 24: Schéma récapitulatif des activateurs et inhibiteurs de CD146 et des voies activées par CD146 et leur fonctions. 79
Figure 25 : CD146 et CD146s : une molécule au carrefour des atteintes de la sclérodermie systémique. 85

3 Abbréviations

A1TR angiotensine II de type I
ADN acide désoxyribonucléique
AMPc Adénine monophosphate cyclique
APC adenomatous polyposis coli
ARN pol acide ribonucléique polymérase
ARNm acide ribonucléique messager
ASC cellules progénitrices adipeuses
ATM ataxia telangiectasia-mutated
BHE barrière hémato-encéphalique
CAF fibroblastes associés au cancer
CKIα caséine kinase I α
CML cellules musculaires lisses
CSM cellules souches mésenchymateuses
DKK Dickkopf
DLCO capacité de diffusion du dioxyde de carbone
Dvl Dishevelled
ELIA Enzyme linked Immuno assay
EMT transition épithélio-mésenchymateuse
EndoMT transition endothélio-mésenchymateuse
ERM ezrine, radixine, moesine
ETAR récepteurs de l'endothéline de type A
FGF4 Facteur de croissance fibroblastique 4
FVS fraction vasculaire stromale
Fzd Frizzled
G-CSF Granular Colony Stimulating Factor
GSK-3β glycogène-synthase-kinase 3 β
HIF-1α facteur de transcription inductible par l'hypoxie 1α
HRP peroxydase de raifort
HTAP Hypertension artérielle pulmonaire
HUVECs cellules endothéliales de veines ombilicales humaines
ICAM-1 molécule d'adhésion intercellulaire 1
IFN-γ Interféron gamma
IL Interleukine
IP3 phosphatidyl inositol tri-phosphate
kDa kiloDalton
LCR liquide céphalorachidien
LMEC cellules microvasculaires de poumon
MICI maladies chroniques inflammatoires de l'intestin
miRNAs micro acides ribonucléiques
MMP métallo-protéinase matricielle
NADPH nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB facteur nucléaire kappa B
NK natural killer
NO Oxyde nitrique
NOF Neurite Outgrowth Factor
NOS NO synthase
PDGF Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGF-B facteur de croissance dérivé des plaquettes
PECAM-1 molécule d'adhésion des cellules endothéliales des plaquettes 1
PID pneumopathie interstitielle diffuse
PIP2 phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate
PPAR-γ peroxisome proliferator-activated receptor γ
ROR2 Récepteur de type tyrosine kinase orphelin 2
ROS Espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR réaction en chaine de polymérase avec transcription inverse
SDF Facteur dérivé des cellules stromales
SFRP protéines sécrétées liées à la protéine frizzled
SiRNA petits ARN interférents
SNC Système Nerveux Central
SSc Sclérodermie systémique
SScD sclérodermie systémique cutanée diffuse
SScL sclérodermie systémique cutanée limitée
STAT3 Transducteur de signal et activateur de la transcription 3
TGF-β Facteur de croissance tumorale β
TNF-α Facteur nécrosant des tumeurs α
UTR région non traduite
VCAM-1 molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
VEGF Facteur de croissance endothélial
VEGFR-2 Récepteur du Facteur de Croissance Vasculaire
WIF facteur inhibiteur de Wnt
WT Sauvage
α-SMA α-actine musculaire lisse

4 Introduction

La sclérodermie systémique (SSc) est une maladie auto-immune non spécifique d'organe caractérisée par une sclérose cutanée et viscérale profonde associée à une altération fonctionnelle et structurelle, ce qui conduit à une ischémie chronique. C'est une affection généralisée des vaisseaux et du tissu conjonctif dont les principales composantes sont l'apparition d'une fibrose et d'une oblitération vasculaire dans la peau et d'autres organes, en particulier les poumons. Le taux de survie à 10 ans est estimé à environ 60%, mais cela peut varier en fonction de divers facteurs, y compris le sous-type de SSc, limitée ou diffuse, l'âge, le sexe et les organes impliqués (1). Il n'existe pas de traitement spécifique pour la sclérodermie systémique, et la prise en charge thérapeutique est principalement axée sur des **traitements symptomatiques** pour atténuer et gérer les manifestations cliniques de la maladie. La physiopathologie associe des phénomènes dysimmunitaires avec une atteinte vasculaire aboutissant à une fibrose cutanée et viscérale mais reste insuffisamment comprise pour pouvoir développer de nouvelles thérapeutiques spécifiques.

Concernant l'atteinte vasculaire, elle est centrale. Les perturbations initiales tendent vers un état endothélial propice au vasospasme, pro-adhésif et pro-coagulant. L'hypoxie, le stress oxydant et la forte production locale d'endothéline-1 expliquent en partie le lien entre l'endothélium et le tissu conjonctif. L'angiogenèse, qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir des cellules endothéliales matures du réseau vasculaire préexistant et la vasculogenèse, qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de progéniteurs issus de la moelle osseuse, sont fortement désorganisées au cours de la SSc et ne permettent pas de contrebalancer l'ischémie tissulaire chronique. Les molécules angiogéniques représentent donc de nouvelles cibles moléculaires pertinentes pour la compréhension de la physiopathologie de cette maladie et l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques (2).

Parmi les molécules angiogéniques, **CD146 (ou Ag S-Endo 1/MUC 18/MCAM)** représente une cible moléculaire endothéliale intéressante. Il s'agit d'une molécule d'adhérence appartenant à la superfamille des immunoglobulines qui est essentiellement localisée dans la **jonction endothéliale** (3). Physiologiquement, la molécule CD146 est exprimée de façon ubiquitaire et constitutive sur les cellules endothéliales chez l'homme. Toutefois, d'autres types cellulaires l'expriment comme les **lymphocytes Th17** ou les **fibroblastes associés au cancer**. CD146 existe également sous une **forme soluble (CD146s)** provenant du clivage de CD146 membranaire par protéolyse sous l'action de métalloprotéases

(4). Concernant les fonctions de la molécule, nous avons montré que CD146 et CD146s sont impliquées dans **l'inflammation**, **l'angiogenèse** et dans la transmigration de monocytes (5,6). CD146s, en particulier, présente des propriétés chimiotactiques sur les cellules endothéliales et les progéniteurs endothéliaux, dont elle stimule la prolifération et la migration. CD146 possède plusieurs partenaires comme le VEGFR-2 dont il est le corécepteur ce qui lui confère un rôle majeur dans l'angiogenèse. Il a aussi pour ligand la **protéine Wnt5a** qui appartient à la voie de **signalisation Wnt** impliquée dans la **migration, la réparation tissulaire et la fibrose**.

Au regard des différentes fonctions de CD146, en particulier dans l'inflammation et l'angiogenèse, et sa localisation stratégique sur l'endothélium, **nous avons posé l'hypothèse que CD146 est un acteur de la sclérodermie systémique**.

Les objectifs de mon travail de thèse sont :

1/ de mettre en évidence le rôle de CD146 et CD146 soluble dans un modèle murin et de confirmer la pertinence de ces résultats chez l'humain.

2/ d'identifier et caractériser les voies de signalisations cellulaires régulées par CD146 au cours de la fibrose de la sclérodermie systémique.

3/ d'identifier le rôle de CD146 en tant que cible thérapeutique dans la sclérodermie systémique

Dans cette optique j'organiserai une première partie bibliographique autour de rappels sur la sclérodermie systémique et sur CD146. Puis je présenterai et discuterai les résultats que nous avons obtenus sur l'identification de CD146 en tant qu'acteur moléculaire dans la sclérodermie systémique sur un modèle murin et sa pertinence chez l'humain. Ensuite nous détaillerons les voies de signalisations sur lesquelles CD146 agit pour moduler la fibrose de la sclérodermie systémique. Puis nous énoncerons le potentiel thérapeutique et diagnostic de CD146 dans la sclérodermie systémique.

Ces résultats ont été publiés ou sont en cours de publication, et sont présentés ci-après.

Chapitre I : La sclérodermie systémique

5 Epidémiologie

La sclérodermie systémique est une pathologie rare dont la prévalence et l'incidence présentent une variabilité géographique importante. Les plus basses estimations placent la prévalence à moins de 150 cas par million et l'incidence à moins de 10 cas par million chaque année dans le nord de l'Europe et le Japon. Le Sud de l'Europe, l'Amérique du Nord et l'Australie placent la prévalence à environ 280-440 cas par million d'habitants et l'incidence à 14-21 cas par million d'habitants et par an (7). Le développement de la sclérodermie systémique est plus fréquent chez les femmes que chez les hommes avec un ratio de 8 femmes pour 1 homme (8). La maladie est plus grave chez les hommes avec plus de formes cutanées diffuses, une plus grande proportion d'ulcères digitaux et d'hypertension artérielle pulmonaire (9). Le facteur ethnique importe aussi sur l'apparition des symptômes et sur la gravité de la maladie comme dans les autres maladies auto-immunes. Sur une large étude américaine, la population afro-américaine plus jeune développait plus fréquemment une sclérodermie systémique cutanée diffuse objectivée par l'apparition plus fréquente d'auto-anticorps anti-topoisomérase I (10). L'âge de déclaration de la pathologie peut aller de 20 à 50 ans (11) mais d'autres études montrent un âge d'apparition des symptômes plus tardif autour de 55 à 69 ans (12). La survenue retardée de la pathologie serait aussi associée à un plus mauvais pronostic. Concernant les facteurs de comorbidité, la présence d'une autre maladie auto-immune concomitante a été retrouvée dans 26% des cas selon une méta analyse regroupant plus de 3000 patients (13).

6 Facteurs génétiques

Bien que la SSc ne soit pas une maladie génétique, il existe une susceptibilité génétique de développer la maladie qui est 60 fois plus importante chez des individus apparentés que dans la population générale (14–16). La plupart des gènes de susceptibilité identifiée à ce jour est liée au système immunitaire, ce qui souligne davantage la composante immunitaire de la maladie (17). Parmi les principaux gènes de susceptibilité il a été répertorié certains haplotypes de ceux du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (18). Les autres gènes impliqués dans la susceptibilité retrouvés à ce jour sont liés à l'immunité innée au métabolisme des molécules de la matrice extracellulaire, à l'activation des macrophages et

aux fonctions des lymphocytes T (14–16). Par exemple, le facteur 5 de régulation de l'interféron (Irf5) est un gène de l'immunité innée dont la stimulation via le TLR4 active les cellules endothéliales microvasculaires dermiques, les cellules T CD4+ et les cellules B et crée un phénotype pro-fibrotique dans un modèle murin de sclérodermie induite par bléomycine (19). La présence d'un polymorphisme sur ce gène est plus fréquemment détectée chez les patients atteints de SSc présentant des symptômes cliniques plus légers (20).

Les anomalies génétiques ne peuvent expliquer à elles seule l'apparition et l'hétérogénéité de la maladie. C'est pourquoi d'autres études ont cherché des liens sur la régulation de l'expression génique dans la sclérodermie et ont noté l'apparition d'anomalies de méthylation de l'ADN dans les fibroblastes, les lymphocytes et les cellules endothéliales des patients atteints de SSc. Par exemple, le facteur de transcription d'intégration de la leucémie Friend 1 (Fli1) peut réguler à la baisse la synthèse de collagène de fibroblastes dermiques de patients SSc en culture (21). Des souris invalidées pour ce gène ont montré un phénotype proche de la sclérodermie systémique avec fibrose, vasculopathie et production d'autoanticorps (22). Des inhibiteurs de méthyltransférase ont prouvé leur efficacité sur la synthèse de collagène sur des fibroblastes de patients SSc par rétablissement de Fli1 (23). Ces anomalies peuvent influencer l'expression des gènes impliqués dans la fibrose et l'auto-immunité mais ne sont pas suffisantes pour induire une SSc.

7 Facteurs environnementaux

Des **éléments environnementaux** ont été proposés comme des **déclencheurs** potentiels de la SSc (24,25). Des études cas/témoins ont établi des liens entre certaines substances chimiques organiques et pesticides et le développement de la maladie (26). Des études expérimentales ont montré que l'administration intratrachéale et intraveineuse de particules cristallines induisait des altérations dans le système immunitaire adaptatif avec une dépression de la fonction des cellules T (27). L'inhalation de petites particules de quartz et leur contact avec le parenchyme pulmonaire induisent une réaction immunitaire comprenant une surproduction d'IL-1, de facteur de croissance dérivé des plaquettes et de fibronectine (28). De plus, l'activation des macrophages contre les particules de silice entraîne la stimulation de la production de collagène et, en présence de particules dans les ganglions lymphatiques, stimule les réponses immunitaires adaptatives. Plusieurs études ont confirmé une **corrélation significative entre la SSc et l'exposition à la silice cristalline chez les hommes** (25,29). D'autres composés comme les solvants peuvent déclencher une SSc en pénétrant dans l'organisme par

contact cutané ou par inhalation (25,30). Après pénétration dans la cellule et liaison aux acides nucléiques et aux protéines, les solvants peuvent favoriser la production de facteurs pro-fibrotiques tels que l'IL-1, la fibronectine, le PDGF et le TGF-β (31). L'exposition au trichloroéthylène et à un de ses métabolites a parfois été associée à la production d'auto-anticorps (32). Le rôle des fumées de soudage a été suspecté comme facteurs contributifs au risque de maladie dans la SSc. Des études ont ainsi montré une association positive entre la SSc et les fumées de soudage, avec un risque accru lié à l'exposition cumulative (25). Bien que quelques études aient suggéré que les pesticides pourraient jouer un rôle dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde (33) et du lupus érythémateux disséminé (34), les études excluent un tel effet causal dans la SSc (25). Une autre étude mentionne que les patients atteints de SSc présentaient dans leurs cheveux des niveaux médians significativement plus élevés de plusieurs métaux lourds tels que l'antimoine, le cadmium, le plomb, le mercure, le molybdène, le palladium et le zinc, suggérant un rôle pathogénique de ces métaux dans la SSc (35).

7.1 La sclérodermie systémique d'exposition professionnelle

L'exposition prolongée à des particules toxiques dans un cadre professionnel peut conduire le salarié à développer une maladie d'exposition professionnelle. Selon l'assurance maladie, pour pouvoir parler de maladie professionnelle chez des patients atteints de SSc, les critères à remplir sont une exposition pendant au moins 10 ans à un composé dérivé de la silice et avoir exercé une profession à risque (Tableau 1). Le seul composé chimique selon l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS) dont l'exposition est répertoriée comme associée à l'apparition de SSc est dérivé de la silice.

Il est cependant possible de faire reconnaitre une maladie professionnelle quand la substance n'est pas répertoriée dans la base de l'INRS ou quand l'un des critères du tableau n'est pas rempli, dans ce cas la reconnaissance se détermine au cas par cas. Le dossier est alors étudié par des médecins experts des pathologies d'origine professionnelle. Ils se réunissent au sein d'un comité qui porte le nom de « comité régional de reconnaissance des maladies professionnelles » (CRRMP).

DÉSIGNATION DES MALADIES	DÉLAI DE PRISE EN CHARGE		LISTE INDICATIVE DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUSCEPTIBLES DE PROVOQUER CES MALADIES
Affections dues à l'inhalation de poussières de silice cristalline : quartz, cristobalite, tridymite			
A1.- Silicose aiguë : pneumoconiose caractérisée par des lésions alvéolo-interstitielles bilatérales mises en	6 mois	Le tableau précise le type d'images qui doit être retrouvé et la nécessité d'examens complémentaires pour poser le diagnostic aussi	Travaux exposant à l'inhalation des poussières renfermant de la silice cristalline, notamment :

évidence par des examens radiographiques ou tomodensitométriques ou par des constatations anatomopathologiques (lipoprotéinose) lorsqu'elles existent ; ces signes ou ces constatations s'accompagnent de troubles fonctionnels respiratoires d'évolution rapide.	(sous reserve d'une durée minimale d'exposition de 6 mois)	bien de la silicose aiguë que de la silicose chronique. La tomodensitométrie apparaît très utile pour préciser une image radiologique à « ombres fines », en cas de doute ou de divorce apparent entre l'imagerie et les troubles fonctionnels. L'indication d'une biopsie pulmonaire est très rare et ne doit pas être portée dans un but exclusif de reconnaissance, cependant on peut s'en servir si celle-ci a été faite par ailleurs. Dans le cas de la silicose aiguë, des troubles fonctionnels respiratoires doivent être constatés, ce qui n'est pas obligatoire dans le cas de la silicose chronique. Toutefois le bilan fonctionnel respiratoire est indispensable pour fixer le taux d'Incapacité Permanente Partielle. Ce bilan ne doit pas être limité à une simple étude des débits et volumes pulmonaires (spirographie) mais doit aborder l'analyse des échanges gazeux (mesure du transfert du CO et des gaz du sang artériel). Parmi les complications, l'insuffisance ventriculaire droite doit être caractérisée par les signes cliniques et paracliniques, ainsi que la tuberculose. L'aspergillose doit être confirmée par une sérologie. Le cancer broncho-pulmonaire, ainsi que le syndrome de Caplan-Colinet, doivent être associés à des signes radiologiques ou des lésions de nature silicotique.	Travaux dans les chantiers et installations de forage, d'abattage, d'extraction et de transport de minerais ou de roches renfermant de la silice cristalline ; Travaux en chantiers de creusement de galeries et fonçage de puits ou de bures dans les mines ; Concassage, broyage, tamisage et manipulation effectués à sec, de minerais ou de roches renfermant de la silice cristalline ; Taille et polissage de roches renfermant de la silice cristalline ; Fabrication et manutention de produits abrasifs, de poudres à nettoyer ou autres produits renfermant de la silice cristalline ; Travaux de ponçage et sciage à sec de matériaux renfermant de la silice cristalline Extraction, refente, taillage, lissage et polissage de l'ardoise ; Utilisation de poudre d'ardoise (schiste en poudre) comme charge en caoutchouterie ou dans la préparation de mastic ou aggloméré ; Fabrication de carborundum, de verre, de porcelaine, de faïence et autres produits céramiques et de produits réfractaires ; Travaux de fonderie exposant aux poussières de sables renfermant de la silice cristalline : décochage, ébarbage et dessablage ; Travaux de meulages, polissage, aiguisage effectués à sec, au moyen de meules renfermant de la silice cristalline ; Travaux de décapage ou de polissage au jet de sable contenant de la silice cristalline ; Travaux de construction, d'entretien et de démolition exposant à l'inhalation de poussières renfermant de la silice cristalline ; Travaux de calcination de terres à diatomées et utilisations des produits de cette calcination ; Travaux de confection de prothèses dentaires.
A2.- Silicose chronique : pneumoconiose caractérisée par des lésions interstitielles micronodulaires ou nodulaires bilatérales révélées par des examens radiographiques ou tomodensitométriques ou par des constatations anatomopathologiques lorsqu'elles existent ; ces signes ou ces constatations s'accompagnent ou non de troubles fonctionnels respiratoires. Complications : - cardiaque : - insuffisance ventriculaire droite caractérisée. - pleuro-pulmonaires : - tuberculose et autre mycobactériose (Mycobacterium xenopi, M. avium intracellulare, M. kansasii) surajoutée et caractérisée ; - nécrose cavitaire aseptique d'une masse pseudotumorale ; - aspergillose intracavitaire confirmée par la sérologie ; - non spécifiques : - pneumothorax spontané ; - surinfection ou suppuration bactérienne bronchopulmonaire, subaiguë ou chronique. Manifestations pathologiques associées à des signes radiologiques ou des lésions de nature silicotique : - cancer bronchopulmonaire primitif ; - lésions pleuro-pneumoconiotiques à type rhumatoïde (syndrome de Caplan-Collinet).	35 ans (sous réserve d'une durée minimale d'exposition de 5 ans)		
A3.- Sclérodermie systémique progressive.	15 ans (sous réserve d'une durée minimale d'exposition de 10 ans)	Le diagnostic est seulement clinique.	

Tableau 1 : Métiers à risque de développer un exposition à la SSc après exposition à la Silice d'après l'Institut national de recherche et de sécurité

Dans la prévention du risque d'exposition aux particules respiratoires, les concentrations de poussière de silice cristalline doivent être inférieures aux valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) qui sont de moins de $1mg.m^{-3}$

Actuellement pour prévenir le risque de maladie professionnelle il est recommandé de réaliser :

1/ un **examen médical initial par un médecin du travail** qui tiendra compte de l'existence d'antécédents respiratoires, **d'un examen clinique**, d'une **radiographie pulmonaire** et d'une étude par **spirométrie**. L'information de l'intéressé concernant les risques entraînés par l'inhalation de poussières de silice, doit être claire et complète.
2/ un examen médical périodique pour la détection précoce d'éventuelles anomalies radiologiques et/ou fonctionnelles pour juger de la nécessité d'un changement de poste ou d'une décision d'inaptitude ainsi que de l'opportunité d'une déclaration de maladie professionnelle. Actuellement l'appréciation de la périodicité idéale des examens complémentaires est difficile de même que la détection précoce des cas fortement exposés.

Il est aussi possible d'effectuer une surveillance post-professionnelle tous les cinq ans en cas de cessation d'activité sur la demande du salarié. Le médecin conseil fixe les modalités de la surveillance post professionnelle des intéressés compte tenu de la nature des risques. Le maintien dans l'emploi d'un salarié porteur d'une maladie professionnelle est théoriquement envisageable dans certaines conditions : maladie peu évoluée, temps court, surveillance particulière. Dans le contexte actuel, il est cependant exceptionnellement acceptable. Un des buts d'une prévention médicale correcte est de soustraire au risque, le plus rapidement possible, les travailleurs qui présentent des signes de début de la maladie.

L'exposition professionnelle à la silice cristalline et ses dérivés reste toutefois difficile à mettre en évidence en raison de **l'absence de tests biologiques** précoces pour détecter l'exposition ou à postériori pour confirmer cette exposition. Ces lacunes et représentent un **coût non négligeable** pour l'assurance maladie, pour la médecine de prévention, et une perte de chance pour le travailleur.

8 Présentation clinique

Décrite initialement par Carlo Curzion au milieu du XVIIIème siècle en Italie comme une pathologie qui transformait la peau en pierre, la sclérodermie a été nommée par l'association des mots grecs « σκληρός » (dur) and « δερμα » (peau). Les manifestations cliniques de la sclérodermie systémique sont variées. L'atteinte cutanée est la plus visible et la plus impactante sur la qualité de vie des patients. Certains patients présentent une maladie inflammatoire de la peau, des doigts gonflés et enflés, une inflammation musculo-squelettique et parfois des signes moins spécifiques comme une asthénie. L'apparition d'un phénomène de

Raynaud et de reflux gastro-oesophagien sont généralement les premiers signes cliniques. Leur survenue peut précéder les premiers signes cutanés de la maladie. L'absence de traitement global agissant simultanément sur chacun des différents mécanismes pathogéniques de la SSc rend la prise en charge thérapeutique compliquée. Celle-ci a pour but de limiter ou d'arrêter la progression de la maladie, de réduire les séquelles et d'améliorer la qualité de vie des patients. Elle reste donc symptomatique afin de limiter la sévérité des atteintes viscérales.

8.1 Diagnostic

Le diagnostic de sclérodermie systémique doit répondre aux critères de classification 2013 de la Ligue européenne contre le rhumatisme (EULAR) et de l'American College of Rheumatology (ACR) (Figure 1). Il repose sur l'association de plusieurs critères cliniques :

- L'apparition d'un épaississement de la peau,
- La présence de lésions de la pulpe des doigts,
- La présence de télangiectasies cutanées,
- Le développement d'une atteinte pulmonaire,
- La présence d'un phénomène de Raynaud

Il repose également sur la présence d'anomalies à la capillaroscopie et d'un critère biologique : positivité d'un auto-anticorps anti-topoisomérase I ou centromère ou anti-ARN pol III.

Domaine	Critères *	Score #
Épaississement cutané (ne tenir compte que du score le plus élevé)	Épaississement cutané des doigts des mains s'étendant au-delà des articulations MCP	9
	Doigts boudinés	2
	Atteinte des doigts ne dépassant pas les articulations MCP	4
Lésions pulpaires (ne tenir compte que du score le plus élevé)	Ulcères pulpaires 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 Anticorps anti-centromères Anti-ARN polymerase de type III	3

** Le critère peut être retenu s'il est présent à un moment au moins de l'histoire clinique.*
 # Le poids de chaque item présent doit être associé pour obtenir un score total. Un score de 9 ou au-delà permet de classer les patients comme atteints de ScS.
ARN : acide ribonucléïque ; MCP : métacarpo-phalangiennes ; ScS : sclérodermie systémique.

Figure 1: Critères de classification ACR-EULAR de la sclérodermie systémique (Protocole National de Diagnostic et de Soins sur la Sclérodermie Systémique de la Haute Autorité de Santé)

Le score obtenu en utilisant ces critères n'est en aucun cas un score de gravité. Néanmoins, toute suspicion clinique de sclérodermie systémique doit donner lieu à une recherche d'anticorps antinucléaires et à la réalisation d'une capillaroscopie. Par rapport aux critères de l'ACR (36), les nouveaux items ont permis d'incorporer les caractéristiques de la SSc, à savoir la vasculopathie et la production d'auto-anticorps en plus de la fibrose initialement présente. Ces changements ont contribué à obtenir une sensibilité et une spécificité plus élevées dans le premier échantillon de validation (91% et 92%, respectivement) (37). En effet, la SSc est une maladie très hétérogène et tous les patients diagnostiqués comme ayant une sclérodermie systémique ne répondront pas à tous les critères de classification.

L'hétérogénéité des manifestations de la SSc est un problème majeur, et la classification des patients en sous-ensembles est couramment recherchée car les sous-types de la SSc ont des évolutions et des pronostics différents. L'extension de l'atteinte cutanée permet de classer les patients en deux grands sous-ensembles : la sclérodermie cutanée limitée et la sclérodermie cutanée diffuse (38) (Figure 2). L'atteinte cutanée de la sclérodermie cutanée limitée (SScL) est limitée aux coudes, aux genoux et au visage sans atteindre le tronc. La Sclérodermie cutanée diffuse (SScD) s'étend de façon proximale aux bras, aux cuisses et au tronc. Il est connu que ces sous-types sont associés à des évolutions différentes de la maladie. Une progression rapide de l'épaississement de la peau avec une fréquence élevée de pneumopathie interstitielle diffuse et d'atteinte de plusieurs organes est couramment observée dans le cas de la SScD, tandis que la SScL est souvent liée à un phénomène de Raynaud isolé existant depuis longtemps avant le diagnostic, et à une hypertension artérielle pulmonaire à apparition tardive.

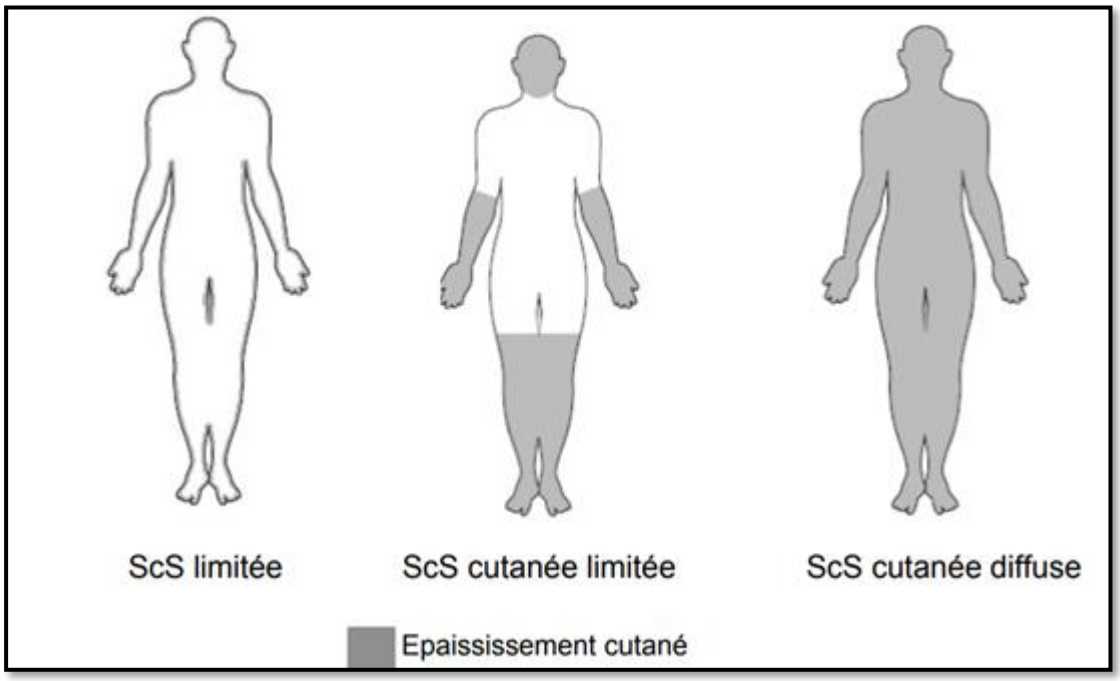


Figure 2: Critères de classification de la SSc en fonction de l'atteinte cutanée proposés par LeRoy et Medsger *(39)*.

Un autre sous-ensemble de patients ne présentant pas d'épaississement cutané possède une forme dite sine scleroderma, qui est caractérisée par l'absence de sclérose cutanée. Cependant, il persiste, dans cette forme clinique atypique, un phénomène de Raynaud ainsi qu'une atteinte viscérale. Si l'on considère les complications liées à la forme sine scleroderma, elles sont principalement liées à des anomalies du tractus digestif et des atteintes pulmonaires (40). Il a aussi été suggéré de considérer les syndromes de chevauchement incluant des manifestations de SSc comme un sous-ensemble distinct de la SSc en raison de différences dans l'évolution de la maladie, l'atteinte des organes et la distribution des auto-anticorps (41).

8.2 Atteinte cutanée :

L'atteinte de la peau est la manifestation clinique la plus visible et la plus invalidante chez le patient. Elle évolue en trois phases. Une première au cours de laquelle la peau des doigts apparait tendue, donnant un aspect gonflé c'est pourquoi les formes précoces sont parfois confondues avec une arthrite inflammatoire (42). Ensuite, une seconde phase ou la peau devient sèche, fine, rugueuse au toucher. Les doigts finissent par avoir une forme effilée et pointue qui est appelée sclérodactylie. Enfin, la peau s'atrophie et semble donner un aspect relativement normal (Figure 3). Cependant, de nombreux patients conservent un handicap important au niveau des mains comme des contractures, les doigts restent recourbés, difficiles à étendre et plier, ce qui rend les gestes du quotidien difficiles. La peau du visage est aussi

atteinte, les plis s'effacent, l'expression du visage diminue, le nez et les lèvres s'amincissent. Le traitement de l'atteinte cutanée nécessite des **médicaments immunosuppresseurs non spécifiques** comme les corticoïdes, le méthotrexate, le cyclophosphamide, le mycophénolate mofétil, mais ils sont utilisés hors autorisation de mise sur le marché. Très récemment d'autres immunosuppresseurs comme le rituximab ou le tocilizumab ont été proposés pour traiter l'atteinte cutanée de la SSc avec amélioration significative du score de Rodnan (43). En effet, l'étendue de la fibrose cutanée est souvent quantifiée à l'aide du score cutané de Rodnan modifié (mRSS) (Figure 4). Il évalue l'épaisseur de la peau sur 17 zones de la surface corporelle sur une échelle de 0 (normal) à 3 (grave) et dont le score total maximal est de 51 (44,45). Bien que le mRSS soit utilisé de façon routinière et qu'il se soit avéré fiable, valide et sensible aux changements, sa variabilité inter-observateur substantielle limite son utilité (44).



Figure 3: Les trois phases d'atteinte cutanée au cours de la sclérodermie systémique. Phase oedémateuse (gauche) phase atrophique (milieu) et phase indurative (droite) (46).

ANNEXE 1- Score de Rodnan Modifié (mRSS)

Ce score évalue 17 points du corps par la simple palpation cutanée et détermine l'importance de son épaississement :

0 = Épaisseur cutanée normale
1 = Épaississement minime
2 = Epaississement modéré
3 = Épaississement sévère

Il s'agit d'un score non invasif, facile à réaliser mais nécessitant un apprentissage, validé comme marqueur pronostique par plusieurs études (Clements, Lachenbruch et al. 1993). Le total est sur 51.

	DROIT				GAUCHE			
Doigts	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3
Mains	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3
Avant-bras	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3
Bras	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3
Cuisses	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3
Jambes	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3
Pieds	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3

Face	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3
Face antérieure du thorax	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3
Abdomen	□ 0	□ 1	□ 2	□ 3

Figure 4: Evaluation de la sclérose cutanée par le score de Rodnan modifié (Protocole National de Diagnostic et de Soins sur la Sclérodermie Systémique de la Haute Autorité de Santé).

La calcinose survient chez 20 à 40 % des patients. Peu visible cliniquement, une radiographie permet autant de les détecter aisément que d'autres techniques d'imagerie (47). La calcinose peut provoquer des douleurs importantes dues à l'ulcération à travers la peau, à l'infection surajoutée et aux effets de pression locaux (48). Il est également possible de retrouver des prurits, une dépigmentation de la peau ainsi que d'autres symptômes ayant une origine vasculaire. Ces symptômes causés notamment par des microangiopathies organiques, dues à une atteinte microcirculatoire présente dès le début de la maladie. Elles sont mises en évidence par la capillaroscopie péri-unguéale qui permet d'objectiver la raréfaction capillaire, la désorganisation des anses et la présence de mégacapillaires (Figure 5).

Parmi ces symptômes vasculaires on retrouve le phénomène de Raynaud dans 95% des cas. Il précède les autres manifestations cliniques de la maladie de 10 ans. Il s'agit d'un engourdissement et associe une pâleur initiale (vasospasme), suivie d'une cyanose (séquestration de sang désoxygéné) et enfin d'une hyperémie (reperfusion) des doigts qui est déclenchée par le froid ou le stress qui peut durer entre quelques minutes et plusieurs heures (49). La dilatation des vaisseaux capillaires situés sous la peau donne des télangiectasies. Elles

sont l'une des manifestations les plus visibles de la vasculopathie et peuvent être observées sur différentes parties du corps, notamment le visage, les jambes, le nez, les joues et le menton. La manifestation vasculaire la plus invalidante reste la présence des ulcères digitaux notamment au niveau digital. Plus de la moitié des ulcères se manifeste dans les 5 premières années suivant le diagnostic, et est associée à une évolution plus sévère de la maladie, notamment à une atteinte des organes internes (50,51). Les ulcères ont un impact significatif sur la fonction de la main et la qualité de vie (52,53). Les ulcères digitaux peuvent s'infecter et potentiellement évoluer vers l'ostéomyélite (54) ou vers une gangrène digitale nécessitant une prise en charge rapide (55). En plus de l'éviction du froid pour se prévenir des phénomènes vasculaires, des traitements pharmacologiques peuvent être utilisés administrés pour diminuer les vasoconstrictions. Des inhibiteurs calciques constituent le traitement de première intention et, en cas de résistance ou intolérance à ces derniers, le patient peut se faire prescrire d'autres vasodilatateurs comme les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine ou les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. En cas d'ulcères, les inhibiteurs calciques, analogues de la prostacycline ont montré peu d'effets. Seuls le bosentan antagoniste du récepteur à l'endothéline, et le sildénafil, un inhibiteur de la phophodiestérase de type 5, semblent montrer un effet assez modéré.

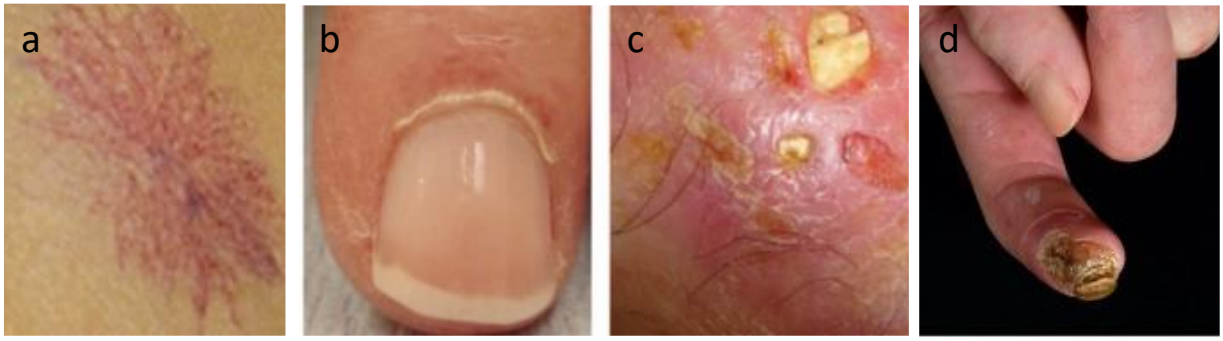


Figure 5: Images d'atteintes cutanées au cours de la SSc correspondant à une télangiectasie cutanée (a), des mégacapillaires (b) une calcinose (c) et un ulcère digital ischémique (d).

8.3 Atteinte musculosquelettique

Une maladie musculaire inflammatoire (myosite) peut se développer chez les patients atteints de SSc et affecte généralement la musculature proximale. Elle se caractérise par l'apparition de douleurs ou faiblesses musculaires entraînant un déficit moteur. Les tendons peuvent également être atteints. Au niveau des articulations les douleurs et les raideurs sont courantes et d'origine multifactorielle inflammatoire (de type rhumatoïde) et non inflammatoire (dégénérative/ostéoarthritique) du fait de la tension, de la sclérose de la peau

et des contractures des doigts (17). De plus, des calcinoses surviennent chez certains des malades autour des articulations, en particulier au niveau des doigts, coudes et chevilles (Figure 6). Les mouvements sont alors considérablement gênés. Le syndrome du canal carpien bilatéral peut survenir tôt dans l'évolution de la maladie chez les patients atteints de SSc cutanée diffuse et constitue parfois la première manifestation non rhumatismale de la maladie. Les arthralgies ne sont actuellement soulagées que par utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens sur une courte durée, avec une surveillance de la fonction rénale et après évaluation du risque de saignement digestif ou bien par corticoïdes.



Figure 6 : Principales atteintes musculosquelettiques. (Gauche) Contracture digitale. (Milieu) Calcinoses. (Droite) Aco-ostéolyse (46).

8.4 Atteinte pulmonaire

Au cours de la sclérodermie systémique, 80% des patients développeront une pneumopathie interstitielle diffuse (PID). La PID correspond à une inflammation et une fibrose pulmonaire, en particulier du tissu interstitiel qui entoure les alvéoles. Cette fibrose altère les fonctions pulmonaires telles que la compliance pulmonaire, la capacité de diffusion du dioxyde de carbone (DLCO) et la capacité pulmonaire. Les symptômes les plus fréquents sont l'apparition de toux, d'un essoufflement, de fatigue et des douleurs thoraciques. Elle représente avec l'hypertension artérielle pulmonaire environ 50 % des décès (56). Les anomalies liées à la PID sont mises en évidence par la tomodensitométrie à haute résolution (TDM-HR) du thorax (Figure 7). Au début de la maladie, on observe une "opacification en verre dépoli" sur les images tomodensitométriques à haute résolution du thorax, qui peut évoluer vers un aspect en "nid d'abeille" (57). Le lavage broncho-alvéolaire et la biopsie pulmonaire n'ont pas démontré leur valeur diagnostique ou prédictive et sont donc rarement indiqués.

L'utilisation de tests spirométriques n'est pas assez sensible ni spécifique pour diagnostiquer une pneumopathie interstitielle précoce. Un scanner à haute résolution est nécessaire pour confirmer le diagnostic (58,59) mais n'est pas nécessaire pour le suivi de la fonction pulmonaire. En effet, même si 80% des patients possèdent une PID à la tomodensitométrie, seuls 30 à 40 % des patients développeront des signes cliniques de l'atteinte pulmonaire (60,61). L'évolution de la PID doit donc être évaluée par des tests de spirométrie avec mesure du transfert gazeux objectivé par la DLCO. Environ 40% des patients décèdent de PID dans les 10 ans (62). Bien que la prévalence de la PID augmente au cours de l'évolution de la maladie, elle apparaît le plus souvent dans les 5 ans suivants le premier symptôme de phénomène non-Raynaud (63), et son développement précoce est le plus souvent associé à un pronostic péjoratif (64). L'oxygénothérapie de déambulation peut être utilisée chez les patients ayant une désaturation d'oxygène à l'exercice < 80 %, ou une désaturation d'oxygène à l'exercice < 85-89 % associée à une dyspnée d'effort importante ou à une limitation à l'exercice s'améliorant sous oxygène. L'utilisation de cyclophosphamide et de mycophénolate mofétil limitent la dégradation de la fonction respiratoire lorsqu'ils sont administrés pendant les 2 premières années. Le nintédanib peut aussi être employé seul ou en association avec un immunosuppresseur. Enfin, des études ont montré un effet du tocilizumab et du rituximab dans la fonction pulmonaire, mais l'absence d'étude sur le tocilizumab dans une étude avec PID établie et d'essai clinique de grande envergure pour le rituximab ne permettent pas de le proposer en première intention. En cas de dernière nécessité, la transplantation pulmonaire peut être envisagée dans les PID avec insuffisance respiratoire sévère.

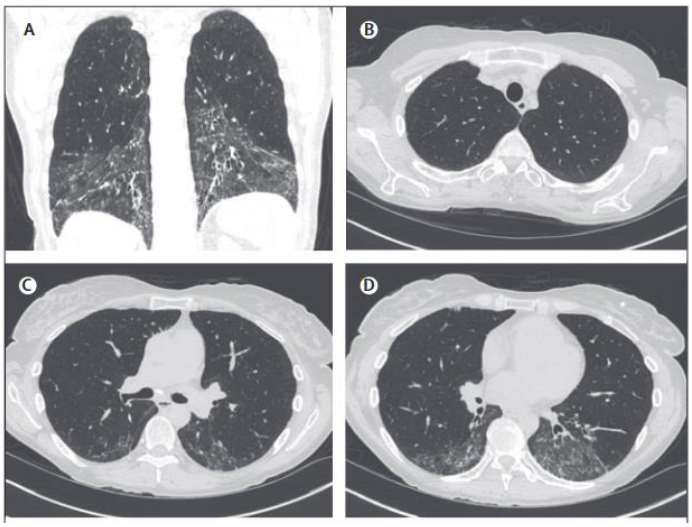


Figure 7: TDM thoracique haute résolution à partir de vues coronales (A) et sagittales (B – D) montrant une pneumopathie interstitielle diffuse non spécifique avec des opacités vitreuses, des réticulations et des bronchectasies de traction avec une distribution périphérique, un gradient apicobasal et une épargne sous-pleurale (65).

8.5 Atteinte rénale

L'atteinte rénale dans la SSc se manifeste souvent sous la forme d'une **crise rénale hypertensive**, touchant 5 à 10 % des patients SSc (Denton et al, 2009). Auparavant, elle était la principale cause de décès dans la SSc, mais grâce à l'introduction du traitement par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), il est aujourd'hui possible de survivre à cette complication. Les facteurs de risque incluent la corticothérapie (>15 mg/jour), la maladie précoce (<4 ans), la SScD, les frottements de tendons et les auto-anticorps anti-ARN pol III (66). La fonction rénale peut continuer à s'améliorer sous traitement plusieurs années après la crise rénale sclérodermique, permettant à certains patients d'arrêter leur traitement de substitution rénale (67). En dehors de la crise rénale hypertensive, les autres atteintes sont minimes et n'entraînent que peu de symptômes.

8.6 L'atteinte digestive

L'atteinte gastro-intestinale est fréquente chez les patients atteints SSc, touchant généralement 75 à 90 % d'entre eux. Elle peut affecter tout le tractus gastro-intestinal, de la bouche à l'anus (68). L'atteinte de l'œsophage est souvent précoce et peut précéder le syndrome de Raynaud. Une réduction de la motilité œsophagienne, une gastroparésie, des difficultés à avaler, des reflux gastro-intestinaux, des ulcères et des sténoses œsophagiennes peuvent provoquer des difficultés pour manger. Les nerfs et les muscles impliqués dans la progression des aliments dans l'intestin peuvent également être atteints, entraînant parfois une incontinence. La prolifération bactérienne dans l'intestin grêle peut entraîner une malabsorption et des symptômes abdominaux tels que ballonnements et diarrhées. Dans certains cas une cholangite biliaire primitive peut survenir chez les patients (69).

8.7 Atteinte cardiovasculaire

Les manifestations cardiovasculaire sont fréquentes avec une prévalence de 15 à 35% (70,71). Les manifestations cardiaques de la sclérodermie systémique peuvent affecter toutes les structures du cœur et peuvent entraîner un épanchement péricardique, des arythmies, des défauts du système de conduction, une altération valvulaire, une ischémie myocardique, une hypertrophie myocardique et une insuffisance cardiaque (72). Ces manifestations cardiaques primaires résultent probablement de la pathologie vasculaire sous-jacente de la sclérodermie systémique, c'est-à-dire des lésions vasculaires caractéristiques et de la fibrose qui altèrent la microcirculation et la fonction myocardique. Les premières manifestations myocardiques de la sclérodermie systémique sont souvent non spécifiques, ce qui rend l'évaluation des patients à

risque problématique. Les patients présentant des manifestations cardiaques peuvent donc rester non diagnostiqués, ce qui peut permettre à la maladie de progresser silencieusement.

La fibrose myocardique est une manifestation cardiaque caractéristique de la sclérodermie systémique qui peut rester subclinique pendant une période considérable. Elle peut entraîner un dysfonctionnement systolique et diastolique, une hypertrophie ventriculaire et une altération de la relaxation du tissu myocardique pendant la diastole. Il n'existe pas de traitement spécifique connu pour l'atteinte myocardique de la sclérodermie systémique, mais le contrôle étroit de l'hypertension systémique et la prise en charge agressive précoce de l'hypertension pulmonaire sont importants pour prévenir les lésions cardiaques secondaires.

Un risque accru de maladie cardiovasculaire a également été signalé chez les patients atteints de SSc (73) mais il n'est pas toujours lié à l'athérosclérose classique et au remodelage des vaisseaux de la SSc, qui affecte principalement les petits vaisseaux mais cible parfois aussi les plus gros. Une anomalie de la microcirculation myocardique qui se manifeste généralement tardivement chez les patients atteints de SSc est la réduction de la réserve de flux coronaire, qui résulterait d'anomalies structurelles fixes des petites artères coronaires et des artérioles. Ceci a été étudié chez des patients atteints de SScD avec une atteinte myocardique établie et des artériographies coronariennes normales (74).

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) survient chez environ 15 % des patients, en particulier chez ceux qui présentent une SScL, un phénomène de Raynaud de longue date et des manifestations vasculaires importantes (75,76). Il existe d’autres facteurs de l’HTAP, ces derniers sont : une plus longue durée de la maladie, la présence d'anticorps anti-centromère et un nombre élevé de télangiectasies (77). Les symptômes associés à l'HTAP ne sont pas spécifiques et surviennent généralement à un stade avancé de la maladie. De plus, bien que l'échocardiographie puisse identifier les stades ultérieurs de la maladie, elle n'est pas assez sensible pour détecter les atteintes précoces. Les recommandations suggèrent que le cathétérisme cardiaque droit est approprié pour les patients présentant une dyspnée inexpliquée ou progressive, une DLCO disproportionnellement basse, des preuves échocardiographiques de pressions artérielles pulmonaires élevées et/ou des preuves de surcharge volumique du ventricule droit, telles que l'augmentation des taux sériques de peptide pro-natriurétique amino-terminal (NT pro-BNP) (78,79). Les recommandations de prise en charge des patients atteints d’HTAP associée à la SSc sont basées sur celles de l’HTAP idiopathique qui suit les recommandations jointes des sociétés européennes de cardiologie et de pneumologie. Les inhibiteurs calciques ne sont pas recommandés dans le traitement de

l'HATP associée à la SSc mais comme de nombreux patients sont traités par inhibiteurs calciques pour leur syndrome de Raynaud, ceux-ci peuvent être maintenus en cas d'HTAP. Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline comme le bosentan et l'ambrisentan peuvent être employés. Cependant, l'ambrisentan est contre-indiqué dans les fibroses pulmonaires idiopathiques donc peu recommandé dans le cas d'une SSc-ILD. Les inhibiteurs de phosphodiestérase sont approuvés dans le traitement de l'HTAP sans surveillance biologique pour les patients. L'injection intraveineuse d'époprosténol constitue le traitement de référence dans les formes graves d'HTAP associée à la SSc.

8.8 Cancer dans la SSc

Il existe une forte association entre la SSc et l'apparition de cancer (80). Le risque de développer des tumeurs solides chez les patients atteints de SSc par rapport à la population générale serait de 1,4 à 1,75 fois plus important. Les tumeurs retrouvées sont des cancers du poumons, les lymphomes et leucémies aigues (81,82). Les patients avec des auto-anticorps anti-ARN pol III sont aussi plus à risque de développer des cancer avec un risque multiplié par 2,84. Parmi les patients positifs pour les auto-anticorps anti-ARN Pol III, ceux avec une SScD auraient un risque accru de cancer du sein, tandis que ceux avec une SScL auraient un risque élevé de cancer du poumon (83)

Les patients, présentant un cancer et qui sont positifs pour les auto-anticorps anti-ARN Pol III, révèlent des modifications génétiques au niveau du locus POLR3A qui code pour l'ARN polymérase III dans leurs tumeurs. Ils montrent aussi des réponses immunitaires spécifiquement adaptées aux différentes mutations observées (84).

9 Physiopathologie

La physiopathologie de la SSc est multifactorielle, complexe et encore mal comprise ce qui pose des défis majeurs pour son diagnostic et sa prise en charge. L'une des raisons sous-jacentes à cette complexité est l'hétérogénéité clinique et pathologique de la maladie, avec des patients présentant une variété importante de symptômes et de manifestations. Toutefois, malgré cette diversité clinique, trois composantes principales émergent dans la majorité des cas : la vasculopathie, l'activation immunitaire et la fibrose. Ces éléments, bien qu'ils soient étroitement liés, contribuent chacun de manière distincte à la progression et à l'expression clinique de la sclérodermie. L'interrelation de ces composantes renforce la complexité de la

maladie et met en évidence la nécessité d'approfondir nos connaissances pour développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces.

9.1 L'activation du système immunitaire

L'activation du système immunitaire joue un rôle prépondérant dans la SSc et contribue au développement d'un microenvironnement anormal, entraînant un déséquilibre entre l'inflammation et la réparation tissulaire (85). Cette activation est généralement initiée par des pathogènes ou des agents toxiques. Ils activent en premier lieu les cellules de l'immunité innée puis, dans un second temps le système immunitaire adaptatif qui est impliqué dans les processus auto-immuns. Les manifestations auto-immunes se caractérisent par l'activation des lymphocytes T et B, la production d'auto-anticorps spécifiques et la libération de cytokines pro-inflammatoires. Ces événements immunitaires sont non seulement des marqueurs diagnostiques de la SSc, mais ils contribuent également à la progression de la fibrose et à l'atteinte vasculaire.

Habituellement la réponse immunitaire se découpe en plusieurs phases :

1/ Une phase de réponse précoce qui commence dès la détection d'un agent pathogène ou d'une lésion tissulaire par les cellules de l'immunité innée. Ces cellules détectent des signaux de danger à l'aide de récepteurs spécifiques : les récepteurs de reconnaissance aux motifs (PRR) situés à la surface et dans la cellule. Ils comprennent les récepteurs de type Toll (TLR), les récepteurs de type Nod (NLR), les récepteurs de type Rig-I (RLR), la synthase de la Guanosine monophosphate et de l'adénosine monophosphate cyclique, et le récepteur des produits de glycation avancée. Il s'ensuit une libération de médiateurs inflammatoires comme les cytokines, prostaglandines, et médiateurs chimiques par les cellules de l'immunité innée et les plaquettes. Ces médiateurs augmentent la perméabilité des vaisseaux sanguins et attirent d'autres cellules immunitaires vers le site de l'inflammation.

2/ Une phase de réponse intermédiaire qui a lieu quelques heures après l'évènement initial met en jeu les composants cellulaires de l'immunité innée et adaptative. Les cellules de l'immunité innée, en particulier les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, phagocytent et détruisent les agents pathogènes. Parallèlement, les cellules dendritiques capturent les antigènes et migrent vers les ganglions lymphatiques où elles activent l'immunité adaptative. Les lymphocytes T, reconnaissant les antigènes présentés via le complexe majeur d'histocompatibilité, se différencient en lymphocytes T CD4 et lymphocytes TCD8 tandis que

les lymphocytes B stimulés par les lymphocytes TCD4 vont se différencier en plasmocytes pour produire des anticorps.

3/ La phase de réparation tissulaire ou cicatrisation initiée par les macrophages où des médiateurs anti-inflammatoires sont libérés pour diminuer la réponse inflammatoire. Les cellules immunitaires commencent à être éliminées du site de l'inflammation. Ensuite les fibroblastes migrent vers le site de l'inflammation pour commencer la réparation tissulaire, en produisant du collagène et d'autres composants de la matrice extracellulaire pour aboutir à restaurer l'architecture normale du tissu.

La compréhension de la composante auto-immune est essentielle pour comprendre les processus pathogéniques de la SSc, mettre en évidence de nouveaux marqueurs prédictifs et développer des thérapies spécifiques de la pathologie visant à moduler la réponse immunitaire dans cette pathologie. En effet, dès le début de la SSc, il est observé un infiltrat leucocytaire péri-vasculaire composé principalement de macrophages et de lymphocytes T (86). Dans le cadre de ce travail, seule la partie concernant le système immunitaire adaptatif c'est-à-dire les lymphocytes T, B et les auto-anticorps sera développée.

9.1.1 Activation lymphocytaire

Parmi les lymphocytes T, plusieurs sous-types sont impliqués dans le développement de la SSc (Figure 8). La balance entre les lymphocytes Th1 producteurs d'IFN-γ, qui participent à la défense contre les pathogènes intracellulaires, et les lymphocytes Th2 producteurs d'IL-4, IL-13 qui participent à la défense contre les microorganismes extracellulaires, est fortement en faveur d'une réponse Th2 (87). Les lymphocytes TCD4 retrouvés au niveau de la peau de patients SSc sont orientés vers une réponse Th2 (88). Ces derniers participent aux phénomènes de fibrose par augmentation de production de matrice extracellulaire avec la sécrétion d'IL-4 et IL-13 (89). Le sang des patients est aussi enrichi en lymphocytes Th17, cellules qui jouent un rôle dans la protection contre les infections bactériennes et fongiques. Les taux de lymphocytes Th17 circulants corrèlent avec la sévérité de la SSc (90). Le rôle des lymphocytes T régulateurs est encore mal connu puisque ces derniers peuvent sécréter de l'IL-10 et du TGF-β. Bien qu'ils soient augmentés dans la SSc, certaines études suggèrent qu'ils ne sont pas suffisamment efficaces pour compenser l'activation exacerbée du système immunitaire (90,91). Un nouveau sous-ensemble de lymphocytes TCD4 exprimant les marqueurs CD3, CD31 et le récepteur au SDF-1 désigne des lymphocytes T angiogéniques (Tang) (92). Ils sont capables de stimuler la différenciation des cellules progénitrices endothéliales précoces et la prolifération des cellules endothéliales, favorisant ainsi la réparation des cellules endothéliales grâce à la production de VEGF et de MMP-9. Ces cellules

sont nettement augmentées chez les patients souffrant d'ulcères digitaux et négativement corrélées aux concentrations de SDF-1 dans le sang périphérique de patients atteints de SSc (93). Les lymphocytes TCD8 cytotoxiques jouent aussi un rôle dans l'inflammation et la fibrose au cours de la SSc comme a pu suggérer une analyse transcriptomique d'échantillons cutanés de 48 patients avec SSc cutanée diffuse qui met en évidence une réponse TCD8 augmentée. Cette signature TCD8 est d'autant plus importante que les maladies sont précoces (94). De plus, alors que les valeurs des lymphocytes TCD8 circulants sont diminuées chez des patients SSc, les tissus fibrosés comme le poumon sont enrichis en lymphocytes TCD8 suggérant leur recrutement puis leur participation à l'inflammation locale (87). Les lymphocytes B contribuent aussi à la pathogenèse de la SSc étant donné leur fonction de cellule présentatrice d'antigène, leur capacité à produire des anticorps et sécréter des cytokines. Dans un modèle murin de sclérodermie induite par bléomycine, les lymphocytes B retrouvés dans la peau étaient capables de produire de l'IL-6. A contrario, les lymphocytes B régulateurs sécrétant de l'IL-10 étaient diminués (95). Ces résultats sont similaires à une autre étude qui montrait une élévation des lymphocytes B dans le sang de patients SSc et dans la rate de souris avec fibrose induite par acide hypochloreux (96). La déplétion des lymphocytes B dans le modèle génétique de SSc induit par une délétion hétérozygote du gène Tsk chez la souris réduit aussi le dépôt de collagène cutané et la production d'auto-anticorps sur des souris (97). Les lymphocytes B pourraient aussi participer à la polarisation des macrophages vers une réponse M2 car la déplétion des lymphocytes B dans le modèle murin de la SSc induite par la bléomycine est associée à une diminution du nombre de macrophages M2 pro-fibrotiques, rappelant l'interaction entre l'immunité adaptative et innée dans la pathogenèse de la SSc (98).

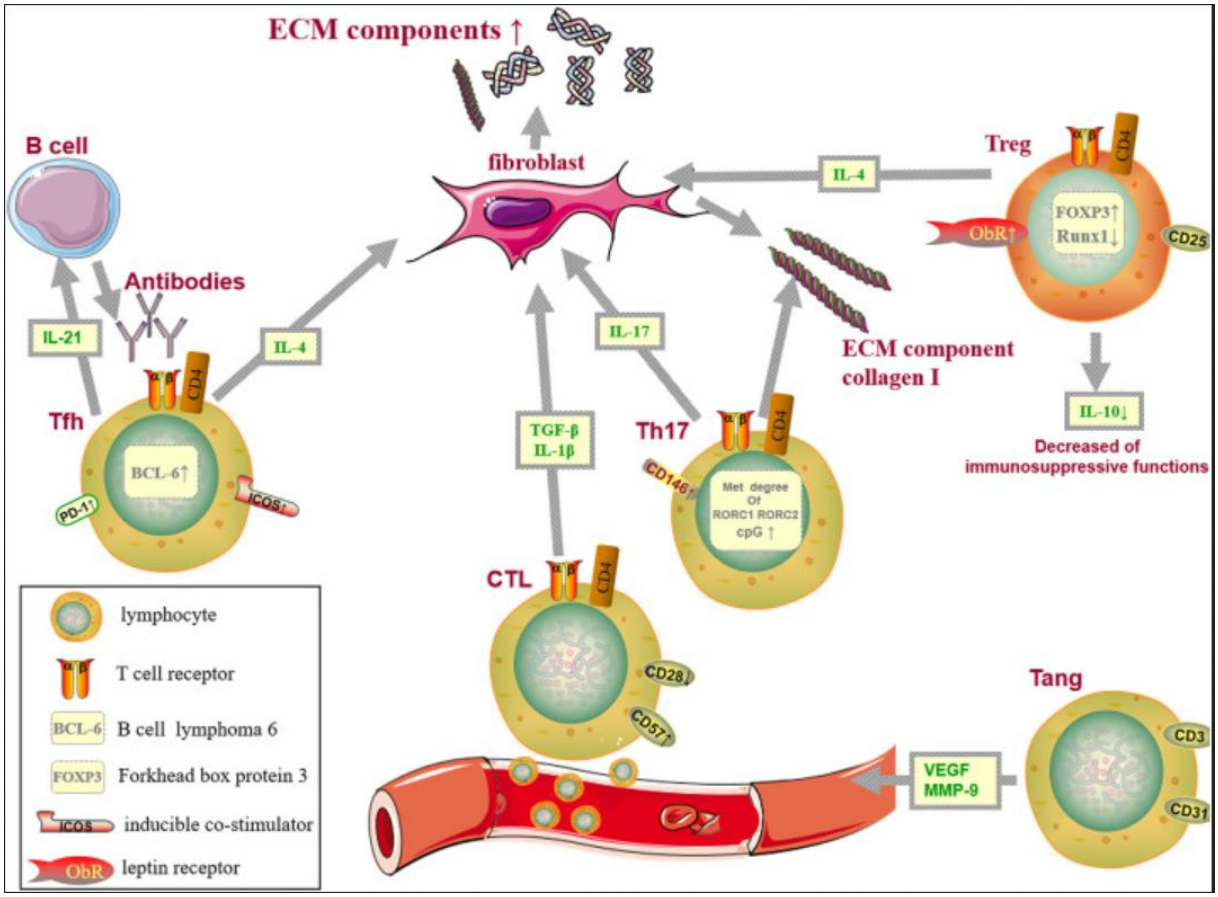


Figure 8: Apport des lymphocytes T dans le développement de la SSc. ECM, matrice extracellulaire ; CTL, lymphocyte T cytotoxique ; Tfh, lymphocytes T auxiliaires folliculaires T ; Treg, lymphocytes T régulateurs ; Tang, Lymphocytes T angiogéniques (93).

9.1.2 Production d'Auto-anticorps

Des auto-anticorps anti-nucléaires sont retrouvés chez plus de 90% des patients atteints de sclérodermie systémique (99) et (100). Ces auto-anticorps représentent des outils diagnostiques en faisant partie des critères de définition pour certains, et des outils pronostiques définissant souvent des formes cliniques de sclérodermie (101), (102). Les auto-anticorps anti-centromère, anti-topoisomérase I, anti-ARN pol III, anti-fibrillarine et anti Th/To sont décrits dans la sclérodermie systémique bien que seuls les trois premiers soient des auto-anticorps de définition selon les critères de l'ACR-EULAR en raison de leur plus grande fréquence dans la population que les deux derniers. D'autres marqueurs tels que les auto-anticorps anti PM-Scl, U1-RNP, Ku, NOR90 sont présents dans des sclérodermies de chevauchement associées à d'autres maladies auto-immunes comme la polymyosite, le lupus érythémateux disséminé Tableau 2.

Spécificités des anticorps antinucléaires	Aspect de la fluorescence	% de patients	Forme de la maladie	Phénotype Clinique
Ac anti-centromère	Centromérique	20 à 40 %	ScS cutanée limitée	HTAP Atteinte vasculaire périphérique sévère
anti-Scl-70 ou Ac anti-topoisomérase	Homogène et nucléolaire	20 à 30 %	ScS cutanée diffuse	PID sévère Atteinte vasculaire périphérique sévère
anti-ARN polymérase de type III	Mouchetée (± nucléolaire)	20 à 25 % chez les caucasiens d'Amérique du Nord, au Royaume-Uni et environ 5 % en France, en Allemagne, en Italie et au Japon	ScS cutanée diffuse	Atteinte cutanée rapidement progressive Crise rénale sclérodermique Cancer
anti-U3-RNP (anti-fibrillarine)	Nucléolaire	Dans 4 à 10 %	ScS cutanée diffuse > ScS cutanée limitée	PID HTAP Crise rénale Atteinte digestive du grêle
Anti-Th/To	Nucléolaire	2 à 5 %	ScS cutanée limitée	PID HTAP
Anti-Pm-Scl	Moucheté et nucléolaire	2%	ScS cutanée limitée (chevauchement avec myosite)	Myosite
Anti-U1 RNP	Mouchetée		ScS cutanée limitée (chevauchement, MCTD)	Arthrite Myosite HTAP
Anti U11/U12 RNP	Mouchetée	1 à 3 %	ScS cutanée diffuse / ScS cutanée limitée	PID sévère
Anti-Ku	Mouchetée		ScS cutanée limitée (syndrome de chevauchement avec myosite)	Myosite
Anti-RuvBL 1/2	Mouchetée	1 à 3 %	ScS cutanée diffuse (chevauchement myosite)	Myosite

Ac : anticorps ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire ; PID : pneumopathie infiltrante diffuse ; ARN : acide ribonucléique ; RNP : ribonucléoprotéine ; MCTD : mixed connective tissue disease.

Tableau 2: Anticorps antinucléaires associés à la SSc d'après le PNDS.

La recherche d'auto-anticorps anti-nucléaires constitue l'examen de première intention lors d'une suspicion de SSc. La méthode de référence actuelle (préconisée dans la nomenclature des actes de biologie médicale depuis 1996) est la lecture par immunofluorescence indirecte sur cellules Hep-2. Elle se réalise en deux étapes, une première de dépistage, qui se réalise avec le sérum du patient dilué au seuil de positivité du laboratoire et une seconde de titrage si le dépistage est positif. L'aspect de fluorescence indique la spécificité des auto-anticorps recherché (Figure 9).

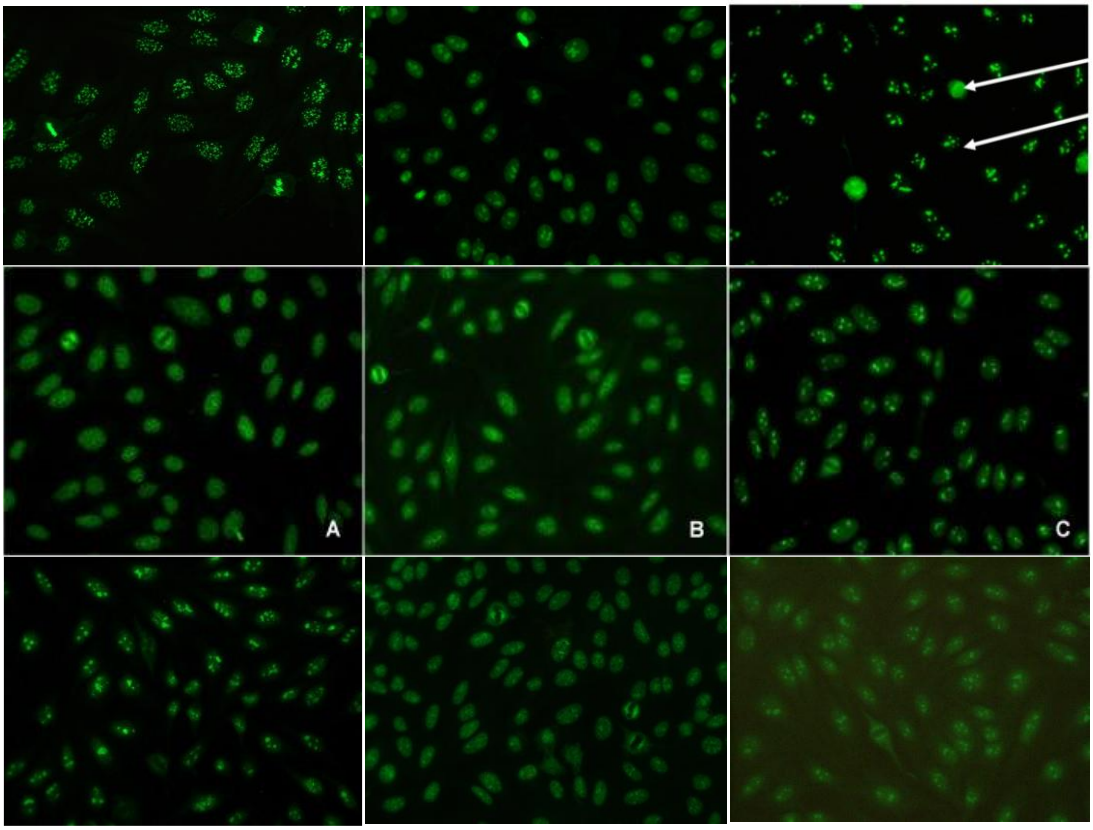


Figure 9: Aspect des auto-anticorps antinucléaires sur cellules HEp-2 associés à la SSc. Anticorps anti-centromère (haut droite), anti-topoisomérase I (haut centre), fibrillarine (haut droite), RNA polymérase III (milieu gauche, centre et droite), anti-Th/To (bas gauche), anti-Ku (bas centre) et anti-PM-Scl (bas droite).

Il est ensuite possible de chercher la spécificité des auto-anticorps par des méthodes quantitatives qui sont le plus généralement des tests ELIA ou des tests de spectrofluorimétrie. Certaines cibles antigéniques dans la SSc comme les anticorps anti-Th/To sont plus rares et sont recherchées par une technique d'immunoblot permettant un dosage semi-quantitatif des auto-anticorps.

Les anticorps anti-centromère reconnaissent 3 principales protéines centromériques : CENP-A, CENPB et CENP-C, localisées dans le kinétochore, structure qui lie le centromère du chromosome au fuseau mitotique pendant la division cellulaire et dont le poids moléculaire est respectivement 17, 80 et 140 kDa (100). La prévalence des auto-anticorps anti-centromère au cours de la sclérodermie systémique est de 20 à 30 %, elle est d'autant plus élevée que la sclérodermie systémique est limitée pour atteindre 70% dans cette forme clinique contre 5% des formes diffuses (103), (104). De plus, les auto-anticorps anti-centromère peuvent exister dès le début de la maladie au stade du phénomène de Raynaud isolé, auquel cas ils sont prédictifs d'une évolution vers la sclérodermie (105). Certains auteurs considèrent l'anticorps anti-centromère comme marqueur potentiel de l'atteinte œsophagienne au cours de la

sclérodermie systémique (104). Ils sont plus souvent reliés à des manifestations vasculaires graves comme l'HTAP ou l'ischémie digitale (106).

Les auto-anticorps anti Scl70 sont dirigés contre l'ARN topoisomérase I, une protéine responsable de la relaxation et du super-enroulement de l'ADN, elle est également retrouvée dans le nucléole et dans les régions d'organisation du nucléole (NOR) (100) d'où l'aspect homogène nucléolaire retrouvé en immunofluorescence. L'ADN topoisomérase a sous sa forme native un poids moléculaire de 100 kDa avec un produit de dégradation de 70 kDa qui est l'épitope majeur des anticorps anti topoisomérase (107). Ils sont présents dans 30 à 70 % des cas de sclérodermies systémiques diffuses, particulièrement au cours de la fibrose interstitielle pulmonaire (108), et également lors de l'atteinte cardiaque (109,110). Il existe en outre une association significative entre le taux d'anticorps anti-topoisomérase I et le degré d'extension cutanée (106). Leur sensibilité est de l'ordre de 43 % (104).

Les ARN pol I, II, III sont des complexes enzymatiques permettant la synthèse et la transcription de gènes à partir de l'ADN (104). Ces ARN pol constituent les cibles antigéniques des anticorps anti-ARN Pol avec principalement des protéines de l'ordre de 190 et 120 kDa pour le type I, 220 et 145 kDa pour le type II, 155 et 138 kDa pour le type III (111). Les anticorps anti-ARN Pol I/ II/III sont présents dans 10 à 20 % des sclérodermies systémiques avec une fréquence élevée d'atteinte rénale (103,112). Ils donnent différents aspects sur cellules HEp-2, moucheté, moucheté nucléolaire, nucléolaire et parfois non visible (113). Les anticorps précipitant les ARN Pol I et III sont spécifiques de la sclérodermie systémique, définissant des formes avec atteinte viscérale majeure dominée par le risque de crise rénale hypertensive et une plus grande fréquence de développer des cancers. Les anticorps anti-ARN Pol II reconnaissent au moins deux épitopes dont un est dû à la phosphorylation d'une sous-unité de 220 kDa. Ils sont moins spécifiques de la sclérodermie systémique où ils peuvent s'associer avec les anticorps anti-Scl70 (111).

Les anticorps anti-U3-RNP/fibrillarine (AFA) reconnaissent la ribonucléoprotéine U3 (U3-RNP), un complexe nucléolaire impliqué dans le traitement du pré-ARN ribosomal (114). Ils donnent en immunofluorescence indirecte sur cellules Hep-2 un motif nucléolaire et sont associés à une apparition plus précoce de la maladie, une forme cutanée diffuse et une diminution de la survie (115). Leur fréquence est estimée entre 0 et 18,5% chez les patients atteints de SSc et leur prévalence est plus importante chez les patients afro-américains (116). Même s'ils sont retrouvés dans d'autres pathologies que la SSc, notre groupe a mis en évidence qu'un titre élevé d'AFA est spécifique de la SSc (117). Dans le contexte de la Ssc, la positivité des AFA

semble généralement exclusive aux autoanticorps de définition de la SSc. Devant la négativité des auto-anticorps classiques il est donc pertinent d'aller rechercher les AFA.

Les antigènes Th/To sont situés dans le nucléole du noyau cellulaire. Les anticorps anti-Th/To reconnaissent deux endoribonucléases : la ribonucléoprotéine 7-2/MRP-RNP (Th) et la ribonucléase 8-2/RNP (To) ; le complexe antigénique est de 40 kD. Ils présentent une coloration nucléolaire par immunofluorescence indirecte sur les cellules HEp-2. Une revue de la littérature donne une fréquence moyenne des auto-anticorps anti-Th/To de 3,3% dans la population mondiale avec une fréquence de 4,7% en Asie et Océanie et de 1,5% en Europe. Ils sont plus fréquemment associés à une forme Cutanée limitée (87,5% des cas). Leur atteinte cutanée reste inférieure à celle des patients avec auto-anticorps anti-centromère de même que l'apparition d'ulcères et autres manifestations vasculaires. En revanche, ils développent plus fréquemment une fibrose pulmonaire. La spécificité des auto-anticorps anti-Th/To pour la SSc est située entre 90 et 99% et leur co-positivité avec les autres auto-anticorps dits classiques de la SSc est très rare. Etant donné leur fréquence, le dépistage des Th/To semble plus utile après une recherche négative des anticorps anti-centromère, anti-Scl70, anti-PM-Scl, anti-RNP, anti-ARN pol III, anti-fibrillarine et anti-NOR 90 (118).

D'autres auto-anticorps ciblant une variété d'auto-antigènes cytoplasmiques, membranaires et extracellulaires ont également été détectés dans la SSc (119) en plus des anticorps « classiques » (Figure 10). Certains d'entre eux sont des auto-anticorps **anti-cellules endothéliales** qui provoquent l'apoptose des cellules endothéliales (120). Par exemple les anticorps anti-molécule d'adhésion intercellulaire 1 induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (121). Les anticorps anti-récepteurs de l'endothéline de type A (ETAR) et anti-récepteur de l'angiotensine II de type I (A1TR) augmentent l'expression de TGF-β, IL-8, et VCAM-1 dans les cellules endothéliales, provoquant fibrose, vasoconstriction, et recrutement de cellules immunitaires. Ils peuvent également induire une vasculopathie oblitérante lorsqu'ils sont injectés dans des souris (122). Il existe aussi des anticorps dirigés contre une protéine UL94 dérivée du cytomégalovirus humain, qui présente une homologie avec le NAG-2 (tétraspan novel antigen-2), exprimé à la surface des cellules endothéliales et des fibroblastes humains (123,124). D'autres anticorps ciblent les fibroblastes, comme les anti-PDGFR qui induisent l'expression de ROS, des composants de la matrice extracellulaire ou des métalloprotéinases dégradant la matrice ont été décrits chez les patients atteints de SSc et pourraient jouer un rôle direct dans la pathogenèse de la maladie (125).

Notre équipe a identifié la présence d'un autre type d'auto-anticorps chez l'homme qui cibleraient probablement la cellule endothéliale puisque la spécificité de cet anticorps est le CD146 (Brevet n°WO2012098256A1) présent à la surface de toutes les cellules endothéliales. Les fonctions de cet auto-anticorps dont la prévalence dans la population de patients avec SSc est de 15% (données non publiées) sont en cours d'étude.

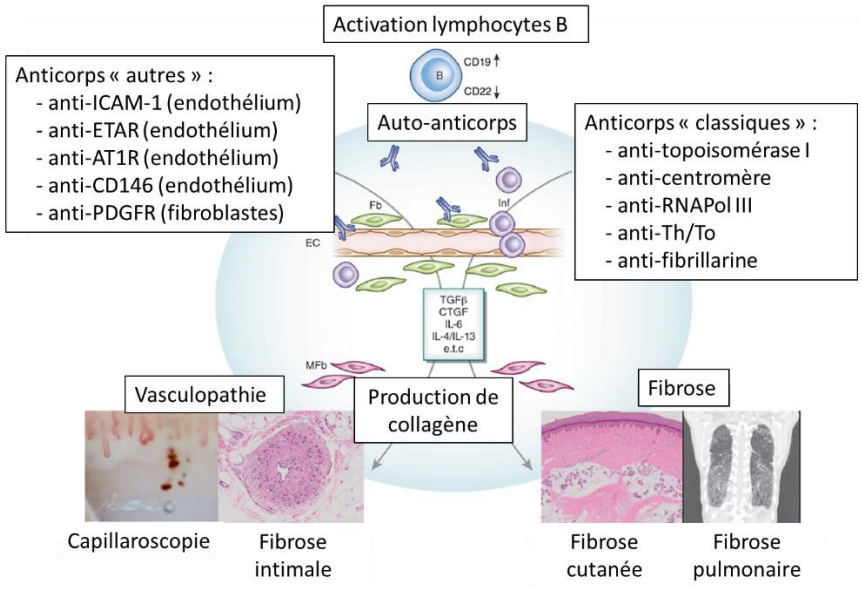


Figure 10: Auto-anticorps retrouvés dans la physiopathologie de la sclérodermie systémique, adapté de Furue et al (122).

9.2 L'atteinte endothéliale

L'endothélium est un tissu métaboliquement actif qui assure la régulation du tonus vasculaire, de l'angiogenèse, de la balance coagulation/fibrinolyse, de la prolifération des cellules musculaires lisses, de l'adhérence cellulaire et de l'inflammation (126). Malgré les différences liées à leurs localisations anatomiques, les cellules endothéliales réagissent activement aux stress et stimuli externes pour maintenir l'homéostasie des vaisseaux sanguins.

Dans la SSc, l'atteinte endothéliale constitue un évènement majeur qui aboutit à l'apparition de la vasculopathie, de l'inflammation et de l'hypoxie tissulaire (Figure 11). L'exposition à des agents toxiques ou infectieux reste le principal facteur environnemental déclencheur de la maladie. Leurs conséquences physiopathologiques semblent impliquer l'induction d'une explosion oxydative qui impacte directement les cellules endothéliales. L'activation et la destruction des cellules endothéliales libère des taux plus importants d'endothéline-1, de facteur de Willebrand et d'oxyde nitrique (NO) (127). Il en résulte un déséquilibre entre la vasodilatation et la vasoconstriction modifiant le tonus musculaire. Cette augmentation du tonus vasculaire et l'augmentation de l'expression de facteur Willebrand activent l'agrégation plaquettaire et créent un environnement pro-coagulant créant un cycle

d'ischémie-reperfusion et amplifiant les lésions et l'inflammation endothéliales (128). Ce système engendre un dysfonctionnement endothélial, c'est-à-dire une diminution de produit et rendu disponible par les NO synthases (NOS) . La cellule endothéliale va alors fabriquer du NO par d'autres mécanismes qui vont également générer des ROS. Ces **ROS endothéliales** participent au remodelage des vaisseaux vers un état pro-inflammatoire chronique qui peut participer à un cercle vicieux de surproduction de ROS. Les auto-anticorps anti-cellules endothéliales semblent aussi participer à ces mécanismes de production. En effet, les auto-anticorps dirigés contre ICAM-1 décrits chez les patients atteints de SSc déclenchent sur des HUVECs la production de ROS qui font surexprimer d'autres molécules de stress endothélial (121).

Des ROS et cytokines sont aussi produites par l'activité leucocytaire périvasculaire (129). En effet, dans la SSc, la libération par les cellules endothéliales de molécules telles que la VE-cadhérine, de facteur de croissance dérivé des plaquettes-B), des taux élevés de MMP-9, (21) et des facteurs pro-angiogéniques chimio-attractant pour les neutrophiles, tels que CXCL5 (130), augmente la perméabilité des cellules endothéliales et la migration leucocytaire trans-endothéliale (131) des monocytes, lymphocytes et polynucléaires.

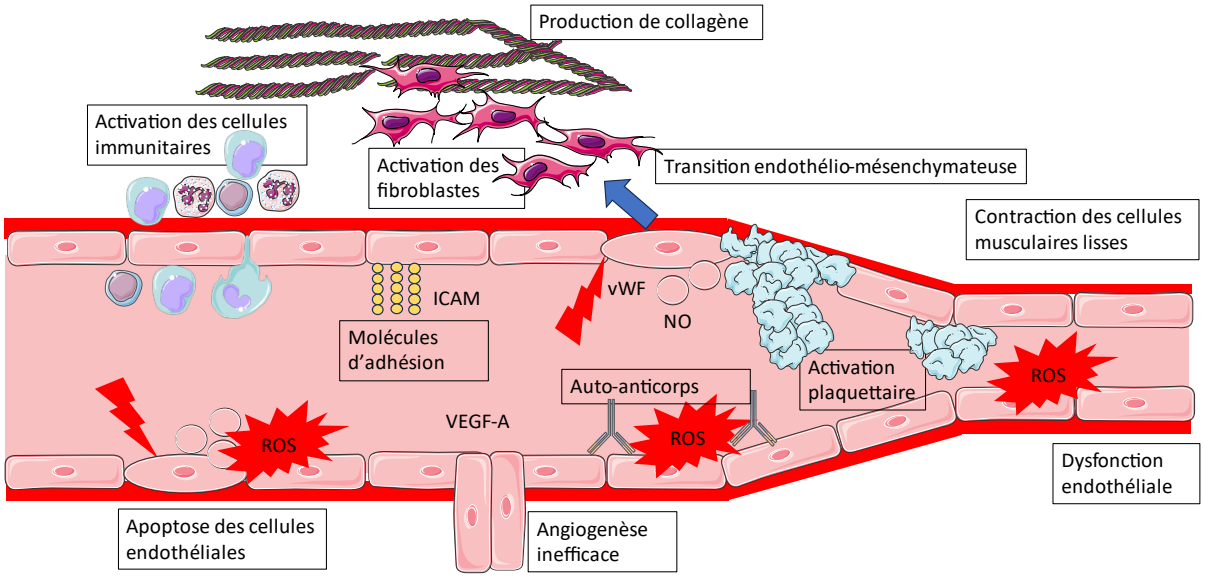


Figure 11: Mécanismes de base de la vasculopathie liée à la sclérose systémique.

L'endothéline-1 produite par les cellules endothéliales contribue à la production de ROS et la différenciation des fibroblastes en un phénotype myofibroblastique qui favorisent l'hyperplasie intimale, le rétrécissement luminal et l'oblitération vasculaire (132). Les **myofibroblastes** peuvent également provenir de la **transition endothéliale-mésenchymateuse (EndoMT)** (133,134), il s'agit d'un processus au cours duquel les cellules

endothéliales perdent l'expression de marqueurs endothéliaux tels que CD31 et VE-cadhérine, et adoptent un phénotype myofibroblastique, caractérisé par une morphologie fusiforme et l'expression d'α-SMA (135) (Figure 12). La destruction et l'apoptose des cellules endothéliales puis la perte de capillaires ne sont pas compensées ni par la vasculogenèse ou processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir de progéniteurs issus de la moelle osseuse, ni par l'angiogenèse, processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des cellules endothéliales matures du réseau vasculaire préexistant (136,137). Bien que les taux de VEGF soient augmentés dans la SSc, en réponse à l'hypoxie tissulaire, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales sont inadaptées (131). Une des isoformes du VEGF-A, le VEGF-165, a été décrite chez les patients atteints de SSc (138) et entrave l'angiogenèse *in vitro* (139). De plus, les fonctions et des cellules progénitrices endothéliales sont aussi altérées dans la SSc (140).

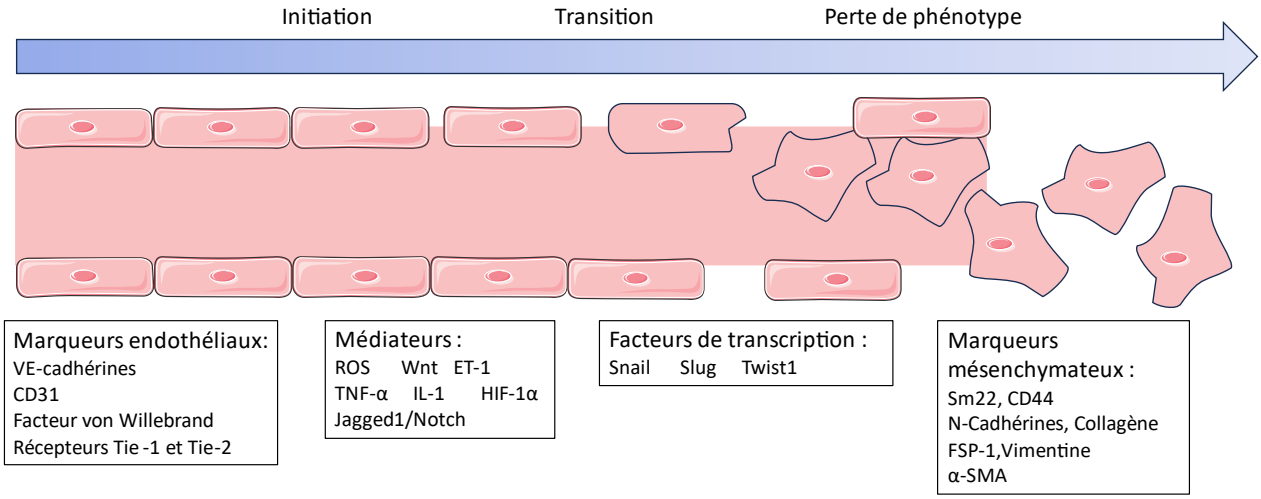


Figure 12: Schéma de la transition endothélio-mésenchymateuse au cours de la Sclérodermie systémique.

Les **molécules endothéliales d'adhésion cellulaire** qui jouent un rôle important dans la promotion de l'intégrité endothéliale, la régulation de la migration des leucocytes, la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse (141) sont des marqueurs potentiels de sévérité et progression de la maladie. Par exemple, l'augmentation de l'expression de ces molécules et de leurs niveaux solubles, détectés aux stades précoces de la SSc, est corrélée avec la sévérité de la maladie et de l'atteinte viscérale (142–144). En effet, des niveaux élevés d'E-sélectine, de VCAM-1 et de ICAM-1 conduisent à l'activation des cellules endothéliales, à la dysrégulation de l'angiogenèse et, par conséquent, à des lésions vasculaires chroniques et progressives (145). Notre équipe a montré aussi une élévation significative des concentrations de CD146s dans trois cohortes indépendantes de patients atteints de SSc par rapport à des témoins (146–148). De plus, si l'on s'intéresse aux associations cliniques, un taux de CD146s bas est observé

comme associé de façon significative à la présence d'une fibrose pulmonaire et de gangrène digitale ; en revanche, il n'est pas associé à des manifestations moins sévères de type phénomène de Raynaud ou ulcère digitaux. Des résultats similaires ont été obtenus par une équipe japonaise montrant des taux élevés de CD146s dans la SSc. Chez ces SSc, les concentrations sont aussi plus basses chez les patients qui présentent des complications (147). Notre équipe a aussi montré que des formes différentes de CD146 que nous verrons plus loin sont corrélées avec la fibrose pulmonaire ou des anomalies capillaires (149).

9.3 L'apparition de fibrose

La fibrose est la caractéristique principale de la SSc. Le tissu est remplacé par une matrice enrichie en collagène qui perturbe les fonctions tissulaires. Elle apparait lorsque les mécanismes de cicatrisation cellulaire survenant après une lésion sont dérégulés. La dérégulation de ces processus déclenche un excès de dépôt de matrice extracellulaire et une désorganisation de l'architecture de l'organe qui correspond à de la fibrose (150). Les fibroblastes sont les principaux acteurs de la fibrose. Dans la SSc ils sont dans un état activé avec des capacités de synthèse augmentées qui persiste même *in vitro* en culture après plusieurs passages. De plus, ces cellules ont une capacité accrue à se transdifférencier en myofibroblastes dont les capacités de synthèse du collagène sont augmentées et qui adoptent un phénotype proche de celui des cellules musculaires lisses.

9.4 Les fibroblastes, cellules de la réparation tissulaire

Initialement au centre des phénomènes de cicatrisation, les fibroblastes sont les principales cellules productrices de matrice extracellulaire. Leur objectif est de rétablir la matrice extracellulaire d'un tissu à la suite d'une lésion. Ces cellules se trouvent dans pratiquement tous les tissus. Selon les organes où ils se situent, leur profil d'expression génique, leur signature moléculaire et leur activité fonctionnelle diffèrent. Ils peuvent produire différentes quantités de pro-collagène, de fibronectine, de protéases, de collagénases et d'autres régulateurs de la matrice extracellulaire pour répondre aux stimuli de leur microenvironnement. Par exemple, les fibroblastes inactifs expriment l'endothéline 1 et ICAM-1, tandis que les fibroblastes exposés à un stress mécanique par le microenvironnement, une situation qui se produit dans la SSc, expriment l'α-SMA, le TGF-β et des gènes associés à la production de protéines de la matrice extracellulaire (151). Au stade inflammatoire, sous l'influence de différentes cytokines et facteurs de croissance comme le TGF-β, le PDGF et le

VEGF, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes. Les myofibroblastes se caractérisent par une augmentation de leur capacité de contraction cellulaire et l'expression de marqueurs spécifiques tels que l'α-SMA qui leur permet de modifier la tension dans le tissu conjonctif, influençant ainsi la cicatrisation et la rétraction tissulaire. Ils acquièrent également la capacité de produire de manière plus importante que les fibroblastes des protéines de la matrice extracellulaire ce qui conduit à une augmentation de la rigidité tissulaire. En produisant des facteurs de croissance et des cytokines, les myofibroblastes peuvent également stimuler la prolifération des fibroblastes résidents et d'autres cellules, créant ainsi un cycle d'activation et de production de matrice extracellulaire. Les myofibroblastes peuvent avoir différentes origines. Ils proviennent en premier lieu de la différenciation des fibroblastes résidents. Ils peuvent aussi provenir de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses de la gaine dermique des follicules pileux ou de la moelle osseuse. On retrouve également des fibrocytes circulants, recrutés en cas d'inflammation, semblables aux fibroblastes mais ayant une activité moindre (152). Des expériences *in vivo* ont aussi montré que les péricytes contribuaient largement au pool de myofibroblastes. Ils possèdent naturellement des propriétés contractiles et vont acquérir la capacité à produire de la matrice extracellulaire après migration dans les tissus (153). Enfin, les myofibroblastes peuvent aussi provenir de l'EndoMT mais aussi de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dont je parlerai plus loin.

Dans la SSc, les fibroblastes subissent une altération significative de leurs fonctions et comportements cellulaires qui se traduisent par une prolifération, une synthèse protéique et une différentiation en myofibroblastes trop importantes. Ce processus entraîne dans la SSc la détérioration des fonctions de la peau et des organes internes en raison d'un excès de production collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire comme les protéoglycanes ou les fibres d'élastine (154). La capacité des fibroblastes de patients SSc à produire en excès du collagène par rapport à des témoins sains a été montré dès 1970 par LeRoy à partir de fibroblastes cutanés explantés sur du plastique (155). Un des mécanismes expliquant la production plus importante de collagène repose sur l'apparition de modifications épigénétiques. Les fibroblastes de patients SSc expriment des niveaux plus importants de l'histone déméthylase JMJD3 (156). Celle-ci inhibe des gènes réprimant la production de matrice extracellulaire (157) et active le facteur de transcription Fos-related antigen-2 (Fra-2) qui est un activateur de la synthèse de TGF-β et de PDGF (158). Une analyse transcriptomique de biopsies cutanées de patients atteints de SSc a montré chez ces derniers la disparition d'une

population particulière de fibroblastes exprimant le récepteur 5 couplé aux protéines G contenant des répétitions riches en leucines (LGR5) (159). Également connu sous le nom de GRP49, il s'agit d'un récepteur pour les R-spondines qui active la voie de signalisation Wnt canonique (160). Les fibroblastes LGR5 positifs surexpriment des gènes associés à la dégradation et au remodelage de la matrice extracellulaire et du tissus cutané ainsi que d'autres gènes comme ceux de résistance au complexe d'attaque membranaire (159). Dans la SSc, les fibroblastes activent aussi *in vitro* de manière plus importantes les kinases d'adhésions focales nécessaires à l'activation des intégrines, et qui régulent la migration, la survie et la prolifération des fibroblastes (161). Ils expriment aussi de l'IL-1, IL-6, IL-8 et MCP-1 (162). Les cytokines sont de puissants facteurs chémoattractants qui vont attirer les neutrophiles, monocytes et lymphocytes T sur le site inflammatoire et favoriser la différenciation des monocytes en macrophages et jouer un rôle dans l'orientation lymphocytaire T (163). Les fibroblastes de la SSc gardent un phénotype activé par une stimulation autocrine persistante de TGF-β, d'autres stimuli pro-fibrotiques (164), et de voies de signalisation intracellulaires inhérentes aux fibroblastes de la SSc. La balance entre les molécules pro-apoptotiques et anti-apoptotiques des myofibroblastes est déséquilibrée (165). La rigidité de la matrice extracellulaire favorise la survie des myofibroblastes en augmentant l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL et par la diminution de facteur BAX consécutive à l'action de la protéine tyrosine kinase ABL1 et des voies PI3/AKT. Enfin les miRNAs, en particulier miRNA21, sont impliqués dans la protection des myofibroblastes contre l'apoptose en ciblant et en dégradant les ARNm pro-apoptotiques comme BAX. La modulation de ces voies avec des molécules comme Navitoclax permet d'abaisser le seuil pro-apoptotique des cellules et d'augmenter l'apoptose des myofibroblastes *in vivo* sur un modèle murin de sclérodermie induite par bléomycine et *in vitro* sur des fibroblastes cutanés de patients SSc inversant ainsi les effets de fibrose (166).

L'EMT semble avoir un rôle limité lors du processus normal de réparation tissulaire alors qu'elle est principalement reconnue comme processus pathologique lors de la SSc (134). Au cours de la SSc, la cellule endothéliale est soumise à plusieurs éléments tels que l'activation par des autoanticorps, les ROS, l'hypoxie, des infections virales. En réponse, les cellules endothéliales expriment davantage d'α-SMA, de vimentine et de collagène de type I, et moins de cadhérine et de facteur von Willebrand. Les cellules endothéliales participent alors à la production de matrice extracellulaire comme les myofibroblastes. Au niveau de l'épithélium pulmonaire, les molécules pro-fibrotiques que sont l'endothéline-1 et le TGF-β vont favoriser

l'EMT (167). Durant la transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse, les cellules épithéliales perdent leurs jonctions intercellulaires, changent leur polarité, expriment différents marqueurs de surface, et peuvent remodeler leur cytosquelette pour exprimer un phénotype mésenchymateux (168) (Figure 13). De plus, les cellules épithéliales alvéolaires peuvent coexprimer des marqueurs des cellules épithéliales et de cellules mésenchymateuses, notamment la cadhérine et l'α-SMA chez la souris (169). Dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, la fibrose pulmonaire est précédée d'un dommage épithélial. En condition hypoxiques des cellules épithéliales alvéolaires se transforment en myofibroblastes, avec perte de la E-cadhérine et acquisition de marqueurs mésenchymateux (170). La transdifférenciation des cellulaires endothéliales pulmonaires vasculaires en myofibroblastes est médiée par la tyrosine kinase c-Abl et Snail, un facteur de transcription ayant des rôles essentiels dans l'EMT et la différenciation myo-fibroblastique (171). Si le TGF-β semble être le stimulus le plus puissant pour l'EMT et la différenciation des cellules en myofibroblastes, d'autres déclencheurs pourraient également être importants dans la SSc. Il s'agit notamment des ligands Wnt (Wnt3a, Wnt5 et Wnt10b), de Hedgehog, de la signalisation Jagged-Notch, de l'hypoxie et des lipides bioactifs, tandis que le récepteur nucléaire PPAR-γ inhibe ces transitions et favorise la quiescence cellulaire (172,173).

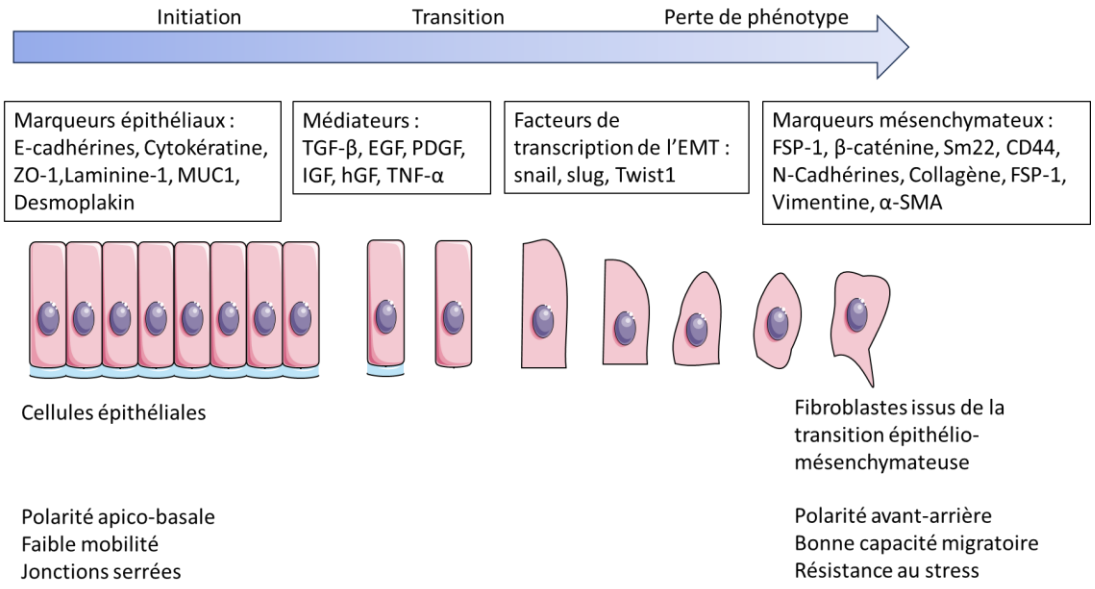


Figure 13: Schéma de la transition epithélio-mésenchymateuse.

Chapitre II : Les ROS, la voie Wnt et la fibrose

10 Les ROS

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des composés à très courte demi-vie dérivés de la transformation de l'O_2. Ces médiateurs jouent un rôle important dans la défense antibactérienne et dans d'autres fonctions physiologiques comme la différenciation, la prolifération et la régulation du cycle cellulaire (174). Ils sont au nombre de 3 : l'anion superoxyde ($O_2^{-\bullet}$) ; le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$).

Les ROS sont principalement produites par la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et via la famille des NADPH oxydases (Nox). La famille des Nox se composent d'oxydases simples (Nox1-Nox5) et doubles (Duox1 et Duox2) (175). Les ROS sont générées par un transport d'électrons à travers la membrane formant en premier lieu l'$O_2^{-\bullet}$ qui peut se ensuite se dissocier du H_2O_2 ou, s'il y a du NO, créer du peroxynitrite ($ONOO^-$). Nox2 et Nox4 sont des complexes essentiels de production de ROS dans les cellules endothéliales ; ils sont activés par divers stimulants et agonistes, comme le VEGF. L'isoforme Nox1 est plus abondante dans l'épithélium, bien qu'elle ait été également détectée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (176). Le VEGF stimule la production de ROS par Nox2 qui, à son tour, favorise l'autophosphorylation de VEGFR2 par l'oxydation/inhibition des enzymes phosphatases. Le résultat est une augmentation de la prolifération cellulaire, de la migration et de l'angiogenèse (177). Les ROS et la Nox2 des cellules endothéliales augmentent l'expression de VEGF et la néovascularisation chez des souris transgéniques surexprimant le partenaire de liaison de la Nox : p22phox (178). Cependant, en raison d'une plus grande expression de la Nox4 que de la Nox2 par les cellules endothéliales, l'inhibition de cette première par des SiRNA bloque la migration et la prolifération des cellules endothéliales induites par VEGF (179). La suppression et la surexpression génique de Nox4 suggèrent que les ROS dérivées de Nox4 possèdent une fonction protectrice des vaisseaux (180).

Le stress oxydatif dû à la génération excessive de radicaux libres d'oxygène et de ROS associés est prévalent dans la SSc et contribue à la progression des dommages tissulaires (181). Dans les fibroblastes, le TGF-β induit l'enzyme Nox4, qui catalyse la réduction de l'oxygène en ROS (182). A leur tour, les ROS agissent comme des signaux pour induire l'activation des

fibroblastes et la différenciation des myofibroblastes. En effet, les ROS semblent être nécessaires à l'exécution des effets pro-fibrotiques du TGF-β. Le ciblage pharmacologique de Nox4 protège les souris de la fibrose expérimentale (182). Les tissus fibrotiques présentent une expression élevée de Nox4, et les fibroblastes SSc explantés génèrent spontanément des ROS (183). Des anticorps qui stimulent le PDGFR ont été fréquemment trouvés chez les patients atteints de SSc (184). Ces auto-anticorps reconnaissent le PDGFR natif et activent sélectivement les cascades Ha-Ras-ERK1/2 et ROS pour induire l'expression du gène du collagène de type I et la conversion des fibroblastes humains normaux en myofibroblastes.

11 La voie Wnt

Les voies morphogènes, notamment Wnt, Hedgehog et Notch, impliquées dans le développement embryonnaire apparaissent en tant que médiateurs importants de l'activation des fibroblastes dans les maladies fibrosantes. En conditions physiologiques chez l'adulte, elles participent aux processus de cicatrisation tissulaires, et d'angiogenèse chez l'adulte grâce à leur capacité à stimuler la prolifération et la migration cellulaire. Dans la fibrose, des modifications épigénétiques contribuent à activer ces voies de manière permanente et ainsi stimuler les fibroblastes pour créer de la fibrose (185). Dans le cadre de ce travail de thèse nous n'aborderons que la voie de signalisation Wnt et **son rôle dans la fibrose** en raison de son interaction avec la protéine CD146 que nous verrons dans la partie suivante.

La voie Wnt est un ensemble de voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la migration, la polarité cellulaire, la différenciation et l'apoptose. La voie Wnt joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, la régénération tissulaire, la morphogenèse et le maintien de l'homéostasie tissulaire chez les animaux, y compris les humains. La voie Wnt qui est une contraction de « Wingless type » tire son nom d'expériences menées sur la drosophile. L'absence d'une famille molécules de signalisation induisait des anomalies de développement et l'absence d'ailes chez la mouche drosophile. Plusieurs publications ont montré l'implication de la signalisation Wnt dans la réparation tissulaire après une blessure cutanée (186). Cependant, celle-ci est anormalement régulée dans plusieurs processus pathologiques comme le cancer (187), la cicatrisation hypertrophique (188), le remodelage anormal des vaisseaux sanguins (189), la fibrose pulmonaire (190).

11.1 Les protéines Wnt

11.1.1 Les activateurs de la voie Wnt

Les protéines de la voie Wnt sont des glycoprotéines sécrétées très peu solubles qui possèdent des fonctions autocrines et paracrines. La modification lipidique est une étape essentielle pour la sécrétion des protéines Wnt. Dix-neuf ligands de Wnt ont été décrits chez les mammifères et régulent la signalisation cellulaire par le biais d'une variété d'interactions ligand-récepteur (191). La signalisation Wnt intracellulaire implique les récepteurs Frizzled (Fzd), les corécepteurs LRP5/LRP6 ainsi que d'autres moins connus comme ROR2 qui permettent à la cellule d'activer soit la voie canonique β-caténine dépendante soit la voie β-caténine indépendante, dite non canonique qui active la polarité cellulaire planaire ou le facteur de transcription c-jun.

Il existe aussi d'autres molécules que les ligands Wnt qui participent à l'activation de la voie Wnt canonique. Parmi celles-ci les R-spondines renforcent la signalisation Wnt en réduisant la dégradation de Fzd et LRP (192). Les tankyrases activent la voie Wnt par dégradation de l'axine et en conséquence déstabilisent le complexe de dégradation de la β-caténine. Les tankyrases sont des membres de la famille des poly-ADP-ribosyltransférases polymérases (PARP) qui dégradent l'axine par poly-ADP-ribosylation, ce qui entraîne la stabilisation de la β-caténine (193).

11.1.2 Les inhibiteurs de la voie Wnt

L'activation de la voie Wnt peut être régulée par des protéines sécrétées qui vont empêcher la liaison des ligands Wnt avec le récepteur Fzd. Ces inhibiteurs sont les protéines Dickkopf (DKK), les protéines sécrétées liées à la protéine frizzled (SFRP) et le facteur inhibiteur de Wnt (WIF) (194). Les protéines DKK interfèrent avec la formation du complexe corécepteur Fzd-LRP5/6 en se liant au corécepteur LRP5/6 (195). Les SFRP et le WIF empêchent l'interaction des ligands de Wnt avec le récepteur Fzd en se liant directement aux protéines Wnt. Les SFRP peuvent aussi former des dimères avec Fzd pour inhiber la signalisation Wnt.

11.2 Les voies de signalisation

Classiquement la voie Wnt est dichotomisée en deux chemins de transduction du signal en fonction de la nature des ligands à la surface de la cellule, des corécepteurs et des inhibiteurs de chaque voie. Par exemple, le principal ligand de la voie non canonique, Wnt5a, active la

voie non canonique en présence du corécepteur ROR2. En l'absence de ROR2, Wnt5a active la voie Wnt canonique (196).

11.2.1 Voie canonique

La voie canonique est la première à avoir été mise en évidence. Elle est celle qui a été le plus étudiée. Elle est activée par la liaison des ligands Wnt à un complexe de corécepteurs, comprenant Fzd et les protéines réceptrices 5 ou 6 de la protéine liée aux lipoprotéines de basse densité (LRP5/6). Le complexe récepteur activé recrute Dishevelled (Dvl) et l'axine à la membrane cellulaire et, par conséquent, agit comme médiateur de la déstabilisation du complexe de destruction de la β-caténine. Lors de l'inhibition du complexe de destruction, la β-caténine est stabilisée, transloque vers le noyau et interagit avec les membres des facteurs de transcription T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factors (TCF/Lef) et plusieurs cofacteurs pour moduler l'activation des gènes cibles (197). Le complexe de dégradation de la β-caténine est un ensemble de protéines cytosoliques qui favorise la phosphorylation de la β-caténine puis sa dégradation par le protéasome. Outre l'axine, le complexe de destruction de la β-caténine comprend la protéine adenomatous polyposis coli (APC), la glycogène-synthase-kinase 3β (GSK-3β) et la caséine kinase I α (CKIα). L'APC et l'Axine fonctionnent principalement comme des protéines d'échafaudage au sein de ce complexe, et GSK-3β et CK1α phosphorylent ensuite la β-caténine et la préparent pour son ubiquitination et sa dégradation dans le protéasome (197) (Figure 14).

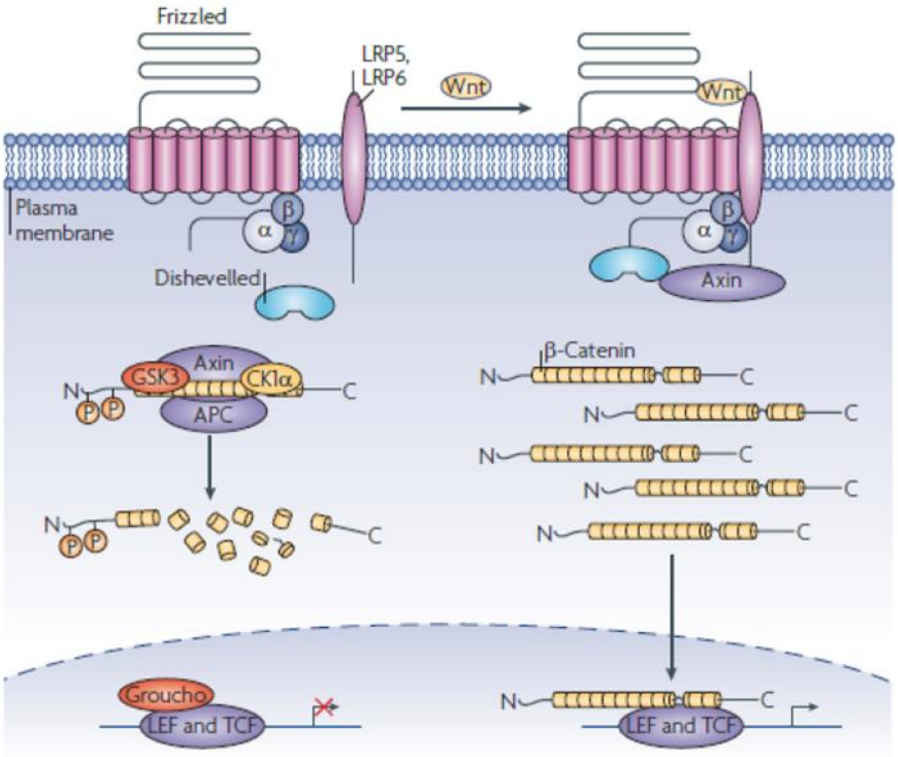


Figure 14: Signalisation dite « canonique » dépendante de la β-caténine d'après Angers et Moon (198).

11.2.2 Voie non canonique

Deux autres voies de signalisation impliquant les ligands et protéines Wnt ont été décrites. Elles sont dites non canoniques parce qu'elles sont indépendantes de l'activation de la β-caténine. Elles sont composées de deux chemins distincts appelés Wnt/PCP pour polarité cellulaire planaire et Wnt/Ca2+ (199) (Figure 15). Contrairement à la voie canonique qui est très bien caractérisée, les cascades des voies non canoniques sont moins bien comprises.

Dans la voie Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) les ligands Wnt après liaison avec les récepteurs Fzd et d'autres co-récepteurs spécifiques (NRH1, Ryk, PTK7 ou ROR2) activent la protéine Dvl. Ce dernier va activer la protéine activatrice de morphogenèse associée à Dishevelled (DAAM1) qui active la protréine G Rho, qui à son tour, active la protéine kinase ROCK, un des principaux régulateurs du cytosquelette. De plus Dvl forme un complexe avec la protéine Rac1 qui active par phosphorylation la protéine kinase N-terminal jun. La protéine JNK active le facteur de transcription AP-1 et la polymérisation d'actine et de tubuline. L'ensemble de ces phénomènes régule l'orientation des cellules et leur polarisation le long d'un plan tissulaire. Cette voie est particulièrement importante pour le développement de la morphologie et de l'organisation des tissus.

Dans la voie Wnt/Ca2+ dépendante, les ligands Wnt se lient également aux récepteurs Fzd avec des co-récepteur ROR1/2. La protéine Dvl va alors directement se lier avec la phospholipase C, décomposer le composant PIP2 en diacylglycérol. Cette co-stimulation de Dvl et de la protéine G peut conduire à l'activation de la phospholipase C ou de la phosphodiestérase spécifique du GMPc. Si la phospholipase C est activée, le PIP2 devient du diacyl-glycérol et du phosphatidyl inositol tri-phosphate (IP3). Ce dernier provoque la libération de Ca2+ du réticulum endoplasmique, active la calcineurine et CaMKII, qui vont activer le facteur de trascription NFAT qui régule l'adhésion cellulaire et la migration. La calcineurine active les kinases TAK1 et NLK, qui peuvent interférer avec la signalisation TCF/β-Caténine de la voie Wnt canonique. Le DAG active la protéine Cdc42 via la protéine kinase C. Cdc42 est un régulateur important du cytosquelette.

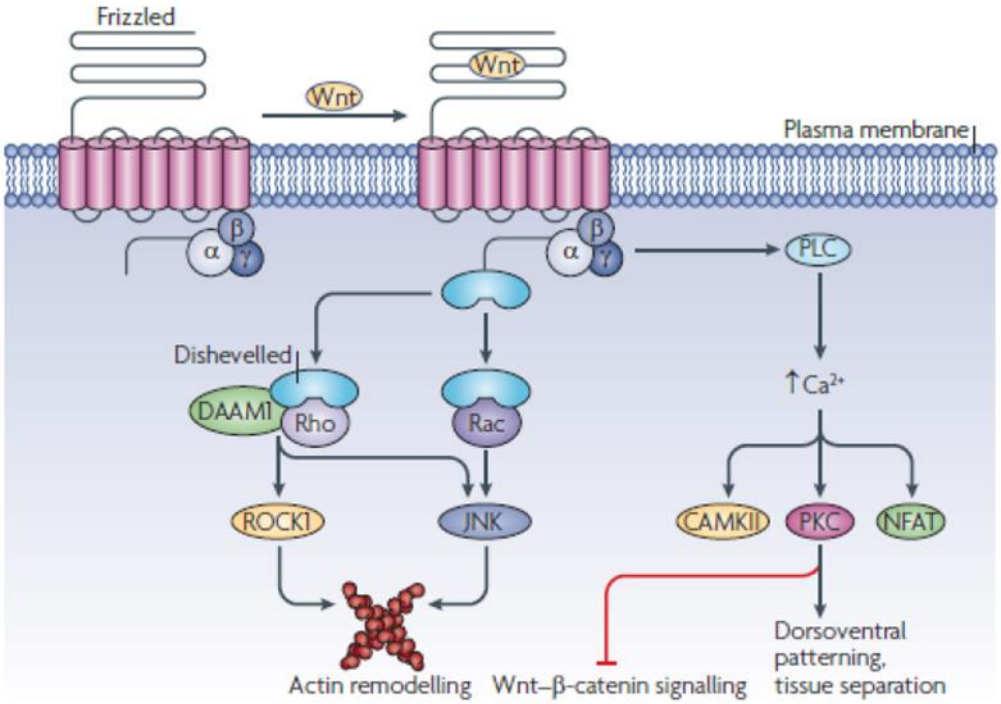


Figure 15: Signalisation Wnt dite « non canonique » indépendante de la β-caténine d'après Angers et Moon (198).

11.3 Activation de la voie Wnt dans la SSc

Dans la sclérodermie systémique (SSc), l'augmentation de l'expression des protéines Wnt Wnt1 et Wnt10b a été observée dans les fibroblastes de patients, ainsi qu'une diminution de l'expression des antagonistes endogènes de Wnt tels que DKK1 et SFRP1 (200,201). Cette expression accrue des composants centraux de la voie Wnt canonique se reflète également

dans les modèles murins de la SSc, comme le modèle de fibrose cutanée induite par la bléomycine et le modèle de fibrose cutanée murine Tsk-1 (202).

Dans ces modèles, on observe une accumulation nucléaire de la β-caténine dans la peau des patients atteints de SSc par rapport aux contrôles sains (203), et une diminution des inhibiteurs de la signalisation canonique de Wnt dans les échantillons de peau des patients (200). La capacité des Wnt canoniques à induire l'activation des fibroblastes et la différenciation des cellules progénitrices *in vitro*, associée aux preuves d'une signalisation chronique de la β-caténine indépendante des ligands Wnt dans les tissus lésionnels, soutient un rôle important de cette voie de développement dans la SSc.

L'analyse des données d'expression génomique publiées montre une expression élevée du récepteur Wnt FZD2 et de la cible Wnt LEF1, ainsi qu'une diminution de l'expression des antagonistes Wnt DKK2 et WIF1 dans des échantillons de biopsie de la peau de sous-groupes de patients atteints de SSc cutanée diffuse comparée à d'autres sous-groupes distincts. *In vitro*, Wnt3a a induit l'activation de β-caténine, stimulé la prolifération et la migration des fibroblastes, la contraction du gel de collagène, la différenciation des myofibroblastes, et renforcé l'expression de gènes pro-fibrotiques (204). Dans les préadipocytes sous-cutanés explantés, Wnt3a a réprimé l'adipogenèse et favorisé la différenciation en myofibroblastes (205). Une activation importante de la signalisation Wnt canonique stimule les fibroblastes *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, le traitement avec des protéines Wnt recombinantes telles que Wnt1 et Wnt3a induit la différenciation de fibroblastes au repos en myofibroblastes et augmente la production de la matrice extracellulaire (206). *In vivo*, la surexpression de médiateurs de la voie Wnt canonique, comme la protéine Wnt10b chez la souris, induit l'apparition d'une fibrose cutanée et d'une lipoatrophie sous-cutanée, manifestée par une augmentation de l'épaisseur du derme, une accumulation cutanée d'hydroxyproline et du nombre de myofibroblastes dès trois semaines de vie (207). L'inactivation de la protéine de transport des ligands Wnt appelée « Evenness Interrupted » sur des modèles murins de sclérodermie induits par bléomycine cutanée ou hyperexpression de TGF-β diminue l'accumulation de β-caténine et de protéine JNK phosphorylée, entraînant une diminution de l'épaississement cutané, ainsi que de la différenciation des myofibroblastes et de l'accumulation de collagène dans la peau (208). De même, dans un autre modèle de souris avec une surexpression dans les fibroblastes d'un mutant de la β-caténine, avec une durée de vie plus importante, la fibrose dermique induite et spécifique des fibroblastes s'est développée rapidement. Cette induction qui a démaré dans les 2 semaines suivant l'induction a été progressive dans le temps (203). En outre,

Hamburg-Shields et al. (209) ont publié que la surexpression conditionnelle de la β-caténine dans les fibroblastes dermiques est associée à l'expression accrue des gènes de la matrice extracellulaire *in vivo*. De plus, l'activation pharmacologique de la signalisation canonique de Wnt par l'inhibition pharmacologique de GSK-3β a exacerbé la fibrose cutanée (210). L'utilisation de Wnt3a, un des principaux ligands de la voie Wnt canonique, induit un phénotype pro-fibrotique chez des fibroblastes murins en augmentant la formation de fibres de stress, diminuant la prolifération fibroblastique, augmentant leur capacité migratoire et l'expression de TGF-β. L'inhibition de β-caténine par des SiRNA a inversé l'expression de l'actine et de TGF-β (211). Un autre ligand canonique Wnt10b est aussi impliqué dans le développement de la fibrose et l'atrophie du tissu adipeux sous-cutané dans la SSc. Ces résultats sont corroborés sur un modèle murin surexprimant Wnt10b qui développe une fibrose objectivée par une expression accrue de collagène, d'α-actine et une activation permanente de la β-caténine (207).

11.4 Wnt et ROS

Des études menées ces dernières années ont fourni des preuves claires que la voie Wnt/β-caténine est régulée, du moins en partie, par les ROS dérivées des Nox. Dans les cellules rénales embryonnaires humaines, le H_2O_2 diminue la quantité de β-caténine nucléaire et la transcription dépendante de TCF/LEF. L'hyperexpression de Dvl1 a annulé la régulation à la baisse de la β-caténine induite par H_2O_2, suggérant que H_2O_2 module négativement la voie de signalisation Wnt par la régulation à la baisse de la β-caténine (212). Une étude de Funato et al. a identifié une protéine apparentée à la thioredoxine, la nucléorédoxine (NRX), comme un régulateur négatif sensible au ROS de la signalisation Wnt canonique par son interaction avec Dvl (213). La NRX interagit habituellement avec Dvl, mais les ROS provoquent la dissociation de la NRX de Dvl et permettent à Dvl d'activer la voie de signalisation Wnt en aval (214). En outre, Kajla et al. ont démontré que le traitement des cellules intestinales de souris avec Wnt induit la production de ROS par Nox1 via la protéine Vav2, un activateur du facteur d'échange de nucléotides guanine dépendant de Rac1 (215). Les ROS générées par Nox1 oxydent et inactivent la NRX, libérant ainsi la suppression dépendante de la NRX de la signalisation Wnt/β-caténine par la dissociation de la NRX de Dvl. L'inhibition de Nox1 diminue la réponse cellulaire aux ligands Wnt et la stabilisation de la β-caténine montrant un effet des ROS sur le dialogue Wnt/ROS.

Myant et al. ont montré que l'activation de Rac1, un composant du complexe protéique Nox, est nécessaire pour la transformation des cellules souches intestinales induite par Wnt via la production de ROS et l'activation de NF-κB (216). En conséquence, l'augmentation des ROS pourrait contribuer à la tumorigenèse en activant des voies de signalisation spécifiques dans différents types de cellules, dont une est la signalisation Wnt.

Les particules fines sont aussi capables d'induire une EMT des cellules epithéliales pulmonaires via la génération de ROS en passant par la β-caténine (217). L'exposition de rats à des microparticules de plastique provoque un stress oxydatif ovarien montrant une élévation des marqueurs de la fibrose (TGF-β, fibronectine, α-SMA) et des protéines associées à la voie de signalisation Wnt/β-Caténine. L'utilisation de N-actéyl-cystéine, un inhibiteur des ROS, a entraîné une diminution de l'expression des protéines liées à la voie Wnt/β-Caténine et d'apoptose liée aux microparticules de plastique (218).

Des injections sous-cutanées répétées de bléomycine induisent l'apparition d'un stress oxydatif, indiqué par une augmentation de SOD1 (superoxyde dismutase 1) et également révélé une activation des cellules endothéliales, une augmentation de l'expression de p21 et une hausse du nombre de noyaux positifs pour la β-caténine. Par ailleurs, l'activation des protéines Wnt3a et Wnt5a qui en résulte perturbe l'équilibre de la signalisation Wnt et affecte la différenciation des péricytes, qui peuvent se transformer en myofibroblastes. Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif et l'activation de la voie de signalisation Wnt induits par la bléomycine dans la niche endothéliale jouent un rôle important dans le développement de la fibrose pulmonaire (219).

Dans un autre modèle de fibrose, rénale cette fois-ci, l'indoxyl sulfate induit l'activation de la voie de signalisation Wnt canonique en réduisant l'expression de sFRP5 en augmentant le niveau de méthylation de l'ADN des îlots CpG de son promoteur. Cette hyperméthylation de l'ADN de sFRP5 est due à l'activation des signalisations ROS/ERK1/2, qui augmente l'expression des ADN méthyltransférases. Les injections intrapéritonéales de protéine sFRP5 recombinante ou d'agents déméthylants ont considérablement atténué la fibrose rénale chez les souris traitées à l'indoxyl sulfate (220).

Bien qu'un nombre croissant de publications ait mis en évidence le rôle de la voie Wnt dans l'apparition de fibrose, très peu d'entre elles ont cherché à mettre en évidence une corrélation entre les ROS et la voie Wnt dans la SSc. Il a été mis en évidence que l'expression de l'inhibiteur WIF-1 est diminuée dans les biopsies cutanées de patients SSc par rapport à des témoins sains.

Cette inhibition provient des mécanismes de réparation de dommages sur l'ADN par les ROS qui requièrent la protéine ATM, qui va à son tour réduire la synthèse de WIF-1. La régulation de cette voie sur des fibroblastes en culture et sur des souris traitées à la bléomycine permet de réduire de nouveau la synthèse de collagène et la fibrose (221). L'injection sous-cutanée d'acide hypochloreux chez des souris permet aussi de développer chez ces dernières un phénotype de SSc avec fibrose cutanée, pulmonaire et production d'auto-anticorps anti-Scl70. L'administration de niclosamide, un inhibiteur des voies de signalisation STAT3, AKT et Wnt/β-caténine, inverse la fibrose de la peau et des poumons (222). Des effets immunologiques bénéfiques sont également observables chez ces souris, car le niclosamide a diminué l'activation des cellules T CD4+ et CD8+, l'activation des cellules B auto-immunes, ainsi que la production d'IL-4 et d'IL-13 dans la peau. Il est donc essentiel d'approfondir les recherches sur l'interaction entre les ROS et la voie Wnt, car cela pourrait révéler de nouvelles perspectives dans la compréhension et le traitement de la fibrose dans la SSc.

Chapitre III : CD146

CD146 est une molécule d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines découverte en 1987 par Lehman et al. à partir de cellules de mélanome métastatique (223). La dénomination CD146 a été établie en 1997 à la suite d'un consensus scientifique (224) visant à uniformiser ses différentes appellations : MCAM, S-endo 1, Muc-18, MelCAM.

12 Structure

12.1 Génomique :

Le gène de CD146 est localisé chez l'Homme sur le bras long du chromosome 11 (225). Sa séquence génomique est constituée de 16 exons (226) et mesure 14kb. Elle possède des similitudes avec d'autres molécules de la superfamille des immunoglobulines telles que HEMCAM (227), B-CAM (228), ALCAM (229), et KG-CAM (230). Il existe des molécules homologues à CD146 chez d'autres espèces animales comme la gicérine chez le poulet (231). Entre les gènes humain et murin de CD146 il existe une homologie de séquences de 76,2% (232).

Le promoteur de CD146 ne possède pas de TATA Box ni de CAAT Box, mais contient des sites de liaison avec le facteur de transcription SP-1, des sites AP-2 et un élément de réponse à l'AMPc (233). De plus, des motifs de liaison à C-Myb, des motifs CArG-box et des sites AP-2 supplémentaires ont été observés dans le promoteur (226) (Figure 16). Le site d'initiation de la traduction est présent sur l'exon 1 avec en amont 20pd d'une région UTR dite initiatrice (Figure 17). Les exons 2 à 12 codent pour cinq structures en boucle de type immunoglobuline avec deux exons pour une structure en boucle d'immunoglobuline. L'exon 14 code pour un domaine transmembranaire et les exons 15 et 16 pour un domaine cytoplasmique. Enfin, le gène de CD146 possède trois sites de polyadénylation qui peuvent être à l'origine de plusieurs isoformes de CD146 mais aussi d'une localisation et stabilité différente de l'ARNm de CD146 en fonction de ses sites de polyadénylation.

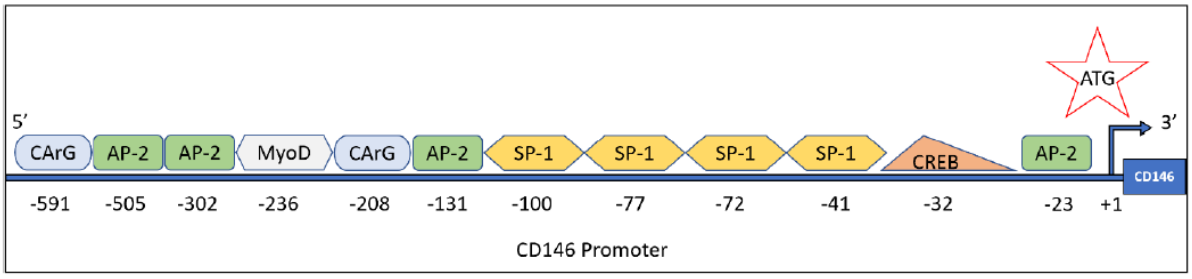


Figure 16: Structure du promoteur de CD146. La région promotrice de CD146 contient quatre motifs AP-2, quatres motifs SP-1, un CREB, deux motifs CArG et un site de liaison au facteur de transcription MyoD adapté de Mintz-Weber et al. *(233)*.

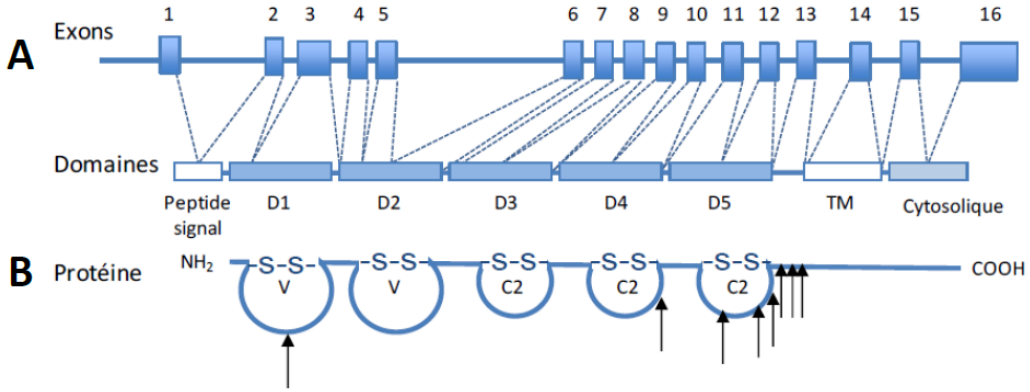


Figure 17: A/ Structure du gène codant pour CD146 : organisation des introns, exons et domaines corres-pondants. D1 à D5 : domaines Ig-like ; TM : domaine transmembranaire. B/ Structure de la protéine CD146. V : régions variables ; C2 : régions constantes des domaines Ig-like. Les flèches symbolisent les sites putatifs de N-glycosylation, adapté de Sers et al. *(226)*.

La taille de l'ARNm de CD146 est d'environ 3332 bases. Sa région codante est composée de seulement 1941 bases (234). L'analyse du gène de CD146 chez la souris a révélé qu'un processus appelé épissage alternatif de l'ARNm se produit au niveau du quinzième exon. Cela a entraîné la création d'une variante du CD146 appelée mCD146-s (CD146-court chez la souris) (235). Chez le poulet, la gicérine, homologue de CD146, existe sous deux formes, une forme courte provenant d'un épissage de l'exon 15 et une forme longue originaire de la traduction de l'ARNm complet (235). Chez l'homme, il existe aussi deux formes membranaires et deux formes solubles obtenues à partir d'épissage alternatif de l'ARNm de CD146 que je décrirai ci-après.

12.2 Protéique :

12.2.1 Structure globale

CD146 est une glycoprotéine de la superfamille des immunoglobulines. On peut y distinguer trois domaines en fonction de leur localisation cellulaire :

- **Le domaine extracellulaire** composé de cinq domaines dits immunoglobuline-like, qui sont des motifs caractérisés par une succession d'environ 110 acides aminés reliés par un pont disulfure intra-caténaire qui lui donne une conformation tertiaire en boucle. Cette région est impliquée dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire (Figure 18).
- **Le domaine transmembranaire** hydrophobe constitué de 24 acides aminés qui ancre la molécule dans la cellule.
- **Un domaine intracytoplasmique** à l'origine des interactions avec d'autres protéines intracellulaires et à la transduction du signal.

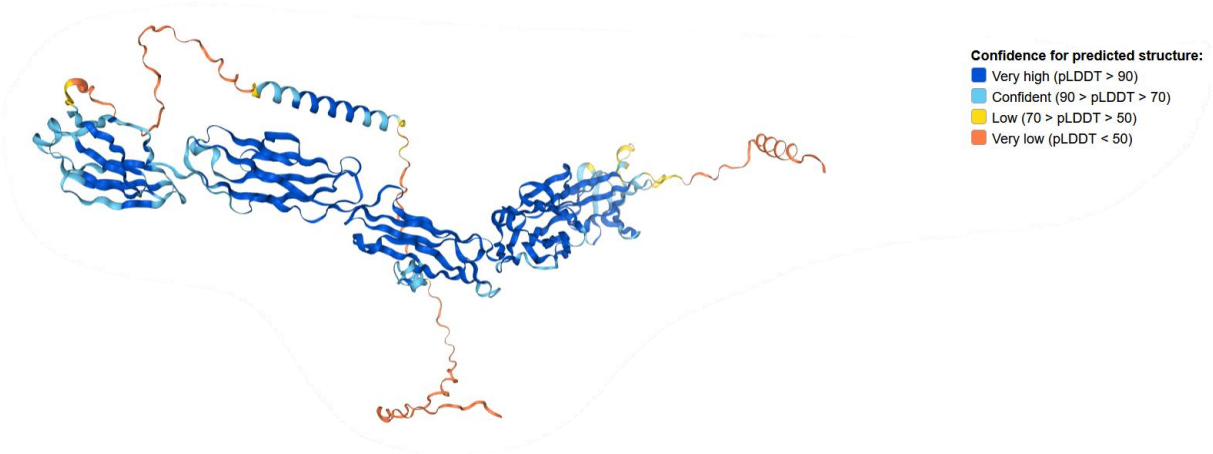


Figure 18: Structure en 3 dimensions de CD146 d'après proteinatlas.org (https://www.proteinatlas.org/ENSG00000076706-MCAM/structure)

Il existe aussi **8 sites de N-glycosylation** sur le domaine extracellulaire situés aux positions des acides aminés 56, 418, 449, 467, 508, 518, 527, et 544 (234) (Figure 17 et Figure 19). Ces sites de glycosylation représentent près du tiers de la masse totale de CD146 ce qui lui donne une masse globale de 113kDa (223), (236). La glycosylation de CD146 permet la stabilisation de la protéine, la régulation de son niveau d'expression et la modulation de sa fonction. Par exemple dans le mélanome métastatique, les enzymes spécifiques de la glycosylation de CD146 , la β-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotéine et la β-1,6-N-acétylglucosaminyltransférase-3, sont plus actives, ce qui entraine une augmentation de la demi-vie de CD146 (237). La mutation de l'acide aminé cystéine 590 de CD146 en glycine diminue la palmitylation de CD146 qui contribue à sa localisation asymétrique et à la promotion de l'invasion cellulaire. Dans le cancer, des mutations des palmityltransférases comme l'acyl protéine thioestérase 1 (APT1) inhibent la dépalmitylation de CD146 et promeut l'invasion des cellules cancéreuses (238) (239).

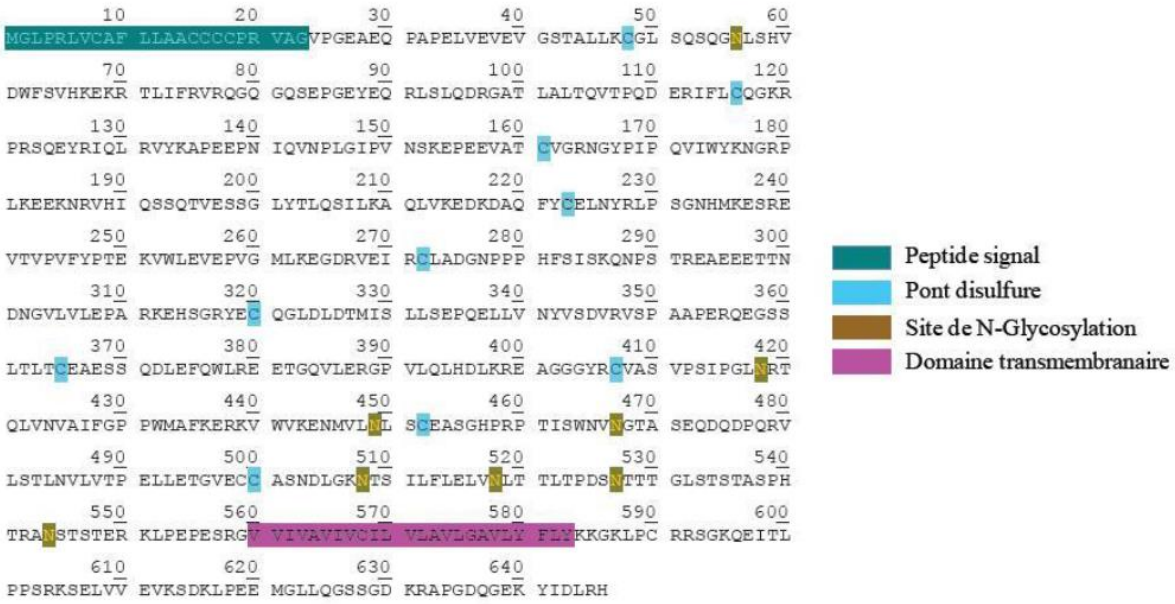


Figure 19: Séquence protéique de CD146 (D'après www.uniprot.org)

12.2.2 Formes membranaires

La protéine CD146 existe aussi chez l'homme sous **deux formes membranaires** obtenues à partir du même gène. Les deux formes résultent aussi d'épissages alternatifs et de modifications post-traductionnelles. Elles sont appelées forme longue (lgCD146) et forme courte (shCD146). Leurs parties extracellulaires et leurs domaines transmembranaires sont identiques. Seule la région intracytoplasmique de CD146 varie. Elle compte 64 acides aminés pour la forme longue et 21 acides aminés pour la forme courte. La forme longue possède deux domaines cytoplasmiques de phosphorylation par la protéine kinase C, un site de liaison au complexe de protéines ERM et un motif à double leucine qui permet d'initier le signal d'endocytose. La forme courte possède, quant à elle, un seul domaine de phosphorylation par la protéine kinase C, ainsi qu'un domaine C-terminal spécifique de liaison à motif PDZ (240). Ces deux isoformes coexistent généralement dans les cellules et peuvent former des monomères et des dimères grâce à une liaison disulfure entre les résidus cystéine. Sous l'action de molécules comme la galectine-3, (241) le VEGF ou, plus largement, sous l'action d'un stress oxydatif, **CD146 peut se dimériser**. Sur les cellules cancéreuses il peut représenter jusqu'à 20% du CD146 membranaire total (242). Cette dimérisation nécessite l'implication des protéines du cytosquelette RAC1 et la **génération de ROS par la Nox4** et les domaines extracellulaires 4 et 5 de CD146 contenant les cystéines 452 et 499 (243). En effet, la génération d'un gène CD146 n'exprimant pas ces domaines ne peut pas se dimériser et activer NF-kB ou la voie AKT et, permettre la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le G-CSF et l'IL-6.

12.2.3 Formes solubles

Il existe aussi **une forme soluble de CD146** (CD146s) générée par le clivage du CD146 membranaire sous l'action de métalloprotéases (6). Découvert en premier lieu dans le surnageant de cellules endothéliales (4), CD146s est retrouvé dans plusieurs liquides biologiques comme le sang (244) ou le LCR (245). Les formes courte et longue sont clivées au niveau de leur partie extracellulaire, ce qui aboutit à la même forme soluble. Les métalloprotéases impliquées dans ce clivage sont TACE et ADAM-10 (149). Il est possible d'inhiber ce clivage par des inhibiteurs non spécifiques des métalloprotéinases (246). Deux autres formes solubles de CD146, issues d'un épissage alternatif de CD146 au niveau des Introns 5 et 13 pour la première forme, et de l'intron 10 pour la seconde, ont été décrites (Figure 20). Des expériences supplémentaires ont montré que la forme I-10 possédait des propriétés angiogéniques via l'activation des voies protéines kinase Cε et des kinases d'adhésion focale (FAK). La forme I5-13 possède des effets pro-fibrotiques au travers de l'activation de la voie Wnt-1/β-catenin/WISP-1 (149).

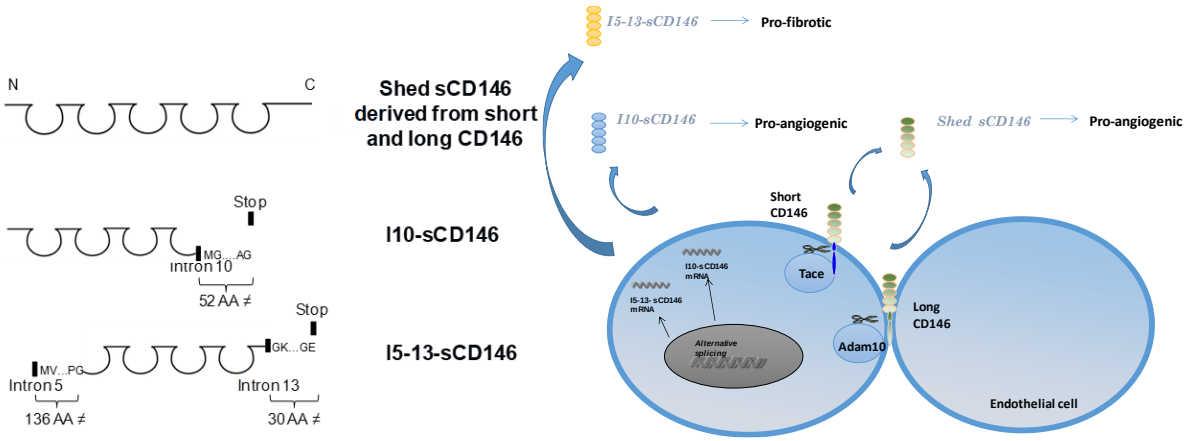


Figure 20: Représentation schématique des isoformes CD146s-I10 et CD146s-I5-13 par rapport à la forme complète. Résumé des mécanismes de génération et des fonctions des différentes variantes du CD146 soluble dans les cellules endothéliales d'après Nollet et al. (149).

13 Localisation

CD146 est exprimé sur de nombreux tissus en raison de ses nombreuses fonctions. En effet, ses fonctions sur la perméabilité vasculaire, la migration, l'inflammation et l'angiogenèse requièrent sa présence dans de nombreux tissus où il est exprimé par différents types de cellules selon le contexte physiologique et pathologique.

13.1 Localisation vasculaire de CD146

Avec une expression tout le long de l'arbre vasculaire, CD146 est principalement exprimé par les cellules endothéliales. Les cellules musculaires lisses et les péricytes expriment aussi CD146 à leur surface.

13.1.1 Localisation endothéliale

CD146 est exprimé par toutes les cellules endothéliales chez l'homme quelle que soit la localisation anatomique des vaisseaux. Il est par exemple exprimé sur les cellules endothéliales de la BHE où il participe à sa maturation et à son intégrité (247). La répartition de CD146 au niveau des cellules endothéliales est fonction de l'état d'activation et de confluence cellulaire. Sur les cellules endothéliales en culture (modèle HUVEC), CD146 est exprimé au niveau du cytoplasme et des jonctions intercellulaires. L'utilisation de TNF-α, une cytokine inflammatoire, induit une redistribution du CD146 cytoplasmique vers les jonctions intercellulaires et la membrane apicale (6). Avant que les cellules n'atteignent l'état de confluence, CD146 est réparti principalement dans le noyau et le cytoplasme, puis, à confluence il est distribué sur la membrane apicale et au niveau de la jonction endothéliale (5). Des expériences de co-marquage avec d'autres molécules de jonction, telles que la PECAM-1, Ve-cadhérine (240), la ZO-1, le complexe β-caténine-N-cadhérine et FAK (248) ont démontré que CD146 était fortement présent au niveau des jonctions cellulaires mais en dehors des jonctions serrées et adhérentes.

L'utilisation d'antisérums spécifiques de la forme courte et de la forme longue a mis en évidence que la forme longue était localisée ou dans le noyau ou à la jonction endothéliale alors que la forme courte se situe dans le cytoplasme et sur le pôle apical de la cellule endothéliale (Figure 21) (5).

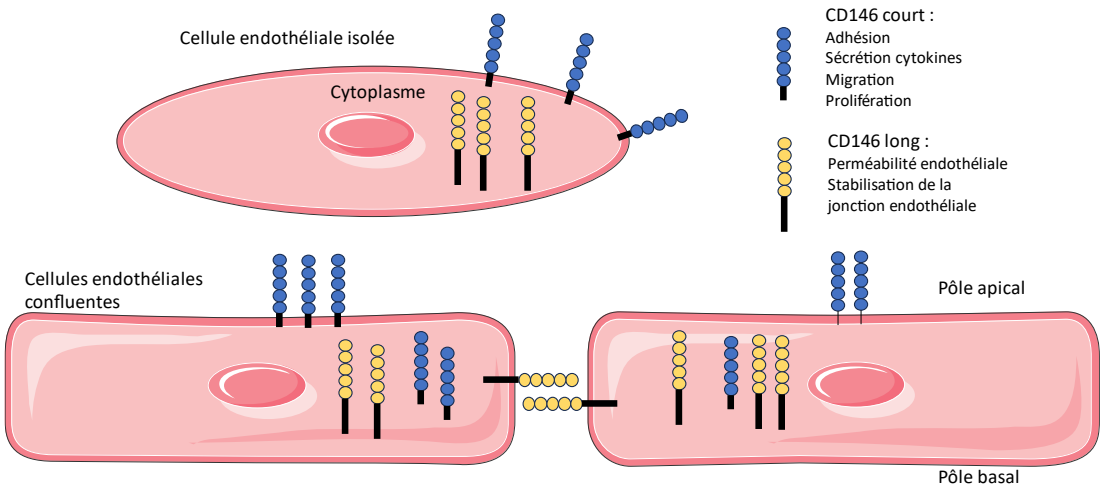


Figure 21: Localisation et fonctions des isoformes de CD146 dans les cellules endothéliales adapté de Kebir et al. (5)

La circulation lymphatique participe à l'homéostasie des vaisseaux et à la veille du système immunitaire. Elle collecte et transporte le liquide interstitiel riche en protéines vers les ganglions lymphatiques puis les relargue dans la circulation sanguine (249). La présence de CD146 sur les cellules endothéliales du système lymphatique n'est pas aussi marquée que sur les vaisseaux sanguins. Des auteurs ont démontré, sur une analyse des cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques cutanées, que les premières exprimaient CD146 alors que les secondes ne l'exprimaient pas (250,251). D'autres auteurs ont montré l'importance de CD146 sur les cellules endothéliales lymphatiques pour le développement du système lymphatique (252).

13.1.2 Cellules musculaires lisses

CD146 est également exprimé par **les cellules musculaires lisses** (CML). Cette expression a été mise en évidence dans le cadre d'études portant sur les cellules souches mésenchymateuses CD146 positives. Une élévation du nombre de cellules CD146 positives par cytométrie en flux est associée à l'expression de marqueurs spécifiques des CML, tels que la calponine-1 et la SM22α (253). Cela suggère que les cellules souches mésenchymateuses CD146 positives ont déjà commencé à se différencier en CML. Cette expression de CD146 au sein des CML a également été confirmée histologiquement, avec une co-localisation de CD146 et SM22α dans les disques intervertébraux (254). De plus, les cellules CD146 positives présentent une contractilité accrue par rapport aux cellules CD146 négatives, que ce soit sur gel de collagène ou à partir d'anneaux fibreux de disques intervertébraux murins ou humains (255).

13.1.3 Péricytes

CD146 est également exprimé par les **péricytes**, des cellules associées aux vaisseaux sanguins situées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires. Les péricytes jouent un rôle essentiel dans le développement vasculaire du cerveau. Dans le tissu cérébral, CD146 facilite l'identification des péricytes car il est co-exprimé avec le protéoglycane Neural/glial antigen 2 (NG2), un marqueur reconnu des péricytes, au cours du développement vasculaire cérébral (256). La présence de CD146 sur les péricytes est également observée dans les cellules périvasculaires du myocarde où il représenterait un potentiel intérêt thérapeutique pour restaurer l'intégrité vasculaire post ischémique. Cette possible fonction est mise en évidence par son rôle dans le rétablissement vasculaire post-ischémique observé chez des rats diabétiques (257). En outre, l'expression de CD146 sur les péricytes est associée à un

phénotype asymptomatique des plaques d'athérosclérose carotidiennes, soulignant son importance dans la régulation vasculaire (258).

13.2 Stroma médullaire et tissu adipeux

13.2.1 Cellules souches mésenchymateuses

CD146 est exprimé par les **cellules souches mésenchymateuses** (CSM) de la moelle osseuse, où son niveau d'expression est associé à leur capacité de différenciation. Les CSM CD146 positives montrent une grande plasticité, pouvant se différencier en divers types cellulaires, notamment en cellules musculaires lisses, en cellules adipocytaires, en cellules ostéogéniques, en progéniteurs neuronaux, en cellules gliales et en cellules stromales supportant l'hématopoïèse (259). De plus, des études ont démontré le potentiel thérapeutique des CSM CD146 positives dans la régénération osseuse, avec une meilleure capacité de migration vers le fémur après fracture de ce dernier que les CSM négatives (260). Dans l'arthrite de la souris, l'injection de CSM CD146 positif est associée à une diminution de l'inflammation et du nombre de lymphocytes Th17 (261).

13.2.2 Tissu adipeux

L'analyse par cytométrie en flux de la **fraction vasculaire stromale (FVS) du tissu adipeux sous-cutané** a mis en évidence trois populations principales de cellules progénitrices adipeuses (ASC) selon l'expression de surface cellulaire de CD146, DLK1 et CD34. Dans les petits vaisseaux il a été retrouvé aussi des cellules endothéliales (CD31+/CD34+/CD146+) et des péricytes (CD31-/CD34-/CD146+). Dans les ASC, CD146 est principalement localisé dans le compartiment intracellulaire, proche de l'appareil de Golgi. De plus, alors que les niveaux protéiques de CD146 détectés par Western-blot et RT-PCR sont plus importants dans la FVS et le premier passage en culture des ASC, ceux-ci diminuent dans les passages ultérieurs des ASCs en culture (262).

L'expression de CD146 est augmentée dans **le tissu adipeux** chez l'homme et la souris. Une analyse plus poussée montre que les souris soumises à un régime haut en lipides expriment CD146 de manière plus importante dans le tissu adipeux. Après suppression de CD146 chez la souris il a été noté une réduction de l'obésité, une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une réduction de l'inflammation adipeuse chez les souris soumises à ce même régime. En effet, CD146 favorise l'adipogenèse via la maturation des préadipocytes en adipocytes tandis que dans les adipocytes matures il induit l'accumulation de lipides sous forme de triglycérides. Chez l'homme CD146 corrèle avec l'indice de masse corporelle (263).

13.2.3 Fibroblastes

Habituellement absent de la surface des fibroblastes, l'expression de CD146 par les fibroblastes associés au cancer (CAF) a été documentée dans divers types de cancer (264). Il s'agit de fibroblastes qui résident dans le stroma tumoral et produisent plusieurs facteurs de croissances, cytokines et enzymes afin de favoriser la progression tumorale, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) et d'inhiber la réponse du système immunitaire (265).

De manière intéressante, l'expression de CD146 sur les CAFs en coculture avec des cellules de cancer du pancréas permet d'inhiber la migration et l'invasion des cellules tumorales et la production de facteurs pro-tumorigènes via la modulation de l'activité de NF-kB (266). Dans le cancer du sein la présence ou l'absence de CD146 déterminerait deux types différents de CAF avec une sécrétion différente de protéines de la matrice extracellulaire :

Les CAFs CD146 positifs produiraient plus de laminines α, β et γ impliquées dans la membrane basale. Ils agissent comme une barrière à l'invasion des cellules tumorales.

Les CAF CD146 négatifs favoriseraient un environnement riche en fibronectine, lysyl oxydase et ténascine C des molécules exprimées dans les tumeurs agressives avec envahissement des ganglions lymphatiques (267).

Notre équipe a montré l'expression de CD146 sur des fibroblastes de patients avec une SSc quels que soient la forme clinique et le profil d'auto-anticorps des patients. De plus, l'expression de CD146 persistait après plusieurs passages en culture (données non publiées). En contrôle des fibroblastes cutanés obtenus à partir de biopsies cutanées sur des zones non fibrosées n'expriment pas CD146 (268). En outre, la stimulation de fibroblastes « controles » par des ROS pendant 48 heures induisait une expression à leur surface de CD146 alors qu'il était absent à l'origine. La stimulation par les ROS des fibroblastes de patients avec SSC n'entraînait pas d'augmentation significative de l'expression de CD146, cette expression étant déjà au pic. Par ailleurs, nos expériences sur des fibroblastes murins exprimant CD146 de manière constitutive ont également montré une augmentation de l'expression de CD146 à la suite de l'induction de ROS. L'ensemble de ces résultats montre que CD146 représente un marqueur des fibroblastes cutanés dans la sclérodermie systémique.

13.3 Système immunitaire

13.3.1 Cellules lymphocytaires

L'analyse immunohistochimique du thymus met en évidence la présence de CD146 sur les thymocytes corticaux immatures, montrant ainsi une expression de CD146 à un stade précoce de la différenciation lymphocytaire T (269).

Chez les témoins sains, CD146 représente environ 1% des cellules mononucléées sanguines. Ces cellules sont majoritairement des lymphocytes T CD4 et CD8, moins fréquemment des lymphocytes B mais très rarement des lymphocytes NK (270). On retrouve aussi plus fréquemment CD146 à la surface des lymphocytes T de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (271) et de dermatites de contact (272). Sur les biopsies cutanées de ces derniers, ils représentaient entre 50 et 80 % des lymphocytes T. La stimulation des lymphocytes par CD40L et IL-4 ou des agents mitogènes permet d'induire l'expression de CD146 par les lymphocytes (270) ; ce qui suggère que CD146 pourrait être un marqueur d'activation des lymphocytes T. Des études ultérieures ont montré que les lymphocytes T exprimant CD146 correspondaient au sous-type Th17, un sous-type lymphocytaire qui intervient dans la réponse inflammatoire grâce à la production de l'interleukine 17 (146,273). On retrouve des cellules lymphocytaires Th17 enrichies en CD146 dans plusieurs pathologies inflammatoires comme le psoriasis (274), la polyarthrite rhumatoïde dans le sang et le liquide articulaire (275), la sclérose en plaque dans le LCR (276) ou la SSc (146). Dans cette dernière pathologie, notre équipe a aussi mis en évidence que la population Th17CD146 positive est inversement corrélée avec la sévérité de la maladie et que la stimulation de lymphocytes Th17 par CD146s induisait l'expression de CD146 à la surface de ces derniers (146). Il a aussi été rapporté dans le cancer pulmonaire une élévation des lymphocytes TCD146 positifs par rapport à des sujets sains (277). Ces lymphocytes T de phénotypes CD4+CD25+CD127 faiblement positifs étaient des lymphocytes T régulateurs.

L'expression de CD146 sur les cellules immunitaires n'est pas spécifique de l'homme. Chez la souris, CD146 n'est pas exprimé sur les lymphocytes T, B, les monocytes et les cellules dendritiques, alors que 30% des polynucléaires neutrophiles et 60% des lymphocytes NK l'expriment. L'expression de CD146 est aussi corrélée avec le stade de maturation des lymphocytes NK objectivé par l'expression des marqueurs CD27 et CD11b (278). Chez les oiseaux CD146 serait aussi un marqueur des progéniteurs lymphoïdes T dans la moelle osseuse (279). CD146 permettrait la colonisation de la moelle osseuse par les cellules lymphoïdes (280).

13.3.2 Autres cellules immunitaires

L'expression de CD146 dans l'environnement thymique ne se limite pas seulement aux thymocytes mais aussi aux autres cellules de l'environnement thymique que sont les macrophages, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses. Sa présence pourrait jouer un rôle important dans le maintien de l'architecture thymique en plus d'agir sur la migration lymphocytaire hors du thymus (269).

Bien que CD146 soit absent des monocytes, il est exprimé par les macrophages de la plaque athéromateuse où il jouerait un rôle dans le recrutement de cellules immunitaires au niveau de la plaque (281,282). L'expression de CD146 est aussi augmentée dans les macrophages alvéolaires des poumons de patients atteints de COPD et d'asthme, comparativement à des sujets sains (283).

13.4 Expression de CD146 à l'interface materno-foetale

L'expression de CD146 est variable dans les différents tissus au cours de la grossesse. Des marquages immunohistochimiques ont mis en évidence la présence de CD146 sur l'utérus de souris uniquement pendant la gestation (284). Il a été retrouvé chez l'humain sur plusieurs types cellulaires. Il est exprimé au niveau du placenta sur les villosités, par les trophoblastes intermédiaires et extravilleux. Dans l'endomètre il serait exprimé sur le complexe cumulus-ovocyte et dans les premiers stades de l'embryogenèse puis par le blastocyste. Chez la souris il est positivement régulé dans les utérus maternels réceptifs et les trophoblastes embryonnaires invasifs pendant les premiers stades de la grossesse ; son expression sur les trophoblastes s'estompe progressivement par la suite.

Son expression sur **les villosités placentaires** montre un modèle de sélectivité spatiale, augmentant progressivement dans la zone d'ancrage entre les villosités et la décidu, permettant l'attachement du placenta à la paroi utérine (285). CD146 est principalement exprimé sur les **trophoblastes intermédiaires**, un sous-type de trophoblastes situés morphologiquement et fonctionnellement entre les syncytiotrophoblastes et les cytotrophoblastes (286), et sur les **trophoblastes extravilleux** qui se caractérisent par leur haute capacité migratoire et invasive. L'expression de CD146 sur les trophoblastes intermédiaires facilite leur liaison aux cellules musculaires lisses utérines, ce qui limite l'extension de la zone de migration des trophoblastes au site d'implantation (287).

Dans l'**endomètre**, l'expression de CD146 serait en lien avec son rôle dans la réceptivité utérine et l'implantation de l'embryon. Au niveau du **complexe cumulus-ovocyte**, l'expression élevée de CD146 pourrait être liée à la maturation ovocytaire et à la fertilisation. Dans le

trophectoderme du **blastocyste**, CD146 participe à l'adhésion et à la différenciation des cellules, essentielles pour le développement précoce de l'embryon. Enfin, dans la masse cellulaire interne, CD146 pourrait influencer le développement du blastocyste et sa capacité à s'implanter efficacement. (288). Dès les premiers stades de l'embryogenèse, CD146 est présent à la surface des cellules en division qui vont devenir **morula** puis blastocyste (289).

13.5 Système nerveux central

CD146 est présent sur les cellules souches et les précurseurs neuronaux chez l'Homme (290). Sa présence au sein des cellules souches mésenchymateuses est un indicateur de leur différenciation en cellules neurales (291). Il est aussi présent à la surface de l'hippocampe, du cervelet, des cellules de Purkinje et des cellules sensitomotrices de la moelle épinière du rat et du poulet (292). L'inhibition conditionnelle de CD146 dans le SNC de souris diminue leur appétit et leur taille et provoque une malformation du bulbe olfactif. Les souris se repèrent difficilement dans l'espace et possèdent des troubles de la mémoire (293). Chez le poulet, CD146 se fixe au NOF ce qui permet aux neurones de projeter leur corps cellulaire pour former un axone ou une dendrite, ce processus est appelé neurite (294). Chez les rongeurs l'augmentation de CD146 permet aux cellules de Schwann de régénérer les neurones périphériques (295). Il a aussi été rapporté que les cellules CD146 positives favorisent la régénération *in vitro* des cellules de l'hippocampe (296).

13.6 Cancer

Initialement identifié sur les cellules de mélanome métastasant (223), CD146 est aussi bien exprimé par des cellules cancéreuses primaires que métastatiques (297). Dans le mélanome son expression est de mauvais pronostic car elle est corrélée à la capacité des cellules à métastaser (298). De plus, CD146 a été associé à un stade avancé de divers autres cancers tels que la prostate (299), le rein (300), certains cancers pulmonaires (301–304) et le sein (305). Des études suggèrent que même si peu de tumeurs mammaires expriment CD146, son expression semble directement liée à l'agressivité tumorale en favorisant la mobilité et la migration des cellules tumorales (306). L'expression de CD146 est modulée en fonction du traitement et des chimiothérapies. Dans le carcinome rénal à cellules claires, notre équipe a montré que l'expression de CD146 augmente lorsque les cellules deviennent résistantes au sunitinib, inhibiteur des PDGFR et VEGFR. L'analyse des cellules résistantes met en évidence un surexpression membranaire de CD146 et une augmentation de CD146s dans le milieu de culture (307).

14 Rôles de CD146

L'étude des fonctions de CD146 a débuté depuis sa découverte en 1987. Il s'agit d'une molécule d'adhésion possédant plusieurs rôles dans des processus physiologiques dont les principales sont **l'inflammation** et **l'angiogenèse**. Sa forte expression au niveau des vaisseaux en fait une molécule stratégique pour faciliter la migration et la prolifération des cellules endothéliales, l'adhésion et la transmigration endothéliales des leucocytes et des cellules cancéreuses. Dans les tissus il participe à la survie, la migration ou la différentiation de plusieurs types cellulaires (Figure 22).

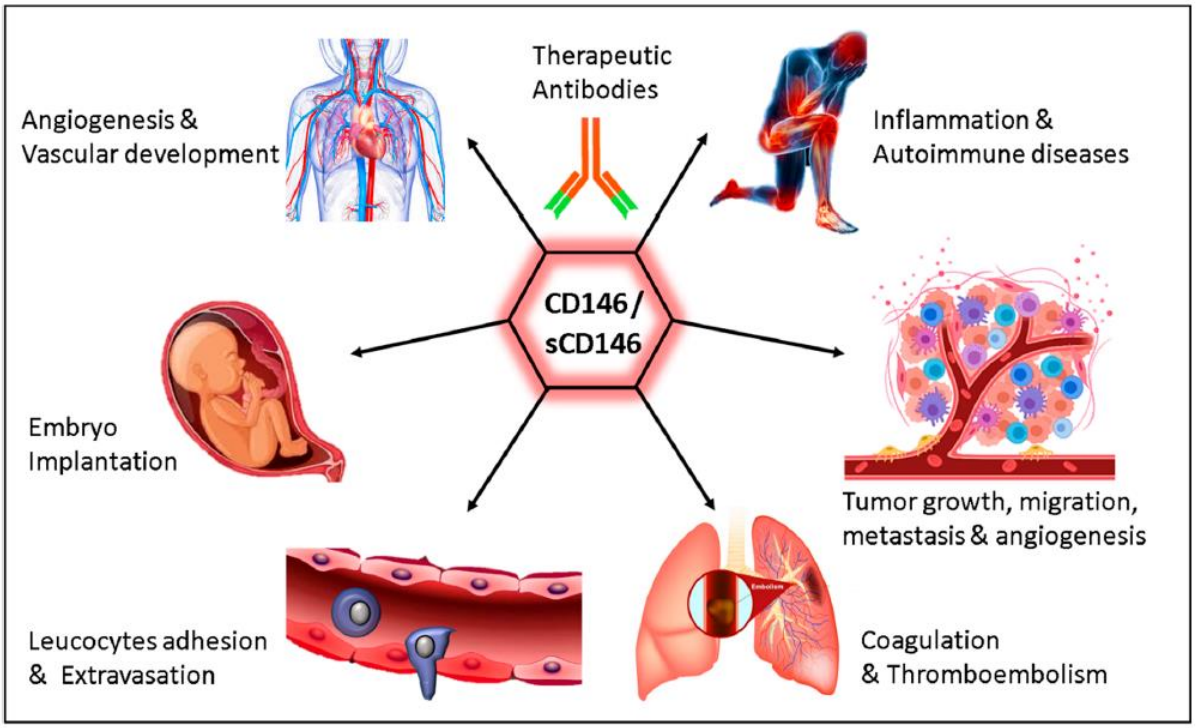


Figure 22: Illustration résumant les rôles de CD146 et CD146 soluble en physiologie et pathologie (308).

14.1 Rôle dans l'intégrité et perméabilité vasculaire

En raison de sa localisation jonctionnelle et de son expression dépendante de la confluence cellulaire, CD146 joue un rôle clé dans le contrôle de la perméabilité des vaisseaux sanguins. L'utilisation d'un anticorps anti-CD146 sur des cellules endothéliales microvasculaires confluentes augmente *in vitro* la perméabilité cellulaire à l'albumine par inactivation du facteur de transcription NF-κB (309). Cette modification de perméabilité cellulaire n'est pas spécifique de la cellule endothéliale. En effet, la mesure de la perméabilité paracellulaire de fibroblastes transfectés pour surexprimer CD146 montre une diminution de

celle-ci par rapport à des fibroblastes non transfectés (248). L'utilisation de SiRNA spécifiques de la forme courte et de la forme longue de CD146 a mis en évidence que la forme longue est davantage impliquée dans les liaisons cellule-cellule, la formation de capillaires en matrigel et la perméabilité cellulaire (5).

Le dosage de la forme soluble dans le LCR serait corrélé à une **augmentation de la perméabilité** de la BHE. Sur un modèle *in vitro* de BHE, Wang et al. ont observé une diminution de la perméabilité de la BHE objectivé par un passage plus important de peroxydase de raifort (HRP) et une diminution de la résistance électrique trans-endothéliale à des concentrations élevées de CD146s (1mg/L) (310). Cette équipe montre aussi que CD146 participe à la maturation de la BHE au cours du développement embryonnaire (247).

14.2 Rôle dans l'angiogenèse

CD146 intervient à la fois dans l'angiogenèse physiologique et dans l'angiogenèse pathologique. La suppression de CD146 chez le poisson zèbre inhibe le développement des vaisseaux intersomitiques et diminue le flux sanguin à travers les vaisseaux (311,312). Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps neutralisant CD146 chez des souris greffées avec des cellules cancéreuses humaines diminue l'angiogenèse tumorale (313). Cet anticorps diminue aussi le nombre de vaisseaux formés sur un modèle d'angiogenèse *in vitro* de membrane chorioallantoïde de poulet. Au cours du développement vasculaire rénal chez l'homme, la capacité de régénération des cellules endothéliales est bloquée lorsque le CD146 est inhibé ou bien lorsque le pool de cellules exprimant CD146 est éliminé. Par ailleurs, l'inhibition des molécules CD31 et Tie1 des cellules endothéliales ne modifie pas cette régénération (314). CD146 protège les cellules endothéliales de l'apoptose cellulaire induite par des molécules comme la galectine-1. L'inhibition de CD146 sur des cellules endothéliales de sang de cordon augmente l'apoptose liée à la galectine-1. Ce mécanisme de survie cellulaire est important dans la prolifération et le développement des vaisseaux sanguins (315). Il permet aussi aux progéniteurs endothéliaux de survivre à **l'apoptose liée aux ROS** et ainsi de participer indirectement à la migration et à l'angiogenèse physiologique (316). En outre, CD146 participe à la lymphangiogenèse puisque son inhibition diminue ce phénomène au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre (252).

La forme courte, la forme longue et la forme solubles jouent toutes les trois un rôle différent dans l'angiogenèse. L'utilisation de siRNA dirigés spécifiquement contre chacune des formes montre que la forme courte favorise l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire avec sécrétion d'IL-8 et d'angiopoiétine-2, alors que la forme longue permet la

stabilisation des pseudocapillaires (5). La forme soluble augmente de façon importante les capacités de migration, de prolifération et de formation de pseudo-capillaires des cellules endothéliales matures ou progénitrices. Dans un modèle d'ischémie de la patte chez le rat, l'injection de CD146s augmente l'expression de VEGFR, MMP-2, e-NOS et s'accompagne d'une augmentation du taux de reperfusion sanguine de la patte et de la densité des capillaires (317). La forme soluble CD146s-I10 possède elle aussi des propriétés angiogéniques similaires à CD146s *in vitro* en améliorant la prolifération, la migration et la formation de pseudo-capillaires des cellules endothéliales, alors que la forme CD146s-I5-13 ne présente pas d'effets pro-angiogéniques (149).

14.3 Rôle sur le cytosquelette et la migration cellulaire

La polarisation cellulaire coordonnée par CD146 est importante pour la bonne formation du réseau vasculaire et du système nerveux central au cours du développement embryonnaire chez les vertébrés. En effet pendant le développement embryonnaire du poisson zèbre, l'action de CD146 sur la polarité cellulaire participe à la fois au développement du système nerveux central et au réseau vasculaire chez les vertébrés (318,319). La migration cellulaire liée à CD146 joue aussi un rôle majeur pendant le développement embryonnaire. L'expression de CD146 sur les trophoblastes intermédiaires facilite leur liaison avec les cellules musculaires lisses utérines, ce qui limite l'extension de la zone de migration des trophoblastes au site d'implantation (287). Au cours des premières phases de la grossesse, CD146 semble jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'invasion et de la migration des trophoblastes intermédiaires et extravilleux afin d'assurer une implantation et une vascularisation adéquates de l'embryon (289,320). CD146s semble agir aussi en tant que molécule compétitrice. *In vitro*, CD146s inhibe la migration trophoblastique en bloquant la liaison de la galectine1 avec VEGFR-2 ce qui entraîne des complications obstétricales comme la pré-éclampsie (321).

La contribution de CD146 à la migration cellulaire a aussi été mise en évidence sur plusieurs types de leucocytes. Ainsi sur une lignée de monocyte THP1 et sur des monocytes primaires dont il facilite leur migration à travers la monocouche endothéliale, la capacité migratoire des monocytes est augmentée par le CD146s de manière dose dépendante (322). L'interaction avec l'endothélium est essentielle puisque la perte d'expression de CD146 sur des cellules endothéliales, comme les cellules endothéliales pulmonaires, est associée à une augmentation de la perméabilité endothéliale et à une infiltration de monocytes dans les poumons au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive (323). Les lymphocytes

TCD146 positifs possèdent également une capacité migratoire accrue par rapport aux lymphocytes TCD146 négatifs, vers le système nerveux central au cours de la sclérose en plaque (324,325), ou vers l'articulation dans la polyarthrite rhumatoïde (326). La transfection de CD146 sur une lignée de lymphocytes natural killer NKL1 a été associée à une réduction de la vitesse de roulement sur l'endothélium et à une augmentation de l'adhésion aux cellules endothéliales en activant la protéine kinase C via un domaine intracellulaire de CD146. Cette activation induit la mobilisation du cytosquelette, la formation de microvillosités à la surface cellulaire, et une augmentation des liaisons avec la P-sélectine, facilitant ainsi la migration à travers l'endothélium (327). De plus, des tests de surexpression ont montré que seule la forme longue de CD146 est impliquée dans la formation des microvillosités, soulignant son rôle crucial dans la modification du cytosquelette et la promotion de l'adhésion et de la migration cellulaire (328). CD146 contrôle la formation et la progression de la plaque d'athérosclérose, qui dépendent de l'infiltration des monocytes dans la paroi artérielle (282). La capacité migratoire de CD146 provient de son implication avec d'autres protéines du cytosquelette comme les fibres d'actines (248,298) et la myosine (329). CD146 recrute les protéines « ezrine-radixine-moésine » (ERM) avec sa partie intracellulaire. Ce complexe de protéines recrute le facteur inhibiteur de la dissociation de nucléotides de guanine de Rho 1 (RhoGDI1) libérant ainsi RhoA de RhoGDI1, ce qui active RhoA et augmente la mobilité cellulaire (330) (Figure 23). Dans la structure médiée par l'activation de Wnt5a et la chimiokine CXCL12, il participe à l'activation des voies du cytosquelette dépendantes des protéines RhoB et Rab4 pour augmenter la vitesse et la durée de la migration cellulaire (329). La diminution de l'expression de CD146 par des SiRNA réduit significativement la vitesse de migration cellulaire de cellules de mélanome et de fibrosarcome (331). Des résultats similaires sont retrouvés en éliminant le CD146 sur des cellules de cancer du sein et de mélanome à l'aide de nanotiges d'or. L'arrêt complet des capacités migratoires, l'altération de la voie Erm et du cytosquelette sont couplés à une perte de rigidité cellulaire (332) en rapport avec nos observations qui montrent une plus grande rigidité cellulaire sur les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires (LMEC) provenant de souris WT par rapport à des LMEC de souris CD146KO (données non publiées).

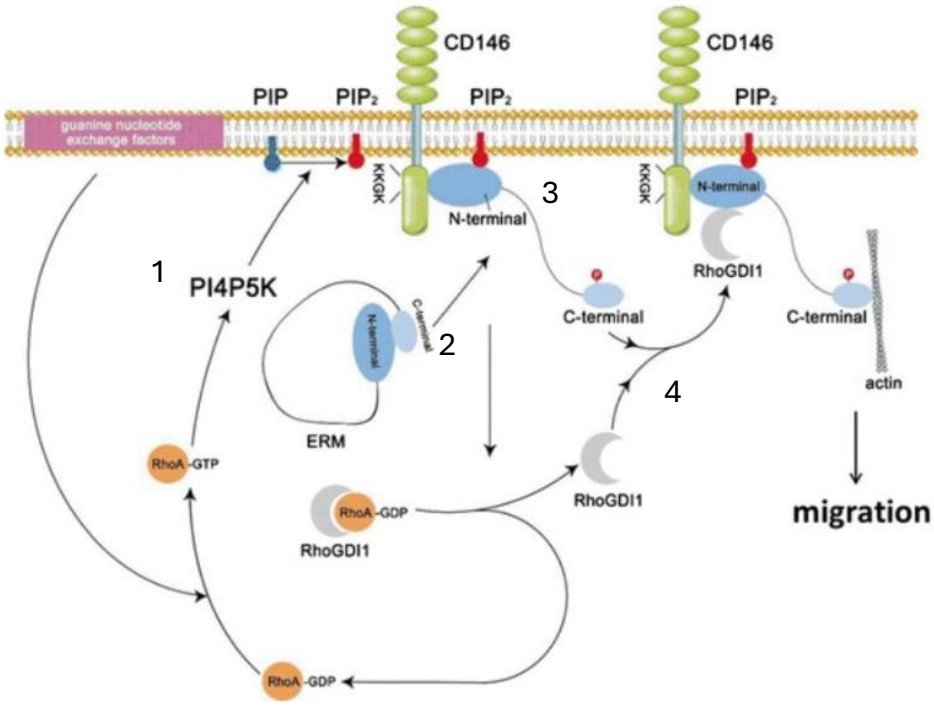


Figure 23: Vue générale abrégée des voies de signalisation CD146-ERM-actine et RhoA-PI4P5K-PIP2. En réponse à une stimulation, le facteur d'échange de nucléotidiques va recruter la protéine RhoA et phosphoryler le phosphatidylinositol monophosphate par la voie RhoA-PI4P5K-PIP2 (1). La moésine (2) va se lier à CD146 et former un complexe CD146/moésine/PIP2 (3). Le recrutement de RhoGDI1 (4) va renforcer l'ancrage de CD146 au cytosquelette, ce qui conduit finalement au mouvement cellulaire (236).

14.4 Inflammation et Fibrose

Le rôle de CD146 a été étudié dans l'inflammation où il facilite l'interaction entre les cellules endothéliales et les leucocytes. Son rôle sur l'inflammation est décrit à la fois sur les lymphocytes, cellules régulatrices de l'inflammation, et directement dans les tissus lésés. Plus récemment, des recherches ont mis en lumière le rôle potentiel de CD146 et de sa forme soluble dans la fibrose (148).

Au cours de l'inflammation, les lymphocytes TCD4 vont être orientés par un ensemble de cytokines qui inclut le TGF-β, l'IL-6, l'IL-1β, et l'IL-23 pour activer les facteurs de transcription p-Stat3, RORγt et RORα, et permettre une différenciation de lymphocytes Th17 effecteurs et mémoires (333) qui jouent un rôle majeur dans l'inflammation. Ainsi la sécrétion de CXCL-13 par les lymphocytes Th17 CD146+ participe au recrutement de lymphocytes B au niveau local (334). Les lymphocytes Th17 mémoires effecteurs CCR7+ CD45RA+ CD146+ sécrètent plus d'IL-8 que les lymphocytes mémoires effecteurs CD146- (335). L'IL-8 est un ligand du récepteur aux chimiokines CXCR-2 qui participe au recrutement des polynucléaires neutrophiles dans les tissus, ce qui amplifie l'inflammation locale (336). En revanche, chez la

souris, l'expression de CD146 est corrélée à une diminution de l'activité cytotoxique et de la production d'interféron gamma par les lymphocytes NK (337).

Dans plusieurs pathologies inflammatoires, l'expression de CD146 est augmentée dans les tissus. Ainsi, si dans l'**épiderme humain** normal, l'expression de l'antigène CD146 n'est pas détectable, elle est fortement augmentée sur les kératinocytes en cas de pathologies inflammatoires comme le psoriasis ou le lichen plan (338).

Dans le **poumon**, l'augmentation de CD146 sur les cellules épithéliales pulmonaires dans l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) cause une augmentation de la colonisation et l'inflammation locale par des bactéries respiratoires. Chez les souris infectées par *Mycoplasma pneumoniae*, un pathogène impliqué dans les exacerbations des maladies pulmonaires, les souris déficientes en CD146 montrent des niveaux réduits de cytokines pro-inflammatoires et un moindre recrutement de polynucléaires neutrophiles que les souris normales. La transfection de CD146 dans ces macrophages augmente de nouveau la production de cytokines pro-inflammatoires (283). La surexpression de CD146 entraine une augmentation du nombre de bactéries (*Mycoplasma pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*) adhérentes sur les cellules transfectées par une interaction directe de CD146 avec les bactéries (339). Il est observé une charge virale et une infiltration par des polynucléaires neutrophiles diminuées chez les souris déficientes en CD146 après inoculation d'une souche de rhinovirus (340). La présence de CD146 favorise cette inflammation par une augmentation de production d'IL-8 et une diminution de l'expression d'IFN-β (341).

Dans le **rein**, l'examen de biopsies provenant de patients souffrant de néphropathie révèle une élévation de l'expression de CD146 sur les cellules endothéliales et mésangiales, ainsi qu'une expression nouvellement apparue sur les cellules tubulaires (342). Une corrélation a été observée entre l'expression accrue de CD146 et des facteurs tels que l'intensification de la protéinurie, la prolifération endocapillaire, et la présence d'un syndrome inflammatoire. Chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique, notamment ceux souffrant de néphropathie diabétique de type 2, les niveaux sériques de CD146s sont plus élevés et sont corrélés à la gravité de la maladie (343).

Dans les **maladies chroniques inflammatoires de l'intestin** (MICI) une augmentation de l'expression de CD146 endothéliale est observée sur des biopsies intestinales pendant les phases actives ainsi qu'une diminution des concentrations sériques de CD146s au cours des phases de poussées et quand la pathologie est plus étendue (344). De manière intéressante, l'utilisation d'un anticorps thérapeutique dirigé contre le TNF-α permet de restaurer des

concentrations de CD146s normales chez les patients répondeurs quatre semaines après le début du traitement (345).

En parallèle, des publications récentes ont mis en évidence que CD146 est impliqué dans la **fibrose** et en particulier celle de la SSc. Il faciliterait l'activation des fibroblastes cutanés et stimulerait leur prolifération pour produire de la matrice extracellulaire. En inactivant CD146 par un SiRNA *in vitro* ou par un anticorps monoclonal *in vivo* l'activité de la β-caténine et l'expression des gènes pro-fibrotiques (α-SMA et collagène de type I) peuvent être réduits (346). Une isoforme soluble appelée CD146s-I5-13 montre des effets pro-fibrotiques, augmentant l'expression de vimentine et d'α-SMA dans les fibroblastes dermiques humains, ainsi que l'activation de la voie Wnt β-caténine dépendante, ce qui est important dans la médiation de la fibrose (Figure 20). CD146s-I5-13 a également été liée à une augmentation de l'expression de WISP-1, un médiateur clé de la fibrose pulmonaire. Dans le modèle murin de fibrose cutanée induite par bléomycine que nous avons mis au point dans le laboratoire, notre équipe a montré que le traitement avec CD146s ou CD146s-I10 réduisait l'épaisseur du derme et protégeait de la fibrose, contrairement à CD146s-I5-13 qui l'a favorisé. Au niveau du sérum des patients avec SSc, les formes solubles de CD146s totale et CD146s-I-5-13 sont augmentées alors que CD146s-I-10 est diminuée. La forme CD146s-I5-13 est positivement corrélée avec le marqueur de fibrose pulmonaire KL-6.

14.4.1 CD146 dans le cancer

Dans le cancer, les fonctions de CD146 sur la prolifération, la dissémination tumorale et la résistance aux chimiothérapies sont décrites dans de nombreuses publications de notre équipe (308). Je discuterai principalement des publications relatives à des thérapies potentielles ciblant CD146 et CD146s.

Par exemple, dans des xénogreffes de cellules souches cancéreuses sur des souris, l'utilisation combinée d'anticorps anti-VEGF (Bevacizumab) et anti-CD146 (AA98), démontre un effet synergique des deux anticorps thérapeutiques sur l'inhibition du développement tumoral (347). Un autre anticorps synthétisé par notre laboratoire, qui reconnaît spécifiquement CD146 à la surface des cellules cancéreuses (348), diminue la croissance de cellules tumorales sur xénogreffe de souris par diminution de la prolifération et augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses CD146 positives, après internalisation du complexe CD146-anticorps anti-CD146 à la surface de la cellule. Dans le glioblastome, l'augmentation de la concentration de CD146s dans le sérum après le premier cycle de traitement par le bevacizumab, un anticorps anti-VEGF-A, était significativement associé à une survie réduite.

De plus, le traitement *in vitro* avec bevacizumab de cellules de glioblastome CD146 positives a entraîné une forte sécrétion de CD146s, induisant l'invasion cellulaire. Ces effets peuvent être bloqués par un anticorps ciblant spécifiquement CD146s qui, utilisé conjointement avec du bevacizumab, réduit la croissance et la dissémination des cellules de glioblastome CD146+ après xénogreffe *in vivo* chez la souris (349). CD146s participe à la dissémination tumorale et à l'induction d'un phénotype procoagulant dans le cancer. L'anticorps monoclonal ciblant CD146s a considérablement réduit le nombre de métastases et également l'activité pro-coagulante, en particulier en diminuant le nombre de microparticules tumorales circulantes, et a bloqué les voies de signalisation pertinentes, comme le démontrent les expériences de profilage d'expression génique par ARN dans deux modèles expérimentaux (xénogreffes sous-cutanées et injection intracardiaque de cellules cancéreuses chez des souris) (306).

14.4.2 Rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse et la transition endothélio-mésenchymateuse

CD146 et CD146s induisent l'EMT. Pour rappel, il s'agit d'un processus de développement dans lequel les cellules épithéliales perdent leur polarité et développent un phénotype mésenchymateux ou de cellules souches. Les principaux événements de l'EMT sont la perte de marqueurs épithéliaux, suivie d'une expression accrue des marqueurs mésenchymateux et d'un réarrangement du cytosquelette sous l'action de plusieurs facteurs de transcription, notamment SIP1, Snail, Slug et Twist, qui inhibent le phénotype épithélial et répriment la transcription de l'E-cadhérine. Un certain nombre de voies de signalisation converge vers ces facteurs de transcription pour induire une EMT, particulièrement l'activation de petites GTPases, notamment RhoA, qui régulent la réorganisation du cytosquelette d'actine. Dans le cancer du sein, CD146 est fortement corrélé à l'activation de l'EMT. Il réprime les marqueurs épithéliaux et augmente l'expression des marqueurs mésenchymateux, favorisant ainsi la migration cellulaire, l'invasion et l'induction de propriétés de cellules souches cancéreuses (CSC). De plus, les voies de signalisation RhoA régulent positivement l'EMT induite par CD146 via le facteur de transcription clé de l'EMT, Slug (350). Dans les cancers gastriques, CD146 est aussi corrélé à une perte d'expression de E-cadhérine et une acquisition de marqueurs mésenchymateux comme la β-caténine nucléaire et la vimentine. L'extinction de CD146 diminue le nombre de métastases et améliore la survie globale dans le cancer colorectal dans des xénogreffes sur les souris. L'EMT induite par CD146 peut aussi être activée via le TGF- β ou

le BMP4 qui acte à son tour les voies STAT3/Twist et ERK. STAT3/Twist inhibe l'E-cadhérine alors que ERK augmente l'expression de N-cadhérine. Des analyses histologiques de cancer de l'ovaires ont montré une corrélation entre la présence de CD146 et l'absence de E-cadhérine. Ces observations ont été réalisées dans le cancer de l'ovaire mais aussi dans un contexte non cancéreux avec des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (351). Dans un autre contexte pathologique non cancéreux : l'induction d'un asthme *in vitro* sur cellules épithéliales pulmonaires a montré que CD146 participe au remodelage des voies aériennes supérieures en stimulant l'EMT. L'activation de la cytokine TGF-β et du facteur de transcription SMAD-3 par un extrait d'acarien requiert la coopération entre CD146 et IL-33. Le TGF-β et SMAD-3 vont alors pouvoir induire l'EMT des cellules épithéliales bronchiques (352). Les auteurs ont aussi retrouvé des concentrations plus importantes de CD146s chez les patients asthmatiques que chez les sujets sains. Cela suggère aussi que CD146s joue un rôle dans l'EMT hors contexte cancéreux.

Le rôle de CD146 dans l'endoMT est moins clair. D'un côté, chez les patients avec hypertension artérielle, il a été observé, avec confirmation sur un modèle murin, une augmentation de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et de gènes SNAIL/SLUG liés à la transition endothélio-mésenchymateuse. L'intéraction entre la protéine rétrovirale endogène humaine désoxyuridine triphosphate nucléotidohydrolase (HERV-K dUTPase), qui provoque une hypertension artérielle, et CD146 induit l'activation par la MAP kinase Phospho-p38 de NF-κB de SNAIL (353). De l'autre, l'absence de CD146 sur les cellules endothéliales facilite la transition endothélio-mésenchymateuse induite par l'angiotensine II ou le TGF-β1. L'analyse par RNAseq montre que cette transition endothélio-mésenchymateuse induite par ces molécules nécessite l'activation de la voie Wnt β-caténine dépendante (354).

15 Facteur modifiant l'expression de CD146

CD146 est soumis à une régulation complexe, augmentée ou diminuée, dans divers contextes physiologiques et pathologiques (Figure 24).

De manière physiologique il a été démontré que :

l'**endothéline-1** et l'**endothéline-3** stimulent l'expression de CD146 chez les mélanocytes via le récepteur ETB par une hypothétique activation du facteur de transcription CREB (355).

Les **acides gras** augmentent aussi l'expression de CD146 par augmentation du facteur de transcription CREB au niveau du promoteur de CD146 (263).

L'**angiotensine-II** augmente les **ROS**, ces dernières induisent ainsi l'expression de CD146 et régulant la transition endothélio-mésenchymateuse (354).

Le **TGF-β** issu des péricytes inhibe la production de CD146 (247) sur les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique dans un modèle de co-culture de cellules primaires murines. De manière plus générale, l'inhibition des voies de signalisation ERK diminue aussi la production de CD146 (255).

Dans différentes conditions pathologiques il est possible de retrouver une modification de l'expression de CD146.

Dans le cancer où la protéine **HSP-27** (356) ou bien la **protéine 7A contenant le doigt de zinc et le domaine BTB** (357). Ces protéines sont ainsi capables d'inhiber la migration et l'invasion des cellules de mélanome et, pour HSP-27, de réprimer l'intégrine αvβ3, l'un des récepteurs de CD146s. L'activation de la protéine **AKT** augmente l'expression de CD146 dans les lignées de mélanome, et réciproquement, CD146 active les voies d'AKT pour augmenter la survie cellulaire (358). Enfin, le facteur de transcription **FOXO3a** régule positivement CD146 au niveau transcriptionnel, et la **Semaphorine 3** modifie également son expression via PTEN et FOXO 3a, influençant la croissance tumorale et l'angiogenèse dans un modèle murin *in vivo* (359).

Au cours de l'inflammation dont l'une des cytokines, le **TNFα**, entraîne une augmentation de l'expression de CD146 à la surface des cellules endothéliales, principalement par une synthèse accrue et la redistribution des réserves intracellulaires de CD146 (322). De plus, le TNFα augmente la libération de CD146s par stimulation des métalloprotéinases. D'autres molécules inflammatoires telles que l'**IL-1** et le **LPS** sont également impliquées dans la régulation positive de CD146 (360). Dans un autre modèle d'inflammation, l'hépatite, le **TGF-β** stimule la production d'ARNm de CD146, favorisant la régénération hépatocytaire via les voies de signalisation ALK5, SMAD2 et SMAD4 (361). Dans l'anneau fibreux de souris, la liaison du TGF-β avec son récepteur ALK5 augmente l'expression de CD146 via les voies de signalisation SMAD2, SMAD4 et AKT (255). Dans un modèle d'EMT induit par le TGF-β dans le cancer, l'expression de CD146 est augmentée après administration de TGF-β sur des cellules de cancer ovarien et mammaire (351). Ainsi, il semble qu'en conditions physiologiques l'expression de CD146 est diminuée par le TGF-β alors qu'en

conditions pathologiques l'expression de CD146 est augmentée par le TGF-β. Ces résultats suggèrent que la modulation de CD146 par le TGF-β nécessite plusieurs partenaires et dépend des conditions de l'environnement cellulaire. Dans l'asthme, qui est caractérisé par une inflammation des voies aériennes supérieures, nous pouvons retrouver une augmentation de l'expression de CD146 par l'**IL-13** et le facteur de transcription **Sp1** (339). Dans la BPCO il a été démontré *in vitro* que la **fumée de cigarette** et l'**IL-18** diminuaient l'expression de CD146 endothéliale qui augmente la perméabilité des cellules endothéliales microvasculaire pulmonaires et l'infiltration des macrophages (323).

Dans d'autres contextes chroniques nous pouvons aussi observer des variations de CD146 comme le diabète ou l'athérosclérose où l'augmentation de la **glycémie** conduit à une surexpression de CD146 au niveau des tubules rénaux (362), tandis que dans l'athérosclérose l'augmentation de CD146 se produit en conséquence de la capture de **LDL oxydées** par les macrophages, établissant une boucle d'amplification via la voie NF-κB (282). L'hypoxie induite par l'hypertension artérielle pulmonaire entraîne l'expression de CD146 dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires par le biais du facteur de transcription **HIF-1α** (363).

Enfin, d'autres éléments régulateurs comme les microARN peuvent inhiber l'expression de CD146 tels que **miR-329** sur les cellules endothéliales microvasculaires (364) ou le **miR-573** dans les cellules de mélanome (365).

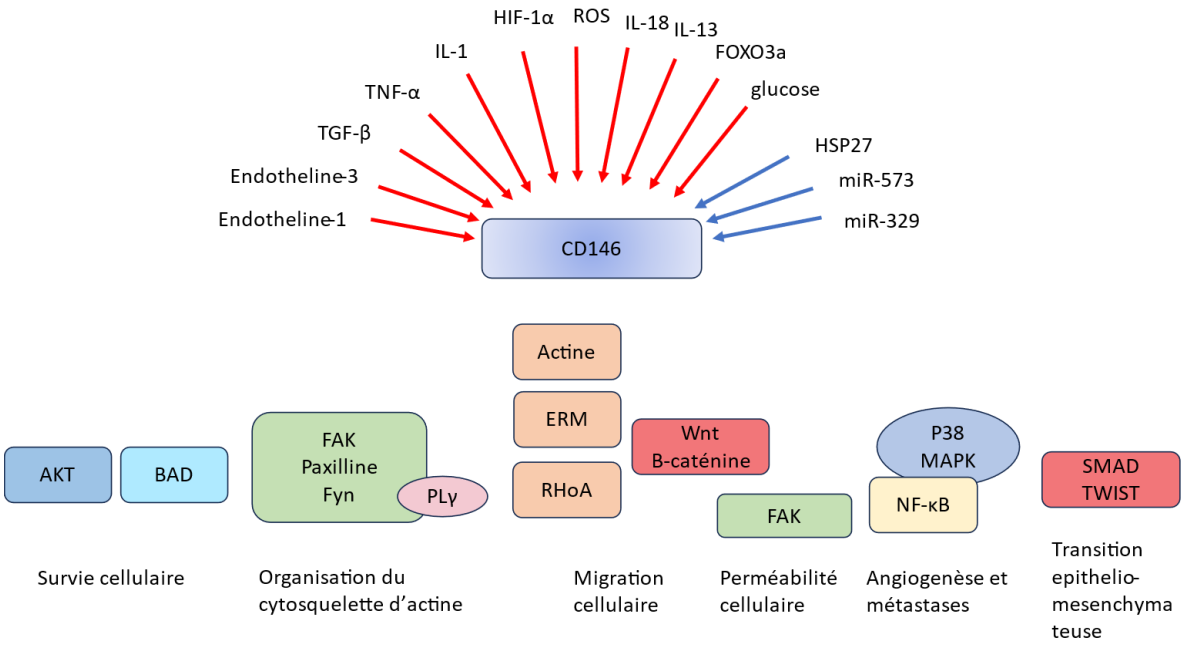


Figure 24: Schéma récapitulatif des activateurs et inhibiteurs de CD146 et des voies activées par CD146 et leur fonctions.

16 Partenaires de CD146

En fonction des isoformes de CD146 et du type cellulaire qui l'exprime, CD146 possède différents partenaires. Il peut exercer des fonctions de récepteur, cela signifie que la liaison avec un ligand va déclencher une réponse cellulaire par un signal. Dans le cas où CD146 est un co-récepteur il va alors renforcer la liaison du récepteur avec son ligand ou renforcer le signal d'intégration du récepteur dans la cellule. Un ligand est en général une molécule de nature chimique, protéique, lipidique ou ionique exerçant des fonctions d'activateur, d'inhibiteur, ou de substrat. Un ligand forme un complexe caractérisé par une affinité particulière avec son récepteur. Les différents ligands de CD146 découverts à ce jour sont listés dans le tableau ci-après (Tableau 3).

	Molécule d'interaction	Type d'interaction	Fonction de l'interaction	Référence
	Wnt5a	Récepteur	Polarité et migration cellulaire	(319)
	Wnt1	Récepteur	Activation des fibroblastes	(346)
	VEGFR2	Co-récepteur	Angiogenèse	(347)
	VEGF-C	Récepteur	Développement lymphatique	(252)
	Netrine-1	Récepteur	Pro-angiogénique	(316)
	Galectine-1	Récepteur	Survie des cellules endothéliales/développement vasculaire	(315)
	Galectine-3	Récepteur	Prolifération des cellules cancéreuses et métastases	(241)
	Laminine-411	Récepteur	Migration lymphocytaire	(366)
	Laminine-421	Récepteur	Métastases	(367)
	S100A8/A9	Récepteur	Métastases	(368)
	PDGFR-β	Co-récepteur	Recrutement des péricytes/stabilisation des vaisseaux	(369)
	Matriptase	Récepteur	Différentiation cellules neurales	(370)
	FGF-4	Récepteur	Polarité cellulaire	(318)
	Protéine de type angiopoïétine-2	Récepteur	Adipogenèse/métabolisme lipidique	(263)
CD146s	Angiomotine	Ligand	Angiogenèse	(371)
	Integrine αvβ1	Ligand	Inflammation de la barrière-hémato-encéphalique	(349)
	Integrine αvβ3	Ligand	Angiogenèse et EMT	(310)

Tableau 3: Tableau récapitulatif des ligands de CD146 membranaire et de CD146 soluble ainsi que leurs fonctions en physiologie ou en pathologie.

CD146 interagit avec deux ligands de la voie **Wnt** pour réguler la migration et la prolifération cellulaire : le ligand **Wnt1** activateur de la voie Wnt canonique β-caténine dépendante (346), et le ligand **Wnt5a** activateur de la voie Wnt non canonique (319). Les premiers travaux sur le lien entre Wnt5a et CD146 décrivent l'importance de l'activation de la voie non-canonique pour contrôler l'extension convergente pendant l'embryogenèse du poisson zèbre (319). L'inhibition de CD146 ou Dvl2 bloque la voie Wnt non canonique médiée par Wnt5a et inhibe la dégradation de la β-caténine activant ainsi la voie canonique. Dans l'obésité et le diabète, l'expression de Wnt5a et l'expression de CD146 sont augmentées dans les tubules rénaux par rapport à des témoins sains. Cette altération est corrélée avec le processus inflammatoire et la progression de l'insuffisance rénale contribuant à l'inflammation tubulaire rénale dans la néphropathie diabétique (372). La liaison entre CD146 et Wnt5a déclenche l'activation de la protéine Disheveled (Dvl) qui va, d'une part, recruter les protéines ROCK et Rac pour activer le cytosquelette et permettre l'asymétrie cellulaire et, d'autre part, phosphoryler la MAP kinase JNK (c-Jun N-terminale kinase). La protéine phospho-JNK active ensuite le facteur de transcription c-Jun, un constituant majeur du complexe AP-1 (Activator Protein-1) (319). En outre, le ligand Wnt5a redistribue CD146 au sein d'une structure polarisée appelée W-RAMP (Polarité du récepteur-actine-myosine induite par Wnt5a), jouant un rôle dans la rétraction membranaire et l'orientation de la migration cellulaire impliquant RhoA (329). L'inhibition de CD146 va aussi diminuer l'activation de la voie non canonique de Wnt et favoriser la voie canonique. La diminution de l'expression de CD146 par des SiRNA dans des cellules du cancer du côlon induit un état de cellule souche, une augmentation de la prolifération cellulaire et la résistance aux chimiothérapies. Cette diminution de CD146 inhibe l'expression de GSK-3β initiée par NF-κB/p65, favorisant l'augmentation cytoplasmique de la β-caténine puis, après activation par le ligand Wnt3a, la translocation nucléaire et l'activation de l'activité facteur transcription de la β-caténine (373).

Le VEGF est une protéine dont l'activité permet le développement et la croissance de vaisseaux sanguins pour les isoformes VEGF-A, VEGF-B et facteur de croissance placentaire ou lymphatiques pour les VEGF-C et VEGF-D. Les récepteurs du VEGF-A, les VEGFR-1 et VEGFR-2, possèdent une activité tyrosine kinase qui active la migration et la prolifération des cellules endothéliales vasculaires respectivement. Le VEGFR-3 favorise la migration et la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques. Des expériences de co-immunoprécipitation sur des cellules endothéliales ont démontré une liaison directe entre **CD146 et VEGFR-2**. Cette interaction est essentielle pour la transmission du signal induit par le VEGF-A (347). L'isoforme

courte de CD146 se lie également à VEGFR-1 dans les radeaux lipidiques qui sont des domaines de la membrane cellulaire enrichis en cholestérol et sphingolipides impliqués dans la transduction de signaux cellulaires. Ces résultats ont été mis en évidence dans un modèle murin déficient en CD146, où l'absence de CD146 inhibe la formation de vaisseaux induite par le VEGF (371). Il existe dans ce cas une diminution de la phosphorylation de VEGFR-2 et FAK. En effet, il a été montré que l'activation de CD146 par un anticorps anti-CD146 (Sendo-1) induit la phosphorylation de $p125^{FAK}$ et de la paxilline, ainsi que le recrutement de $p59^{fyn}$. La protéine $p59^{fyn}$, après activation, induit la phosphorylation de la PLCγ. La libération de calcium intracellulaire et l'entrée de calcium extracellulaire entraînent le recrutement de PYK2 et de $p130^{cas}$. En outre, $p59^{fyn}$ active $p125^{FAK}$, déclenche ainsi une signalisation cellulaire qui réorganise le cytosquelette d'actine et favorise la transcription de facteurs impliqués dans la survie et la migration cellulaire (374). D'autres anticorps dirigés contre CD146 ont montré une capacité à inhiber les voies liées au VEGF-R2 dans l'angiogenèse. L'anticorps monoclonal AA98 reconnait CD146 et diminue la phosphorylation de VEGFR2, AKT et des P38/MAPK induite par le VEGF-A et l'activation de NF-κB sur des cellules endotéliales (375). Un autre anticorps dirigé contre CD146 du clone P1H12 montre une relocalisation NF-κB vers le noyau en sollicitant la sous-unité p50 de NF-κB et non la sous unité p65 (309). En tant que **récepteur au VEGF-C**, CD146 participe aussi avec VEGFR-3 à la régulation de la lymphangiogenèse, en particulier lors de l'étape de bourgeonnement des vaisseaux lymphatiques. Le premier régule le bourgeonnement lymphatique alors que le second régule la prolifération et la migration des cellules endothéliales lymphatiques (252). L'action sélective de CD146 par le VEGF-C va phosphoryler les kinases P38 et ERK pour réguler la germination lymphatique. L'activation de ces kinases est moins importante sur des cellules déficientes en CD146 ou lorsqu'il manque le quatrième domaine membranaire de CD146. Chez le poisson zèbre, l'absence de CD146 ou de netrine-1 implique des défauts de formations vasculaires. En effet, la perturbation de l'interaction **netrine-1-CD146** par un anticorps anti-CD146 spécifique sur des cellules endothéliales murines bloque la prolifération, la migration et la formation de tubes des cellules endothéliales expliquant ces défauts vasculaires (316).

Les lectines sont des protéines se liant de manière réversible à certains glucides. Au sein de celles-ci, les galectines se lient spécifiquement à des sucres contenant des β-galactosides. Il existe 15 galectines chez les mammifères et 11 d'entre elles peuvent être retrouvées chez l'homme. Il existe 2 galectines qui peuvent s'associer avec CD146 **: la galectine-1 et la galectine-3**. La galectine-1 se lie aux groupements glycosylés extracellulaires de CD146. Des

tests fonctionnels ont montré que cette interaction de la galectine-1 avec les groupements N-glycanes de CD146 inhibe l'apoptose des cellules endothéliales *in vitro* (315). D'autres tests ont montré que parmi les molécules glycosylées de cellules endothéliales, la galectine-3 colocalise uniquement avec CD146. Cette liaison de la galectine-3 avec CD146 favorise sa dimérisation et active les voies de signalisation dépendantes de AKT (241).

Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques de la matrice extracellulaire de grande taille interagissant avec les récepteurs ancrés dans la membrane basale des cellules adjacentes (376). Elles sont constituées de trois chaînes polypeptidiques α, β et γ chacune existant sous la forme de plusieurs sous-types : 5 types de chaînes α, 3 chaînes β et 3 chaînes γ différentes. Chaque laminine possède ses propres fonctions physiologiques. CD146 interagit avec les **laminines**, des protéines hétérodimériques de la matrice extracellulaire comprenant différentes sous-unité αβγ. Le KO conditionnel chez la souris de la laminine α4β1γ1 (aussi appelée **laminine 411**) réduit la migration des lymphocytes Th17CD146 positifs vers le système nerveux central de la même manière que l'utilisation d'un anticorps ciblant spécifiquement CD146 (366). En effet, la liaison de CD146 avec la laminine 411 permet aux lymphocytes TCD146 positifs de migrer vers le système nerveux central. Les plexus choroïdes seraient la porte d'entrée du système nerveux central (377). Dans le cas des cellules tumorales, il a été mis en avant l'importance de la **laminine 421** dans la migration des cellules tumorales de mélanomes, gliomes et autres tumeurs. En effet, dans les tissus tumoraux coexprimant CD146 et les laminines 411 et 421, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD146 a inhibé la migration des cellules tumorales par liaison avec la laminine 421, mais pas les laminines 411 et 521 (367).

Les protéines S100 sont une famille de protéines, se liant au calcium comportant une vingtaine de membres existant uniquement chez les vertébrés, impliquées dans la régulation de la phosphorylation des protéines, de certaines activités enzymatiques, de la dynamique des composants du cytosquelette, des facteurs de transcription, de l'homéostasie du Ca(2+), ainsi que de la prolifération et de la différenciation cellulaires (378). La plupart des membres de la famille S100 existent sous la forme d'homodimères (dans certains cas, d'hétérodimères) à structure antiparallèle. Les protéines S100A8 et S100A9 sont particulièrement exprimées et sécrétées par les kératinocytes, les cellules myéloïdes et les neutrophiles dans des conditions inflammatoires *in vitro* et *in vivo* (379). Ruma et al. ont révélé que **S100A8/A9** utilise CD146 comme récepteur au cours des métastases pulmonaires du mélanome pour augmenter l'adhésion, la croissance et l'invasion cellulaire. Le mécanisme à l'origine de ces fonctions

cellulaires provient d'une part de la **production de ROS** et l'activation du facteur de transcription NF-κB (368), et d'autre part de la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP-25 induites par la voie des MAPK38/ETV4.

Sur les péricytes, CD146 est un **co-récepteur du PDGFR-β** après activation induite par le PDGF-β. L'inhibition de CD146 sur les péricytes ou les cellules endothéliales du système nerveux central entraine une rupture de la barrière hémato-encéphalique. Cette étape initie l'invasion des cellules endothéliales vers le SNC et le recrutement de péricytes dans les vaisseaux naissants au cours de l'embryogenèse. L'activation et la phosphorylation du PDGFR-β et des voies AKT/JNK/ERK/p38 en aval nécessitent la dimérisation de CD146. En effet, la transfection d'un CD146 muté entrainant une absence de dimérisation, entraine un arrêt du recrutement des péricytes, initié par le PDGF-β (369).

Au cours de la neurogenèse, la **matriptase**, une sérine protéase exprimée sur la cellules progénitrice neurale (NS/P), joue un rôle essentiel dans la signalisation de contact cellulaire entre la NS/P et les cellules endothéliales cérébrales (380). Une analyse de co-immunoprécipitation et par spectrométrie de masse a identifié CD146 comme **ligand** de la **matriptase**. La présence de cette intéraction inactive la protéine de la voie Wnt GSK-β, augmente l'activité de la voie Wnt canonique jouant un rôle sur la régulation de la différenciation et la migration des cellules de la niche (370).

Au cours de la morphogenèse du poisson zèbre, le **FGF4 se lie à CD146** et non au FGFR pour organiser la polarité apicale-basale et la ciliogenèse. L'affinité de FGF4 pour CD146 est même supérieure à celle pour le FGFR et permet l'activation des protéines kinases JNK et ERK ainsi que les facteurs de transcription AP-1 et NFAT (318).

CD146 est un ligand de la **protéine de type angiopoïétine 2**, qui est supposé agir sur les cellules endothéliales pour activer l'inflammation du tissu adipeux, et activer la protéine de liaison à l'élément de réponse au cAMP (CREB) pour induire la différenciation des pré-adipocyte en adipocytes et, chez les adipocytes, augmenter l'accumulation des lipides intracellulaires (263).

CD146 soluble possède des récepteurs qui lui sont propres. Grâce à la spectrométrie de masse, il a été identifié comme premier ligand l'angiomotine p80, une protéine impliquée dans la migration cellulaire, le maintien des jonctions adhérentes et l'angiogenèse (371). L'action de CD146s sur l'angiomotine des cellules endothéliales stimule l'angiogenèse et la formation de pseudo-capillaires en matrigel en augmentant l'activation de VEGFR-1 et VEGFR-2.

Sur les progéniteurs endothéliaux, un complexe protéique incluant CD146 membranaire, CD146s, VEGFR-1 VEGFR-2, l'angiomotine et la préséniline-1, se regroupe dans des radeaux lipidiques. La liaison de CD146s à l'angiomotine induit le clivage extracellulaire de l'isoforme courte de CD146 par des métalloprotéases, suivi d'un clivage intracellulaire dépendant de la préséniline-1 (PS-1). Le fragment intracellulaire migre vers le noyau et interagit avec CSL pour induire la transcription de gènes pro-angiogéniques et conduire à la régénération de la forme courte à la membrane, régulant également des gènes de survie. Sur les cellules cancéreuses, la CD146s active la protéine oncogène c-myc, participant ainsi à la prolifération, la survie et la migration de ces cellules. Cette activation, indépendante du VEGF, est médiée par la phosphorylation d'ERK (371).

Récemment, il a été rapporté que les intégrines αvβ1 et αvβ3 interagissaient avec CD146s. Ces liaisons semblent être importantes dans la régulation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE)(310) et la prolifération des cellules de glioblastome (349). Il est aussi rapporté que l'association de CD146s avec son récepteur αvβ1 au niveau des cellules endothéliales active certaines voies des MAP kinases P38, Erk, JNK et Akt pour ensuite activer p65/NF-κB (310) et induire une inflammation puis l'apoptose des cellules endothéliales.

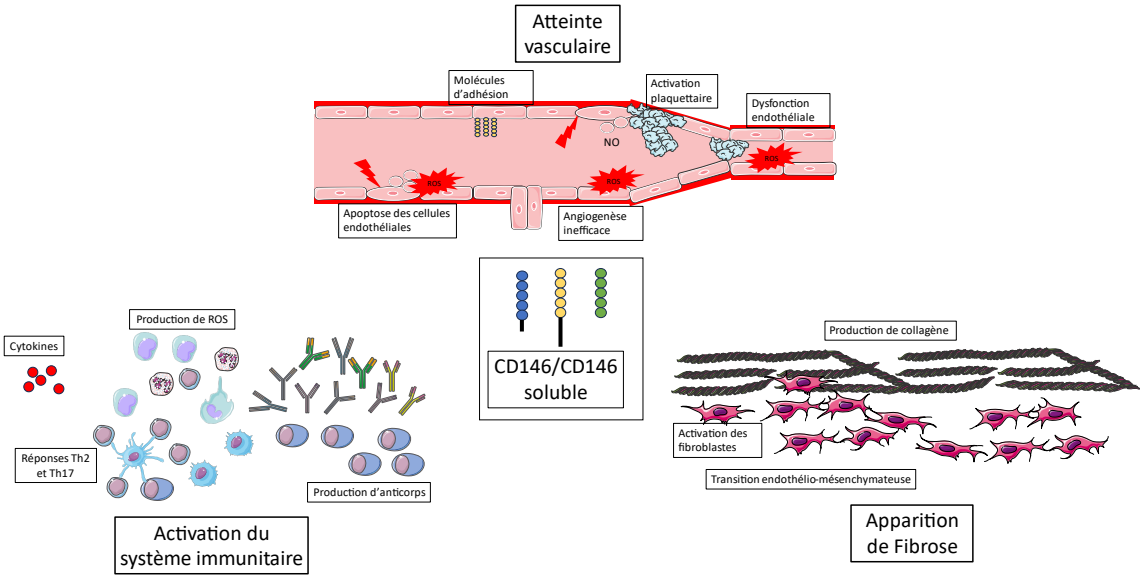


Figure 25 : CD146 et CD146s : une molécule au carrefour des atteintes de la sclérodermie systémique.

Résultats

17 Partie I : Identification de CD146/CD146 soluble comme acteur de la sclérodermie systémique

En raison de son rôle dans l'intégrité endothéliale, l'angiogenèse et la réponse inflammatoire, des processus dérégulés dans la SSc, nous avons émis l'hypothèse que le CD146/sCD146 pourrait représenter un nouvel acteur moléculaire impliqué dans la pathogenèse de la SSc. À ce jour, ce travail est le premier à montrer que CD146 est un acteur moléculaire important dans la fibrose de la SSc. Il a nécessité d'établir de nouveaux modèles au laboratoire tels que la SSc induite par la bléomycine pour étudier *in vivo* CD146 dans la fibrose et l'extraction de MEFs pour obtenir un modèle *in vitro* de fibrose en présence ou absence de CD146. Nous avons également dû développer les outils pour l'étude de la voie Wnt. Ainsi dans cette première partie de mon travail de thèse, deux études ont été conduites pour répondre à cette hypothèse :

1/ Kaspi E, **Heim X**, Granel B, Guillet B, Stalin J, Nollet M, Bertaud-Foucault A, Robaglia-Schlupp A, Roll P, Cau P, Leroyer A, Bachelier R, Benyamine A, Dignat-George F, Blot-Chabaud M, Bardin N. **Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis**. J AlClin Immunol. 2017 Nov;140(5):1448-1451.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.046. Epub 2017 Jun 9.

2/ Gabsi A, **Heim X**, Dlala A, Gati A, Sakhri H, Abidi A, Amri S, Neili B, Leroyer AS, Bertaud A, Smiti Khanfir M, Said F, Houman MH, Granel B, Blot-Chabaud M, Bardin N, Marrakchi R. **TH17 cells expressing CD146 are significantly increased in patients with Systemic sclerosis**. Sci Rep. 2019 Nov 27;9(1):17721. doi: 10.1038/s41598-019-54132-y.

De plus j'ai réalisé un article de revue intitulé : « **CD146/sCD146 in the Pathogenesis and Monitoring of Angiogenic and Inflammatory Diseases** » décrivant l'intérêt d'étudier CD146 et doser CD146s dans les pathologies auto-immunes et inflammatoires (cf annexe1)

Dans la première étude, nous avons développé un modèle de SSc conçu pour simuler les conditions de fibrose cutanée caractéristiques de la sclérodermie. Nous avons choisi un modèle murin reposant sur l'administration de bléomycine par injections intradermiques, reconnu pour induire une fibrose localisée. L'avantage majeur du modèle à la bléomycine réside dans sa capacité à localiser précisément la fibrose à l'emplacement souhaité et ne nécessite pas le recours à des croisements génétiques complexes, comme c'est le cas pour d'autres modèles tels que le Tsk-1. Cette méthode nous a également permis de moduler l'intensité de la réponse pro-fibrosante en ajustant les doses de bléomycine administrées.

Dans ce modèle, nous avons étudié le rôle de CD146 en comparant deux groupes de souris : un groupe de souris déficientes en CD146 (KOCD146) et un groupe de souris de phénotype sauvage exprimant CD146 (WT), ces dernières servant de groupe contrôle. Ce modèle nous a permis de comprendre quel était l'implication de CD146 dans le développement de la SSc. Nos résultats ont montré que de faibles doses de bléomycines induisent une fibrose cutanée chez les souris KOCD146 mais pas chez les WT. Cet effet est bien dépendant de CD146 puisque l'injection de CD146s empêche le développement de la fibrose chez les souris KOCD146. Dans cette étude nous avons également analysé la pertinence de notre hypothèse chez l'homme. Pour cela, nous avons dosé le CD146s chez des patients atteints de SSc par rapport à des témoins sains. Les taux de CD146s étaient significativement plus élevés chez les patients atteints de SSc que chez les témoins sains. En ce qui concerne l'association clinique, nous avons trouvé une association significative entre les faibles taux de sCD146 et deux complications graves de la maladie : la gangrène digitale et la fibrose pulmonaire. Nous avons aussi montré, sur un suivi d'un an, une association significative entre la diminution des niveaux de sCD146 et l'aggravation de la maladie.

Enfin, comme la voie Wnt est impliquée dans la fibrose de la SSc (203,205) et que CD146 interagit avec le ligand Wnt5a (319), nous avons posé l'hypothèse que CD146 agit sur la fibrose dans la SSc via la voie Wnt. Pour y répondre j'ai mis au point et développé au sein du laboratoire les tests appropriés pour étudier l'activation de la voie Wnt. Ainsi nous avons importé les techniques d'étude de la voie Wnt de l'équipe du Professeur Borg du centre de recherche en cancérologie de Marseille (CRCM) et développé un modèle de fibrose *in vitro* par traitement des cellules à différentes doses de bléomycine à partir de MEFs WT et KOCD146.

Dans la deuxième étude, nous avons cherché à confirmer que CD146 est bien un acteur de la SSc. Comme la SSc est une maladie auto-immune, il était intéressant d'étudier l'implication de CD146 sur la réponse immunitaire dans la SSc. CD146 est exprimé à la surface des lymphocytes T et particulièrement à la surface des lymphocytes Th17 (273,275) puisqu'il participe à l'orientation des lymphocytes T en lymphocytes Th17 (269). Or ces cellules jouent un rôle dans la pathogenèse de plusieurs maladies auto-immunes, y compris la SSc (381). Ainsi dans cette deuxième étude, nous avons posé l'hypothèse que CD146 est impliqué dans l'orientation Th17 au cours de la SSc.

Pour cela, nous avons constitué une deuxième cohorte de patients avec SSc en collaboration avec le laboratoire de génétique, immunologie et pathologie humaine de la faculté des sciences de Tunis du professeur Triki-Marrakchi afin de : 1/ doser les taux de CD146 sérique et

confirmer les résultats de notre première étude sur une cohorte de réplication 2/ isoler des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) pour étudier le rôle de CD146s dans l'orientation lymphocytaire Th17 dans la SSc en comparaison à des témoins non SSc.
L'analyse de ces cellules a permis d'examiner l'implication de CD146 et CD146s dans l'orientation de la réponse Th17 au cours de la SSc et nous apporter des arguments supplémentaires sur l'intérêt d'étudier CD146 comme une cible thérapeutique dans la SSc.

En résumé dans cette première partie, nous avons montré le rôle de CD146 dans la fibrose cutanée et dans la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes Th17
Nous avons aussi identifié CD146 comme un acteur de la SSc. Nous avons également mis en évidence l'implication de la forme soluble comme inhibiteur de la fibrose cutanée *in vivo* et participant *in vitro* à l'orientation Th17. De plus, le dosage de CD146s peut être proposé comme un biomaqueur pertinent dans le suivi des patients SSc.

2. Georgalas C, Videler W, Freling N, Fokkens W. Global Osteitis Scoring Scale and chronic rhinosinusitis: a marker of revision surgery. Clin Otolaryngol 2010;35:455-61.
3. Perloff J, Gannon FB, Montone W, Orlandi K, Kennedy R. Bone involvement in sinusitis: an apparent pathway for the spread of disease. Laryngoscope 2000;110:2095-9.
4. Snidvongs K, McLachlan R, Chin D, Pratt E, Sacks R, Earls P, et al. Osteitic bone: a surrogate marker of eosinophilia in chronic rhinosinusitis. Rhinology 2012;50:299-305.
5. Tuszynska A, Krzeski A, Postula M, Wyczalkowska-Tomasik A, Gornicka B, Pykalo R. Inflammatory cytokines gene expression in bone tissue from patients with chronic rhinosinusitis—a preliminary study. Rhinology 2010;48:415-9.
6. Kahai S, Vary C, Gao Y, Seth A. Collagen, type V, alpha1 (COL5A1) is regulated by TBF-beta in osteoblasts. Matrix Biol 2004;23:445-55.
7. Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen Q, et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. J Immunol 1996;156:758-64.
8. Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, et al. Inhibition of hormones and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and boe resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegrin and decreased RANKL and RANK in a STAT-6 dependent pathway. J Biol Chem 2006;281:2414-29.
9. Lam K, Kern RC, Luong A. Is there a future for biologics in the management of chronic rhinosinusitis? Int Forum Allergy Rhinol 2016;6:935-42.

Available online June 7, 2017.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.021

Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis



To the Editor:

Systemic sclerosis (SSc) is a fibrosing autoimmune disorder characterized by vascular damage, excessive fibrosis in the skin and internal organs, and immune dysfunction.[1] Pulmonary fibrosis and pulmonary arterial hypertension are the most serious complications and currently constitute the major causes of death. The identification of biomarkers for the presence and progression of clinical complications in SSc would help to clarify pathogenic mechanisms, assess disease activity, and offer new hopes for treatment. CD146, an adhesion molecule located essentially in the vascular system, is also present as a soluble form (sCD146) in the bloodstream.[2] Because of its role in endothelial integrity, angiogenesis, and inflammatory response,[3] processes modulated in SSc, we hypothesized that CD146/sCD146 could represent a new molecular actor involved in SSc pathogenesis.

Sera from 50 patients with SSc admitted to internal medicine departments in Marseille were analyzed (see Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). All patients fulfilled the 2013 ACR/EULAR Classification Criteria for Scleroderma[4] and were then subclassified according to LeRoy et al[5] criteria. All samples came from a declared Biobank (DC 2012-1704) with respect to ethical directives.

Soluble CD146 levels were significantly higher in patients with SSc than in healthy controls (867.1 ± 32.3 vs 497.7 ± 16.5; $P < .001$) (Fig 1, *A*). Regarding clinical association, we found a significant association between low sCD146 levels and digital gangrene (n = 5; $P = .03$) or pulmonary fibrosis (n = 20; $P = .04$), 2 severe manifestations of the disease, whereas no significant association was found between sCD146 levels and Raynaud phenomenon (n = 29), or digital scars/ulcers (n = 16) (Fig 1, *B* and *C*). Sera available 12 months later for 15 patients showed a significant association between the diminution of sCD146 levels and aggravation of the disease attested by digital necrosis, pulmonary arterial hypertension, and pericarditis (n = 15; $P = .03$) (Fig 1, *D*). To investigate whether sCD146 was active in the serum of patients, we examined its effect on endothelial cell proliferation. Results showed a significant correlation between seric CD146 levels and cell proliferation ($P = .02$) and a significant decrease in cell proliferation when sCD146 was immunodepleted ($P < .0001$) (see Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org), demonstrating that sCD146 is biologically active.

To further examine the impact of CD146, we used the bleomycin-induced skin fibrosis model in wild-type (WT) and CD146-deficient mice. At 1 μg of bleomycin *per* mouse, no modification was obtained in dermal thickness under bleomycin or control conditions in WT mice ($P = .64$; Fig 2, *A*, *B*, and *G*). In contrast in CD146 knockout (KO) mice, dermal thickness was significantly higher after bleomycin treatment than in control conditions ($P = .0002$; Fig 2, *C*, *D*, and *G*), showing that this concentration was sufficient to induce skin fibrosis in CD146KO mice but not in WT mice. In the same way, epidermal thickness was also increased after bleomycin treatment in comparison to control conditions in CD146KO mice ($P = .04$), whereas no effect of bleomycin treatment was observed in WT mice ($P = .63$; Fig 2, *H*). Altogether these results show a higher susceptibility of CD146KO mice to develop skin fibrosis after bleomycin injection. Interestingly, injection of sCD146 in bleomycin-treated CD146KO mice showed a significant reduction in dermal and epidermal thickness as compared with bleomycin condition ($P = .003$ and $P < .0001$, respectively; Fig 2, *E-H*), suggesting that sCD146 protects bleomycin-treated CD146KO mice from fibrosis development. Because the Wnt pathway is involved in SSc fibrogenesis[6] and because interaction between CD146 and Wnt5a[7] was recently described, we investigated the effects of CD146. Immunochemistry experiments showed that Wnt5a expression was downregulated in KO compared with WT mice (see Fig E3, *A*, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Results were confirmed on mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from WT and KO mice (Fig E3, *B*). In addition, Wnt5a induced Jnk phosphorylation in WT MEFs but not in KO MEFs (Fig E3, *C*), suggesting a downregulation of the noncanonical Wnt signaling in KO mice. In contrast, activation of canonical Wnt pathway with Wnt3a was evidenced in KO MEFs but not in WT MEFs (Fig E3, *D*) (see Table E1, Methods section, and Figs E1, E2, and E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Up to date, SSc-specific autoantibodies and cutaneous subclassification are the most useful biomarkers for diagnosis and predicting clinical features. If several biomarkers such as ICAM-1 or E-selectin were proposed with a potential prognostic interest,[8] none of them is used in clinical practice.

Our results highlighted the role of CD146/sCD146 in SSc because (1) sCD146 levels were increased in patients with SSc compared with controls, (2) severe manifestations of the disease, digital gangrene and pulmonary fibrosis, were associated with low sCD146 levels in patients with SSc, (3) mice lacking CD146 were highly susceptible to develop skin

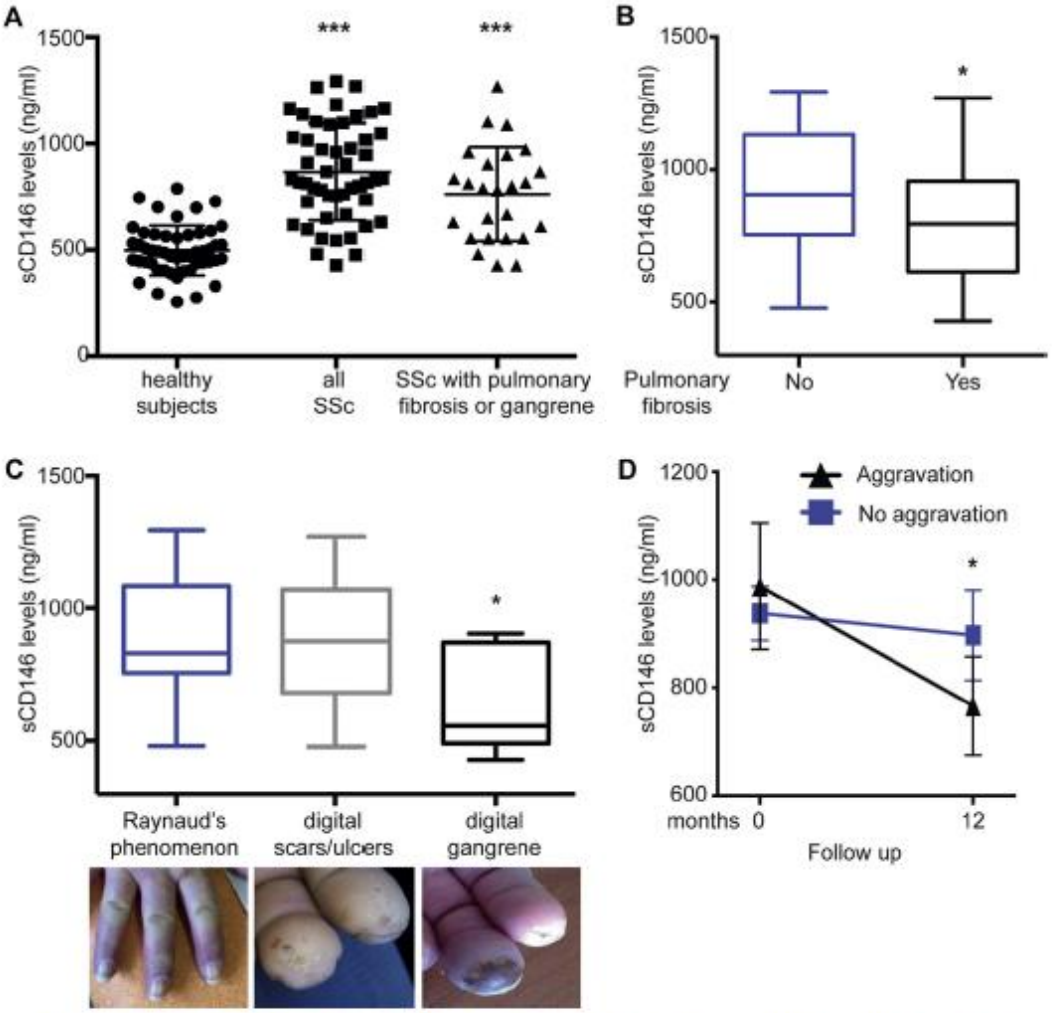


FIG 1. A high and sustained soluble CD146 level in patients with SSc is associated with a favorable evolution of the disease. **A,** sCD146 levels significantly higher in all patients with SSc and in patients with SSc with pulmonary fibrosis or gangrene than in controls ($P < .001$). **B,** Significant association between pulmonary fibrosis and low sCD146 levels ($P = .04$). **C,** Significant association between digital gangrene and low sCD146 levels ($P = .03$). **D,** Significant association between diminution of sCD146 levels and disease aggravation ($P = .03$). *$P < .05$ and ***$P < .001$.

fibrosis, (4) in this KO model, skin fibrosis development can be prevented by sCD146 injection, and (5) CD146/sCD146 is involved in the Wnt pathway.

Of interest, patients producing high and sustained levels of sCD146 may be protected against the disease complications. Up to now, sCD146 has been mainly described in human serum as an endothelial biomarker modulated in inflammatory diseases. In inflammatory bowel diseases, we found an association between sCD146 levels and disease activity.[9] Indeed, low level of sCD146 was associated with the active form of the disease and an upregulation of sCD146 occurred after anti-TNF treatment and a favorable disease evolution.[9] In the present study, unfavorable evolution of SSc was associated with a decrease in sCD146 levels. In addition, vascular ischemic complication (digital gangrene) and pulmonary fibrosis were associated with low sCD146 levels. Although a prospective study is necessary to confirm our conclusion, high sCD146 levels could constitute a good prognostic marker of the disease. Along this line, we showed that CD146KO mice were strongly sensitive to bleomycin-induced skin fibrosis as compared with WT mice. The proof that this effect is CD146-dependent is given by the absence of fibrosis development after sCD146 injection in this animal model. Finally, we showed that CD146/CD146s modulates Wnt signaling. CD146 deficiency is associated with down- and upregulation of the noncanonical and the canonical Wnt pathway, respectively, leading to a profibrotic state.

In conclusion, our data led us to propose CD146/sCD146 as a novel biomarker in SSc for the assessment of the disease activity. Further studies will be conducted to confirm the role of CD146/sCD146 in the fibrotic process, to get more insights into the Wnt pathway, and to investigate the potential interest of the molecule for therapeutic applications.

We thank Joëlle Fiteni, Nathalie Boitano, and Corinne Derrien for their help and continuous support.

Elise Kaspi, PharmD, PhD[a,b]
Xavier Heim[c]
Brigitte Granel, MD, PhD[c,d]

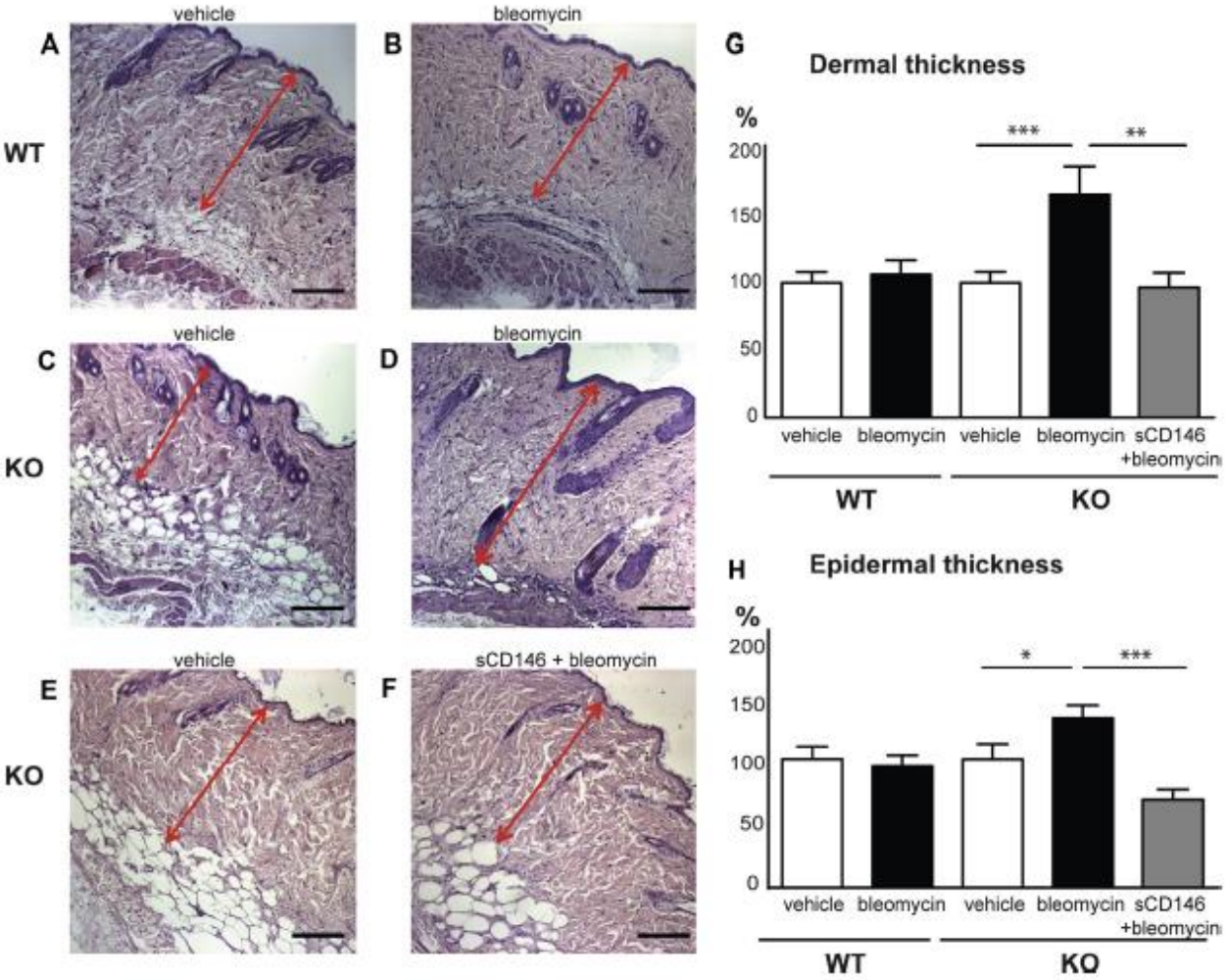


FIG 2. Mice lacking CD146 are highly susceptible to develop skin fibrosis and soluble CD146 injection prevents bleomycin-induced skin fibrosis in CD146 KO mice. **A-F,** WT (Fig 2, *A* and *B*) and CD146 KO mice (Fig 2, *C-F*) injected with vehicle (Fig 2, *A*, *C*, and *E*), bleomycin (Fig 2, *B* and *D*), or bleomycin with sCD146 (Fig 2, *F*). *Arrows* illustrate dermal thickness. Scale bar: 100 μm. **G** and **H,** Significant increase in dermal (Fig 2, *G*) and epidermal thickness (Fig 2, *H*) after bleomycin injection in CD146 KO mice prevented by sCD146 injection. $*P < .05$, $**P < .01$, and $***P < .001$.

Benjamin Guillet, PharmD, PhD[c,e,f]
Jimmy Stalin, PhD[f]
Marie Nollet[c]
Alexandrine Bertaud-Foucault, PhD[f]
Andrée Robaglia-Schlupp, MD[a,b]
Patrice Roll, MD, PhD[a,b]
Pierre Cau, MD, PhD[a]
Aurélie Leroyer, PhD[f]
Richard Bachelier, PhD[f]
Audrey Benyamine, MD, PhD[d]
Françoise Dignat-George, PharmD, PhD[c,g]
Marcel Blot-Chabaud, PhD[f]
Nathalie Bardin, PharmD, PhD[c,g]

From [a]Aix Marseille Univ, INSERM, GMGF, Marseille, France; [b]APHM, Hôpital la Timone, Service de Biologie Cellulaire, Marseille, France; [c]Aix Marseille Univ, INSERM, VRCM, Marseille, France; [d]APHM, Hôpital Nord, Médecine Interne, Marseille, France; [e]APHM, Hôpital Nord, Service de Radio-Pharmacie, [f]Aix Marseille Univ, CERIMED, Marseille, France; and [g]APHM, Hôpital La Conception, Laboratoire d'Hématologie, Marseille, France. E-mail: nathalie.bardin@ap-hm.fr.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

REFERENCES

1. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. N Engl J Med 2009;360:1989-2003.
2. Bardin N, Moal V, Anfosso F, Daniel L, Brunet P, Sampol J, et al. Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. Thromb Haemost 2003;90:915-20.
3. Bardin N, Blot-Chabaud M, Despoix N, Kebir A, Harhouri K, Arsanto J-P, et al. CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29:746-53.
4. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum 2013;65:2737-47.
5. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. J Rheumatol 2001;28:1573-6.
6. Shi J, Chi S, Xue J, Yang J, Li F, Liu X. Emerging role and therapeutic implication of Wnt signaling pathways in autoimmune diseases. J Immunol Res 2016;2016:1-18.
7. Ye Z, Zhang C, Tu T, Sun M, Liu D, Lu D, et al. Wnt5a uses CD146 as a receptor to regulate cell motility and convergent extension. Nat Commun 2013;4:2803.
8. Van Bon L, Affandi AJ, Broen J, Christmann RB, Marijnissen RJ, Stawski L, et al. Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. N Engl J Med 2014;370:433-43.

9. Reumaux D, Bardin N, Colombel J-F, Dignat-George F, Duthilleul P, Vermeire S. Restoration of soluble CD146 in patients with Crohn's disease treated with the TNF-alpha antagonist infliximab. Inflamm Bowel Dis 2007;13:1315-7.

Available online June 9, 2017.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.046

Age-specific profiling of cutaneous allergy at high temporal resolution suggests age-related alterations in regulatory immune function

To the Editor:

Aging is associated with complex alterations in T-cell–mediated immune function. The overall incidence of delayed-type cutaneous hypersensitivity increases with age and this is paralleled by a higher prevalence of autoimmune disease. Conversely, there is an age-related decline in the ability to mount an effective immune response to viral infection and vaccination. Here, we report a comprehensive evaluation of the age dependency of sensitization for allergens in the baseline series in a single-center cohort of 45,110 patients undergoing patch testing over a 30-year period. This is the largest reported series to date permitting the evaluation of this phenomenon at a higher temporal resolution than previously described.

Patch test records of all patients undergoing testing with a modified European baseline series between 1985 and 2014 were retrieved from a computerized database at St John's Institute of Dermatology, Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust, London. Reactions were read on days 2 and 4 according to the Menne and White criteria. For each allergen, it was recorded whether the allergen was tested and whether the result was positive or negative. Reactions recorded as +/++/+++ were regarded as positive. Questionable or irritant reactions were regarded as negative. Statistical analysis and visualization was undertaken with the R language for statistical computing (see this article's Methods section in the Online Repository at www.jacionline.org).

In our center, the age distribution of patients presenting for patch testing increases until the early 20s and then decreases thereafter; this pattern is broadly consistent across 3 decades of testing (Fig 1, *A*). The overall prevalence of patients sensitized to at least 1 allergen increases throughout the lifespan; however, the rate of increase is most rapid before the age of 20 years, with peak incidence in individuals of age 40 to 60 years and a modest decline subsequent to this (Fig 1, *B*, red line). Patients reacting to 1 or 2 allergens (blue, green lines) exhibit an increase in prevalence until the age of 20 years followed by a plateau; in contrast, reactions to 3 or more allergens (purple, orange lines) show a steady increase throughout the lifespan.

We next wished to examine allergen-specific age sensitization profiles. We calculated unadjusted (see Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org) and adjusted (see Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org) age-specific prevalence for each of 37 allergens in the baseline series. Allergens were then hierarchically clustered according to the age-specific prevalence profile of positive reactions (Fig 1, *C*; see Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). The overall trend of an increase in the prevalence of positive reactions with age is apparent; however, it is clear that there are substantial differences between allergens. These differences are particularly apparent when groups identified by hierarchical clustering are visualized separately (Fig 1, *D-I*). For example, cobalt and nickel exhibit peak prevalence in the early 20s with subsequent decline (Fig 1, *D*), whereas quaternium 15 and formaldehyde exhibit peak incidence in the early 20s with plateau until early 60s and then subsequent decline (Fig 1, *E*). The peak incidence for allergens including fragrance mix 1 and p-Phenylenediamine is in the late 50s (Fig 1, *F*). In contrast, a group of allergens including thiuram mix, fragrance mix 2, and Primin exhibit a progressive increase throughout the lifespan (Fig 1, *I*). Importantly, these patterns are conserved when patients are stratified according to decade of testing, sex, and atopy status (see Fig E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

The ability to sensitize individuals to dinitrochlorobenzene declines concominant with age with the decline commencing as early as age 40 years.[1] In contrast, the overall prevalence of cutaneous allergy and the prevalence of sensitization to specific allergens including fragrance mix 1,[2] topical medicaments,[3] and methylisothiazolinone[4] is higher in older individuals. However, a full understanding of this phenomenon has been constrained by the limited temporal resolution of previous studies. Our analysis reveals 3 broad patterns of age-specific sensitization.

First, a cohort of allergens exhibits a peak prevalence of sensitization in early life with a progressive decline at older ages. Preeminent among these is nickel. This age dependence of nickel sensitization has been previously recognized and, in principle, could reflect age-specific alterations in exposure patterns, the delayed induction of tolerance, or immunosenescence. Interestingly, the age profile of cobalt sensitization closely parallels that of nickel. Because exposure patterns will differ, this suggests that a common biological mechanism operates in the sensitization to these metal ions and would be consistent with a role for age-related alterations in immune function "immunosenescence." The latter reflects a complex interplay of factors including the production of peripheral lymphocytes and thymic involution.

Second, the prevalence of sensitization to allergens such as fragrance mix 1 and 2, ethylenediamine, thiuram mix, paraben mix, primin, imidizalidinyl urea, and diazolidinyl urea increase progressively to the oldest ages. To determine whether this reflects a greater intrinsic risk of sensitization at older ages or simply the effects of cumulative exposure over the lifespan, we identified 940 patients who underwent patch testing to fragrance mix 1 on more than 1 occasion over this 30-year period (Fig 1, *J*). Of these, 41 had an initial negative patch test result with a subsequent positive test result implying *de novo* sensitization. To explore the factors governing sensitization in this context, we performed logistic regression with interval between testing and age of patient as predictor variables (Fig 1, *K* and *L*). There was no significant relationship to test interval ($P = .16$); however, there was a highly significant relationship with patient age ($P = .0001$), implying that older individuals have a higher intrinsic risk of sensitization. This conclusion is supported by the observation that a similar age profile can be observed for allergens newly introduced to the market.[5,6] We propose that this higher risk of sensitization may result from impaired efficiency of regulatory immune function in the elderly.

Finally, a large cohort of allergens including formaldehyde, quaternium 15, epoxy resin, potassium dichromate, and methylisothiazolinone/methylchloroisothiazolinone exhibit the highest prevalence of sensitization between the ages of 40 and 70 years

METHODS

Subjects

Sera from 50 patients with SSc admitted to internal medicine departments in Marseille (South of France) were analyzed. All patients fulfilled the 2013 ACR/EULAR Classification Criteria for Scleroderma[E1] and were then subclassified according to LeRoy et al[E2] criteria. For 15 patients, sera were available 12 months later. As controls, we studied the sera of 50 age- and sex-matched blood donors. All samples came from a declared Biobank (DC 2012-1704) with respect to ethical directives and were stored to −80°C before use.

Soluble CD146 determination

A capture ELISA (CY-QUANT ELISA) was used to determine the levels of sCD146 (Biocytex, Marseille, France), according to the manufacturer's protocol. Coefficients of variation of repeatability, reproducibility lot to lot, and reproducibility within batch were respectively 8.2%, 2.9%, and 3.5%.

In vitro tests

Bioactivity of seric sCD146 in patients with SSc was determined using cell proliferation experiments performed on endothelial progenitor cells (EPCs) previously incubated with sera of patients with SSc with high (>734 ng/mL; n = 24) or low (<734 ng/mL; n = 17) sCD146 levels, or with sCD146-immunodepleted samples (n = 21).

sCD146 serum immunodepletion. In 3 independent experiments, sCD146 was removed from the plasma (n = 21). First, sera containing high levels of sCD146 (>734 ng/mL) were incubated with S-Endo-1 antibody, and tubes were loaded on a test tube rotator and agitated overnight at +4°C. Then, the immune complex was covalently immobilized on protein-A Sepharose beads.

The unabsorbed fraction was recovered by centrifugation at 1500 rpm for 10 minutes, and was used in the following tests.

Isolation of circulating EPCs and cell culture. Human umbilical cord blood samples from donors were collected, in compliance with French legislation, in a heparinized tube. Mononuclear cells (MNCs) were isolated by density gradient centrifugation as previously described.[E3]

Cell proliferation assay. EPCs were seeded on 96-well plates (7.10^3/well) and starved in RPMI-10% FCS overnight. Cells were then incubated in EBM2 medium with 1% of serum for 24 hours. Cell proliferation was assayed by 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) incorporation into cellular DNA using the BrdU Labeling and Detection Kit III (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). In brief, cells were incubated for 15 hours with BrdU labeling solution in EBM-2 medium. Cellular DNA was partially digested by nuclease treatment and incorporated BrdU was detected with a peroxidase-conjugated anti-BrdU primary antibody. The absorbance was measured at 450 nm using an Opsys MR microplate reader (Dynex Technologies, Chantilly, Va). Results were expressed as arbitrary units.

Animal models of SSc

CD146 KO mice[E4] aged between 11 and 18 weeks were treated with subcutaneous bleomycin and were compared with littermates of the same age and sex WT mice.

Skin fibrosis was induced, according to protocol modified from Ould-Ali et al[E5] by local subcutaneous injections of 100 μL of bleomycin dissolved in 0.9% NaCl, at a concentration of 10 μg/mL,[E6] every other day for 28 days. sCD146, dissolved in PBS, was also injected at a concentration of 100 μg/mL, every other day, jointly with bleomycin. Bleomycin with or without sCD146 was injected in defined areas on the right upper back of CD146 KO (10 and 3 mice, respectively) and WT (11 and 3 mice, respectively) mice. Vehicle (NaCl ± PBS) was injected in defined areas on the left upper back of CD146 KO and WT mice and was used as controls for the bleomycin ± sCD146 experiment, respectively.

After approval of the protocol by the institution's Animal Care and Use Committee, the experiments were performed in an authorized laboratory and under the supervision of an authorized researcher (GUILLET 13-328).

Histological analysis

Murine skin sections were fixed in 4% formalin and embedded into paraffin. Several 7-μm sections were stained with hematoxylin-eosin stain.

Dermal and epidermal thickness was quantitatively evaluated using a stereological method, using a Merz grid[E7,E8] (Fig E2). The grid is composed of a wavy array of lines (108 tests points, 40-mm spacing, total length of test lines, 6785.8 mm).[E7]

Pictures of murine skin sections were taken, using Leica microscope (magnification ×10) and the grid was surimposed on each picture. The volume density of derm or epiderm was estimated by counting the points of the Merz grid located on the derm or epiderm. The surface area was estimated by counting the number of intersections of the sinous line with the border of each tissue. The dermal and epidermal thickness was thus quantitatively calculated using the volume density/surface area ratio.

Impact of bleomycin (1 μg/mouse) and/or sCD146 injection (10 μg/mouse) on dermal and epidermal thickness was evaluated after normalization with corresponding control condition (vehicle).

Skin biopsy immunostaining

Immunohistochemistry was performed with avidin–biotin-peroxidase complex, using the Wnt5a antibody (anti-Wnt5a from Santa-Cruz (Dallas, Tex) [sc365370] diluted 1/200) on skin biopsy from WT and KO mice after vehicle (NaCl ± PBS) injection. A semiquantitative evaluation of Wnt5a expression was performed using a 4-point scale: − indicates absence; +, low expression; ++, intermediate expression; and +++, high expression. A blind reading of the staining was performed.

Cell isolation and culture

MEFs were isolated from day-13.5 embryos from CD146 KO mice or WT mice. MEF isolation has been previously described.[E9] Briefly, the placental membranes, amniotic sac, head, and primordial blood organs were removed and the remaining carcass was rinsed with PBS and minced in 2 mL PBS. The tissue fragments were passed through a 18-G needle and a 100-mm strainer to remove large fragments, and placed in a 25-cm^2 flask containing Dulbecco modified Eagle medium (GIBCO, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France), 10% (v/v) FBS (GIBCO), 50 units/mL penicillin, and 50 mg/mL streptomycin. At this and subsequent stages of culture, cells were maintained in 5% oxygen. At confluency, the cells were transferred to a 75-cm^2 flask.

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described.[E10] Membranes were probed with specific primary antibodies (anti-Wnt5a [sc-365370] diluted 1/200 [Santa-Cruz], anti-SAPK/JNK [#9252] diluted 1/1000, and anti-phospho-SAPK/JNK [#9251] diluted 1/1000 [Cell Signalling Technology, Leiden, The Netherlands]) followed by secondary antibodies coupled to peroxidase. Blots were revealed with the ECL substrate (Pierce, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France).

Luciferase assay

Canonical Wnt signaling was monitored by analysis of β-catenin/TCF transcription activity, as determined by luciferase reporter assay.

Briefly, MEFs from WT and CD146 KO mice were seeded in 96-well tissue culture dishes at an initial density of 10^4 cells/well. After 18 to 24 hours, cells were transiently transfected with the Super8XTOPFlash reporter and pBARLS lentiviral reporter expression system containing 12 tandem repeats of TCF-binding sites,[E11] using Fugene 6 (cat. no. E2691, Promega, Madison, Wis) and according to the manufacturing protocol. Forty-eight hours after transfection, cells were switched to serum-free medium for 6 hours, and then treated using Wnt3a-conditioned medium or control medium (control condition). Cell lysates were prepared with reporter lysis buffer from the Luciferase Assay System kit (cat. no. E1910, Promega)

according to the protocol. Luciferase activity was normalized for transfection efficiency using Renilla luciferase values. The assay was done in quadruplicate. Results were then normalized in comparison to control condition (control medium).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the Prism software (GraphPad Software, Inc, San Diego, Calif). Significant differences were determined using parametric *t* test or nonparametric Mann Whitney test. A *P* value of less than .05 was considered significant.

REFERENCES

E1. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. J Rheumatol 2001;28:1573-6.

E2. Shi J, Chi S, Xue J, Yang J, Li F, Liu X. Emerging role and therapeutic implication of Wnt signaling pathways in autoimmune diseases. J Immunol Res 2016; 2016:1-18.

E3. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. Blood 2004;103: 2577-84.

E4. Jouve N, Bachelier R, Despoix N, Blin MG, Matinzadeh MK, Poitevin S, et al. CD146 mediates VEGF-induced melanoma cell extravasation through FAK activation. Int J Cancer 2015;137:50-60.

E5. Ould-Ali D, Hautier A, Andrac-Meyer L, Bardin N, Magalon G, Granel B. Bleomycin-induced scleroderma in nude mice can be reversed by injection of adipose tissue: evidence for a novel therapeutic intervention in systemic sclerosis. J Clin Exp Dermatol Res 2013; Available at: http://www.omicsonline.org/2155-9554/2155-9554-3-164.digital/2155-9554-3-164.html. doi: http://dx.doi.org/10.4172/2155-9554.1000164.

E6. Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. Exp Dermatol 2005;14:81-95.

E7. Massacrier A, Nègre-Aminou P, Couraud F, Cau P. Quantitative analysis of fetal rat brain neurons developing in primary cultures, I: stereological study of the neuronal differentiation. Brain Res 1988;468:161-70.

E8. Weibel ER. Stereological methods. Vol 1: Practical methods for biological morphometry. London: Academic;1979:415.

E9. J Xu. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. Curr Protoc Mol Biol 2005 Chapter 28:Unit 28.1.

E10. Harhouri K, Kebir A, Guillet B, Foucault-Bertaud A, Voytenko S, Piercecchi-Marti M-D, et al. Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia. Blood 2010;115:3843-51.

E11. Biechele TL, Moon RT. Assaying beta-catenin/TCF transcription with beta-catenin/TCF transcription-based reporter constructs. Methods Mol Biol 2008; 468:99-110.

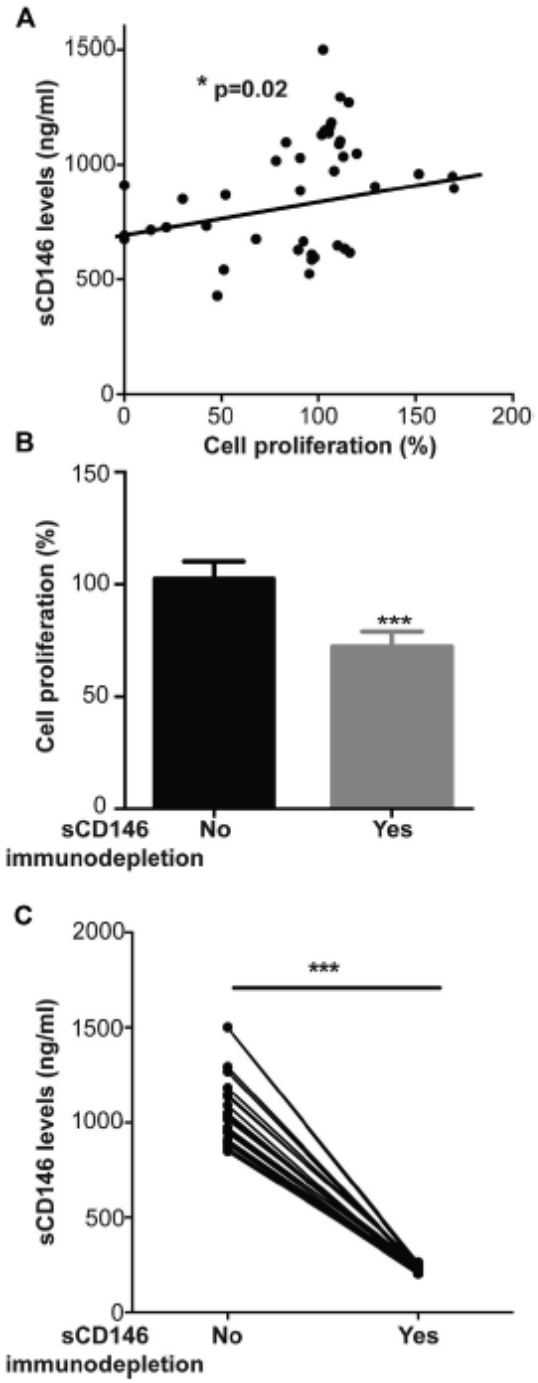


FIG E1. Demonstration of sCD146 bioactivity in serum of patients with SSc. **A,** sCD146 significantly correlated with proliferative index (n = 41; $P = .021$, Pearson test). **B,** Sera containing highest sCD146 levels were immunodepleted. Proliferation was significantly reduced after depletion (102.8% ± 8.7% vs 72.14% ± 6.9%; $P < .0001$, Wilcoxon test). **C,** Efficiency of immunodepletion was checked by ELISA determination of sCD146, showing a reduction of 80% in sCD146 levels (1029 ± 41.7 ng/mL vs 228.1 ± 4.4 ng/mL; n = 21; $P < .0001$, Wilcoxon test).

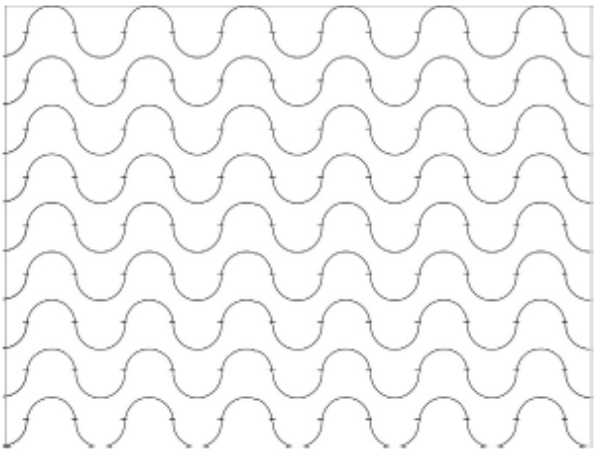


FIG E2. Merz grid. The grid consists of a square that delimits a test area containing a system of 108 points marked on a sinuous line formed by the succession of 9 chained semicircles. The thickness was thus calculated using the volume density/surface area ratio.

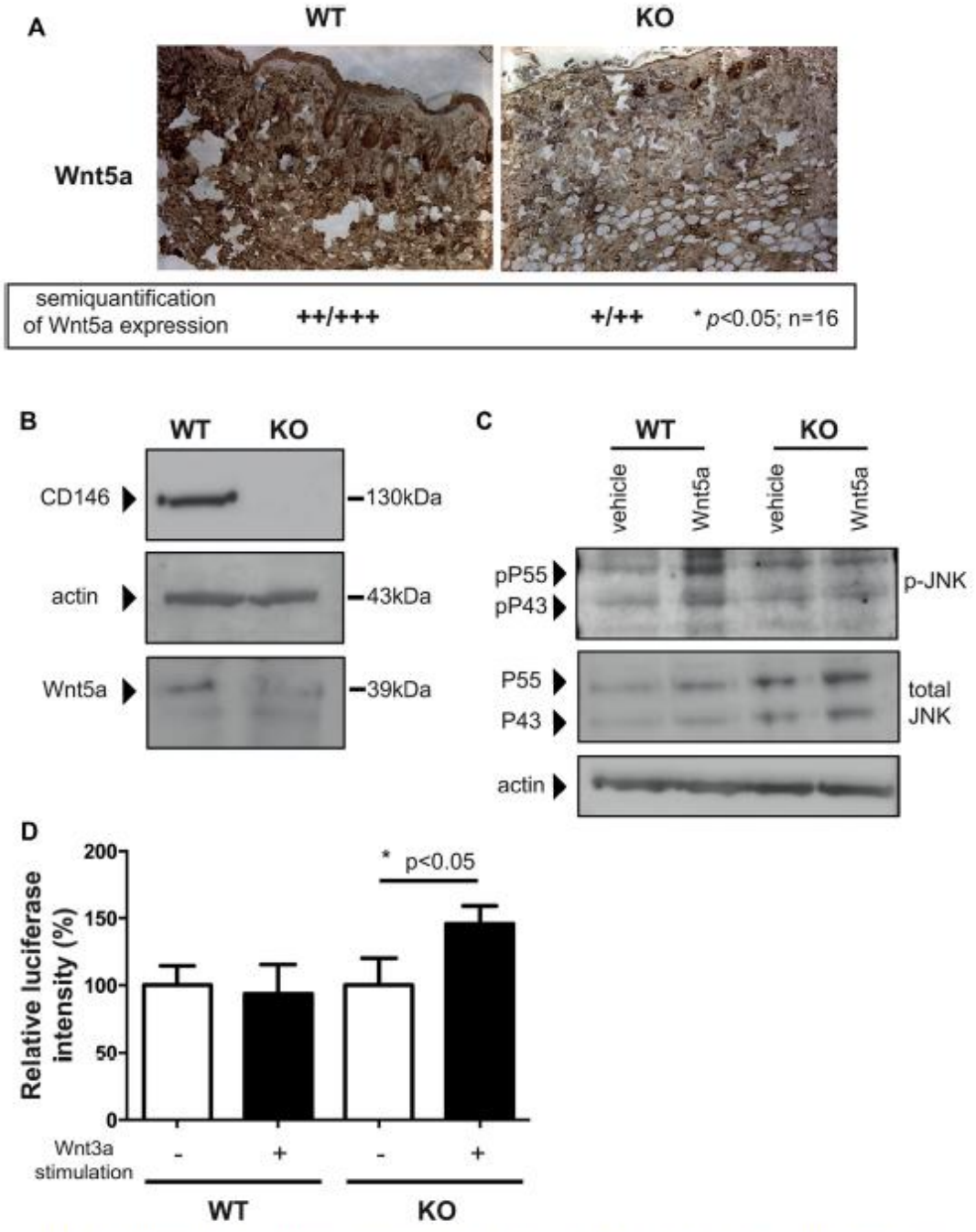


FIG E3. CD146/sCD146 modulates Wnt signaling. **A,** Semiquantification of Wnt5a expression was performed on 16 skin biopsies from WT or KO mice, showing a significant downregulation of Wnt5a expression in KO mice in comparison to WT mice ($P < .05$). **B,** Reduced Wnt5a expression on MEFs from KO mice compared with WT (Western blot experiments). **C,** Wnt5a induces Jnk phosphorylation in WT but not in KO mice (Western blot experiment). **D,** Activation of canonical Wnt signaling (β-catenin/TCF transcription activity; Luciferase assay) was observed in MEFs from KO mice after stimulation with Wnt3a-conditioned medium, but not in MEFs from WT mice. Results were normalized in comparison to control condition (control medium) ($P < .05$).

TABLE E1. Demographic data and disease characteristics of patients with SSc

Patients with SSc (n = 50)	(25%-75% percentile)
Median age (y)	62 (56-71)
Median disease duration (y)	13 (10-20)
Male/female	06/44
Clinical features	**n (%)**
Diffuse cutaneous form*	23 (46)
Ulcers, scars, gangrene	21 (42)
Pulmonary fibrosis†	20 (40)
Pulmonary arterial hypertension‡	7 (14)
Digestive involvement	39 (78)
Kidney involvement	5 (10)
Immunologic results	**n (%)**
Positive for antinuclear antibodies	50 (100)
Centromeric staining (ACA)	18 (36)
Homogeneous nucleoplasmic and nucleolar staining	15 (30)
Nucleolar staining	7 (14)
Homogeneous and speckled nucleoplasmic staining	8 (16)
Speckled nucleoplasmic staining	2 (4)
Positive for anti–topoisomerase I (anti–topo I)	25 (50)

ACA, Anticentromeric autoantibodies; *HRCT*, high-resolution computed tomography.
*According to the classification of LeRoy et al.[E1]
†Pulmonary fibrosis was defined on HRCT imaging (when available) and pulmonary function tests.
‡Pulmonary arterial hypertension was detected by echocardiography and confirmed by right heart catheterism if necessary.

SCIENTIFIC REPORTS
natureresearch

OPEN

TH17 cells expressing CD146 are significantly increased in patients with Systemic sclerosis

Amira Gabsi[1,2*], Xavier Heim[2,5], Akram Dlala[1], Asma Gati[1], Haifa Sakhri[1], Ahmed Abidi[1], Sonia Amri[1], Bilel Neili[1], Aurelie S. Leroyer[2], Alexandrine Bertaud[2], Monia Smiti Khanfir[3,4], Fatma Said[3,4], Mohamed Habib Houman[3,4], Brigitte Granel[6], Marcel Blot-Chabaud[2], Nathalie Bardin[2,5,7] & Raja Marrakchi[1,7]

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disorder characterized by vascular damage, excessive fibrosis and abnormal T cells immune-regulation. CD146 is an adhesion molecule essentially expressed in the vascular system, but also on TH17 lymphocytes. In view of the recently described role of CD146 in SSc, we hypothesized an involvement of CD146 positive TH17 cells in this disease. Compared to healthy controls, we showed that both soluble form of CD146 (sCD146), and IL17A levels were increased in patients with SSc with a positive correlation between both factors. A significant increase in TH17 cells attested by an increase of RORγT, IL17A mRNA and CD4+ IL17A+ cell was observed in patients with SSc. Interestingly, the percentage of TH17 cells expressing CD146 was higher in patients with SSc and inversely correlated with pulmonary fibrosis. *In vitro* experiments showed an augmentation of the percentage of TH17 cells expressing CD146 after cell treatment with sCD146, suggesting that, in patients the increase of this sub-population could be the consequence of the sCD146 increase in serum. In conclusion, TH17 cells expressing CD146 could represent a new component of the adaptive immune response, opening the way for the generation of new tools for the management of SSc.

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by excessive fibrosis in the skin and internal organs, vascular damage and immune dysfunction. Two major clinical subsets, namely limited cutaneous (lcSSc) and diffuse cutaneous (dcSSc) forms have been described according to the extent of skin fibrosis[1]. Pulmonary fibrosis and pulmonary arterial hypertension (PAH), are the most serious complications and constitute currently the major causes of death[2,3]. The study of new molecular targets is essential in the understanding of the physiopathology of the disease, and the establishment of new therapeutic strategies.

Among them, CD146 has been recently proposed as a new molecular target in SSc[4]. This cell adhesion molecule, also called MUC18 and MCAM, is a membrane glycoprotein belonging to the Immunoglobulin super family[5]. It is ubiquitously distributed on endothelium[6,7], with a preferential localization at the endothelial junction[7]. CD146 is involved in several functions such as cell adhesion[8], inflammation[9], and angiogenesis through different signaling pathways[8]. CD146 also exists as a soluble form (sCD146) in the blood, resulting from the proteolysis of the membrane form[9–11]. In a mice model of SSc induced by bleomycin, we showed that mice lacking CD146 were more susceptible to develop skin fibrosis than wild type animal. Fibrosis development could be prevented by subcutaneous sCD146 injection. We also evidenced the involvement of Wnt pathway since CD146 deficiency was associated with an up-regulation of the canonical Wnt pathway, leading to the profibrotic state[4].

The expression of CD146 is not restricted to the endothelium since it is also expressed on other cell types such as melanoma cells[12], extra villous trophoblastic cells[13] and TH17 cells[14]. TH17 cells are involved in the pathogenesis of several autoimmune diseases including SSc[15]. These cells play a critical role in the pathogenesis of autoimmune diseases, leading to production of several cytokines as IL17A, IL22, IL21 and IL26[14]. The retinoic acid receptor-related-orphan- receptor-gamma T (RORγT), is the key transcription factor required for TH17 cell

[1]Université de Tunis El Manar, Faculté des Sciences de Tunis, LR05SE05, 2092, Tunis, Tunisia. [2]Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, C2VN, Marseille, France. [3]Internal medicine service, University hospital center LA RABTA, 1007, Tunis, Tunisia. [4]Université de Tunis El Manar, Faculté de Medicine de Tunis, 1007, Tunis, Tunisia. [5]Service d'Immunologie, Pôle de Biologie, Hôpital de la Conception, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France. [6]Department of Internal Medicine and Therapeutics, Timone Hospital, Marseille, France. [7]These authors contributed equally: Nathalie Bardin and Raja Marrakchi. *email: amira.gabsi@gmail.com

SSc patients n = 50	Median
Median age (years)	60 (28–68)
Male/female	7/43
Clinical Features	n (%)
Limited cutaneous form	24(48)
Diffuse cutaneous form*	26 (52)
Ulcers, scars, gangrene	17 (65)
Pulmonary fibrosis (PF)	19 (73)
Pulmonary arterial Hypertension (PAH)	20 (76)
Digestive involvement	13 (50)
Kidney involvement	8 (30)
Immunological Results	n (%)
Positive for anti-nuclear antibodies	48 (96)
- centromeric staining (ACA)	24 (47)
- positive for anti-topoisomerase I (anti-topo I)	26 (49)

Table 1. [A] Demographic data and disease characteristics of SSc patients. n: number of subjects. *According to the classification of ACR 2013.

differentiation and for production of cytokines which participates in protective immunity at boundary tissues[15]. IL17A primarily binds to IL-17RA[16] and initiates a pro-inflammatory signal, which is strongly involved in the progression of many autoimmune diseases in humans[17,18].

In SSc, the mRNA and protein expression of IL17A was found to be positively correlated to an outcome index, the modified Rodnan skin score[17,19].

In view of the role played by CD146 in SSc, we hypothesized a preponderant role of CD146 positive TH17 cells in SSc. To investigate this hypothesis, we explored in the present study, the concentrations of sCD146 and IL17A in serum of patients with SSc as compared to healthy controls. In parallel, we evaluated the proportion of TH17 cells expressing CD146 (CD146+ TH17) over total TH17 cells and analyzed the potential correlations with clinical events. At last, effect of sCD146 was tested on the proportion of CD146+ TH17 among total TH17cells of patients with SSc.

Materials and Methods

Ethics statement. All patients gave informed consent and all methods were performed in accordance with the relevant Guidelines and regulations. The Medical Bioethics Committee at the Pasteur Institute of Tunis approved This study under the reference 2015/04/E/FST.

Blood samples. Peripheral blood samples were obtained from 50 patients with SSc admitted to internal medicine departments of university hospital La RABTA Tunis Tunisia; all patients fulfilled the ACR/EULAR Classification Criteria and were then sub classified according to Leroy *et al.* criteria[1]. The cohort is explained in Table 1. Fifty sera of age and sex matched blood controls (median age 61 (57–70) and sex ratio 10 male/40 female).

Separation of blood cells on a FICOLL density gradient. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared by centrifugation over a Ficoll-Hypaque Gradient (Histopaque; Sigma Diagnostics, St Louis, MO) and cryopreseved in 10% dimethyl sulphoxide (DMSO) in fetal bovine serum (FBS). Sera were also collected and stocked in −20° until use.

Soluble CD146 detection. We measured serum sCD146 concentration using a capture enzyme-linked immunosorbent assay kit (CYQUANT ELISA, Biocytex Marseille, France) according to the manufacturer's protocol. The ELISA assay was validated previously[4]. A plastic support coated with specific mouse monoclonal anti human CD146 $F(ab')_2$ fragments binds to the sCD146 to be measured.

Next the mouse monoclonal antibody anti-CD146 coupled with peroxidase binds to a remaining free antigenic determinant of the CD146. The bound enzyme peroxidase is then revealed by its activity in a predetermined time on the TMB substrate. After stopping the reaction, the intensity of the signal is directly related to the concentration of sCD146 initially contained in the sample.

Quantification of IL17A. IL17A was quantified in serum of healthy controls and patients with SSc, using commercially available ELISA kit (Quantikinie ELISA human IL-17A immunoassay R&D Systems France). All the amount of cytokine present in diluted serum will be captured. After several washes to remove the excess, a polyclonal antibody bound to an enzyme specific for human IL17A is added. After washes, the reaction is revealed with a substrate (TMB), giving a color whose intensity is proportional to the amount of IL17A bound and the plates are read at 450 nm and optical density were converted to concentration using a four parametric logistic regression.

mRNA quantification. *RNA isolation and cDNA synthesis.* Total cellular RNA was extracted from cryopreseved PBMCs using the acid guanidine-phenol- chloroform technique with Trizol (GIBCO, BRL, Bethesda, MD), according to the manufacturer's instruction. After incubation for 10 min at 65 °C, RNA samples were stored

Primer		Tm °
β-actin	5′ CATCCTGTCGGCAATGCCAGG 3′ (forward primer) 5′ CTTCTTGGGC ATGGAGTCCTG 3′ (reverse primer)	54
RORδT	5′CTTCCTCAGCGCCCTGTGGTT3′ (forward primer) 5′ CCCAGGACGGTTGGCATTGA 3′ (reverse primer)	68
IL17A	5′ GCAAGAGATCCTGGTCCTGA 3′ (forward primer) 5′ AGCATCTTCTCGACCCTGAA 3′ (reverse primer)	63.8
CD146	5′ CCCGGGCCACCATGGGGCTTCCCA 3′ (forward primer) 5′ GGATCCTCACCGGCTCTCCGGCTC 3′ (reverse primer)	72.4

Table 2. Primer sequences. 1 - βactin (promega). 2- RORδT (eurobio). 3- IL17A A (eurobio). 4- CD146 (eurobio).

at −80 °C. Total RNA quality and quantity was assessed by absorbance at 260 nm using a nucleic acid and protein analyzer. This RNA was reverse-transcribed in a total volume of 25 µL with 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, US) in the presence of 1.5 µL of 5X First Strand Buffer (Invitrogen, US) (250-mM Tris-HCL; 375-mM KCL; 15-mM MgCL2) in addition to 10 units of RNAsine (Invitrogen, US), 1.25 µL of 100 mM DTT and 1.25 µL of each desoxynucleotide triphosphates (Promega, US) at 10-Mm. After that, all these reagents were incubated at 37 °C for 60 min and then cooled at −20 °C. The integrity and the quantity of the cDNA samples were tested by amplifying β-actin cDNA.

Quantitative RT-PCR. Real-time PCR was performed on a The Step-One-Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems, CA, USA) using the SYBR Green qPCR Kit (Power Up™ SYBR™ Green Master Mix A25742 Applied Biosystem Thermofischer FRANCE), and continuous fluorescence monitoring. A reaction volume of 25 µl (1.0 µl cDNA) was amplified for 40 cycles after initial denaturation (95 °C, 10 min) with the following parameters: 95 °C for 10 s, 60 °C for 15 s, and 72 °C for 20 s. Samples were run in duplicate, and relative quantification of mRNA level was performed using β-actin as an endogenous reference. We obtained the primer sequences (Table 2) from literature and checked through PCR in silico. We used three primers: RORγT, IL17A and CD146. qPCR data was analyzed by calculating the fold difference individually for each gene. Cycle threshold (Ct) is defined as the number of PCR cycles at which the fluorescence signal rises above the threshold value and is inversely proportional to the amount of template present in the reaction. Ct values of genes and control samples were compared and the fold difference calculated like: Fold CHANGE = $2-\Delta Ct$ where $\Delta Ct = CT$ sample– CT endogenous control. The Ct values were plotted, assuming the same threshold for all genes evaluated. Ct values < 40 were only used for calculation of the PCR efficiency. (This was explained in Step-one-plus book).

Flow cytometry analysis. PBMCs were prepared by centrifugation over a Ficoll technique and cryopserved in 10% SVF- DMSO. Thawed cells were routinely tested for viability by trypan blue exclusion. For cytokine secretion assays, PBMCs were stimulated with complete cell culture medium (Eurobio France) with 1/1500-inonomycine. - 1/2000 PMA - 1/3000 Golgi Stop overnight. Then cells were washed twice with 5% fetal bovine serum (FBS)-phosphate-buffered saline (PBS) prior to staining. First of all, cells were incubated for ten minutes with F_c blocking (Human TrueStain FcX™ Ozyme FRANCE) as an isotype control. Then, PBMCs were stained with up to five antibodies for 30 min at room temperature. After staining, the cells were fixed with 2% formaldehyde-PBS prior to analysis on a BD canto flow cytometry (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Lymphocytes were gated based on forward-scatter and side-scatter properties; at least 10,000-gated events were analyzed using the Flow Software (Flow LLC Ashland, Oregon). We calculated absolute cell percentages based on flow cytometry data and complete blood counts. Six colors were used to analyze the surface phenotype and intracellular cytokine production of PBMCs. The antibodies used were CD3 PerCP Cy5/CD4 APC-Cy7/CD25 PE-Cy7/CD146 Alexa fluor 488 for cell surface staining and IL17A PE and FOXP3 APC for intracellular staining and cytokine staining.

Flow cytometry analysis was performed on the canto 2 flow cytometry (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Lymphocytes subsets were gated by first forward versus side light scatter to identify lymphocytes, then CD4+ T cells were gated using a dot plot showing CD3 versus CD4. First of all, TH17 cells were identified using a dot plot showing CD4 and IL17A and then TH17 cells expressing CD146 were gated using a dot plot showing IL17A and CD146. Frequencies of cells were determined using statistical option in FLOWJO V10.5.3.

***In vitro* sCD146 stimulation on PBMCs from patients with SSc.** Fresh PBMCs from patients were used. 5×10^5 cells from each patient were incubated with 100 ng/ml of sCD146 [RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA) with 5% AB + human serum, 10 mM HEPES, non-essential amino acids, sodium private, 2 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, MO, USA), 100 units/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)] + 100 ng/ml sCD146, then cultured in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO2 for 24 hours. For cytokine secretion assays, cells were stimulated overnight with PMA-Ionomycine-Golgi Stop culture medium. And the cells were stained with CD3 PerCP Cy5/CD4 APC-Cy7/CD146 Alexa fluor 488 antibodies for cell surface staining and IL17A PE antibody for cytokine staining.

Flow cytometry analysis was performed on the canto 2 flow cytometry (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Lymphocytes subsets were gated as described above in flow cytometry analysis section.

Finally, using these cells stimulated or not with sCD146, total RNA was extracted and cDNA was synthesized as described above (2.6) and Q-RT PCR was performed using CD146 primers (Table 2).

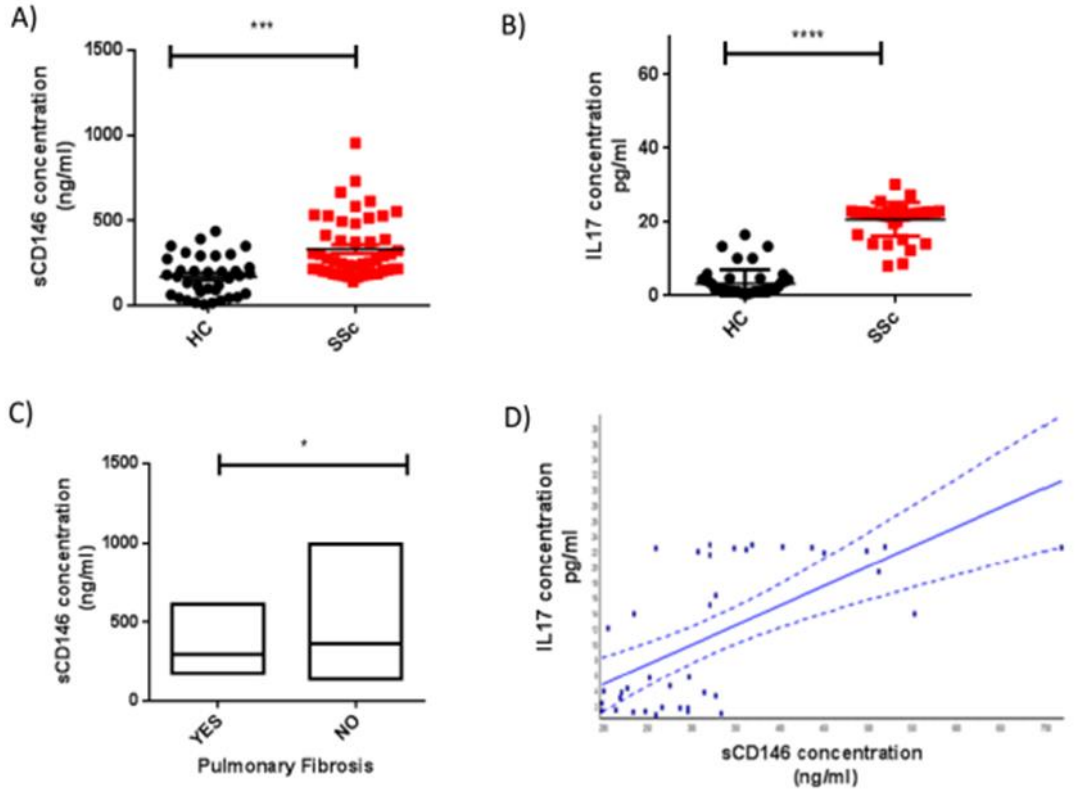


Figure 1. Serum level of soluble CD146 (sCD146) and circulating IL17A in patients with Systemic sclerosis (SSc) and healthy controls (HC). (**A**) Soluble CD146 (sCD146) concentration was significantly higher in patients with SSc (n = 50) than in HC (n = 50) [329.0 ± 24.90 ng/ml *versus* 168.4 ± 19.39 ng/ml, p < 0,0001]. (**B**) The cytokine IL17A concentration was significantly increased in patients with SSc (n = 50) than in (HC) (n = 50) [20.05 ± 1.97 ng/ml *versus* 3.32 ± 0.54 ng/ml, p < 0, 0001]. (**C**) A significant association was observed between pulmonary fibrosis (n = 19) and low levels of sCD146 (p = 0.0147). (Yes = have pulmonary fibrosis/ No = have other involvement than pulmonary fibrosis). (**D**) A correlation was observed between the IL17A and soluble CD146 (sCD146) concentrations in patients with SSc (p < 0.0001).

Statistical analysis. Results presented as means ± standard deviation. Statistical analyses were performed using Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA). A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Correlation and linear regression are the most commonly used techniques for quantifying the association between two parameters. The analyses are based on linear relationship between the two variables. A scatter plot is essential before embarking on any correlation-regression analysis to show that this is indeed the case. In our study, correlation and linear regression let us study correlation between sCD146 concentrations, IL17A concentration and TH17 expressing CD146 cells percentages.

Results

Epidemiologic study. We included 50 patients with SSc from the internal medicine department of university hospital RABTA Tunis, having a score of 9 or higher according to the ACR/EULAR criteria. Our cohort was composed of 43 women and 7 men and a mean age of the onset of illness equal to 60 ± 16 years [28–68 years]. Rodnan's score ranged from one to 41 in our cohort and averaged 17. Then, clinical data highlighted several inaugural events such as Raynaud's syndrome, skin involvement, arthralgia, cutaneous sclerosis, gastro-esophageal reflux. Pulmonary Arterial Hypertension (PAH), is one of the most serious disorders of systemic sclerosis, and is diagnosed by cardiac Doppler ultrasound after exercise dyspnea. Another serious manifestation is pulmonary fibrosis demonstrated by Chest CT examination. Our cohort was constituted by 20 patients with PAH and 19 patients with pulmonary fibrosis (Table 1).

Soluble CD146 and IL17A concentrations are increased in sera of patients with SSc. Serum concentrations of sCD146 and IL17A were measured in patients with SSc (n = 50) and compared to age - and sex-matched controls (n = 50). As shown in Fig. 1A,B, sCD146 and IL17A concentrations were significantly higher in patients with SSc as compared to healthy controls (respectively, 329.0 ± 24.90 ng/ml *versus* 168.4 ± 19.39 ng/ml, p < 0, 0001 and 20.05 ± 1.97 ng/ml *versus* 3.32 ± 0.54 ng/ml, p < 0, 0001). Regarding clinical association, we found a significant association between low sCD146 concentrations and pulmonary fibrosis (p = 0.04) as shown in Fig. 1C, while there was no correlation with other clinical disorders described in Table 1. For IL17A, no correlation was observed with clinical disorders. Interestingly, we found a positive correlation between sCD146 and IL17A concentrations (p = <0.0001), as illustrated in Fig. 1D.

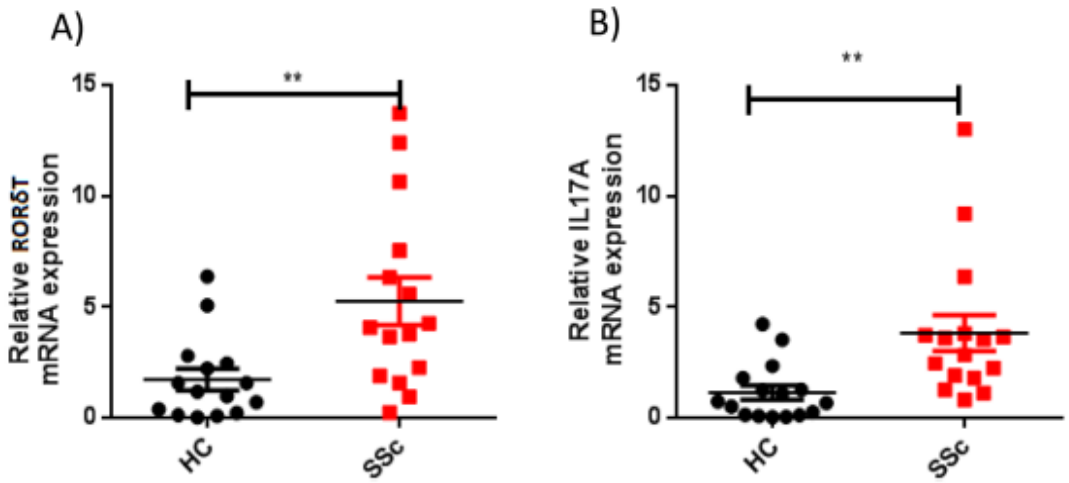


Figure 2. Relative mRNA expression of IL17A and RORγT in PBMCs from patients with Systemic sclerosis as compared to healthy control. (**A**) The expression of the transcription factor RORγT mRNA was higher in patients with SSc than in HC ($p = 0,0013$). (**B**) The expression of the cytokine IL17A mRNA was higher in patients with SSc than in HC ($p < 0.0001$).

The number of CD146+ TH17 cells is increased in patients with SSc. We analyzed the expression of IL17A and of the master transcription factor of TH17 cells, RORγT, in patients with SSc as compared to control group.

The mRNA expression of RORγT and IL17A was first quantified by qRT-PCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with SSc and healthy controls. RORγT and IL17A mRNA expression were significantly higher in patients with SSc as compared to healthy controls ($p = 0,0013$ and $p = <0.0001$) (Fig. 2A,B). For RORγT and IL17A mRNA expression, no significant association was observed with clinical features.

In a second step, we studied the proportion of TH17 cells over the total CD4+ cells population using a flow cytometry analysis (Fig. 3A). We found a higher percentage of TH17 cells in patients with SSc (Mean 16.95 ± 0.8482), as compared to healthy controls (Mean 9.135 ± 0.2522, $p < 0.05$) as shown in Fig. 3B.

Then, we analyzed CD146 expression on TH17 cells, we found a higher percentage of TH17 cells expressing CD146 (CD146+ IL17A+ subset) in patients with SSc as compared to healthy controls (Fig. 4A,B). Interestingly the percentage of TH17 cells expressing CD146 was inversely correlated to the pulmonary fibrosis (4 C) but no association with other clinical features was detected.

To better understand the link between TH17 cells and sCD146, the ratio between CD146+ TH17 cells and total TH17 cells was calculated (percentage of TH17 cells expressing CD146/TH17 cells). We found a significant correlation between sCD146 concentration and this ratio ($p = 0,0135$), as shown in Fig. 4D.

sCD146 affects T lymphocytes in PBMCs from patients with SSc. We evaluated sCD146 effects on TH17 cells after sCD146 treatment (100 ng/ml for 24 hours) of PBMCs of patients with SSc. Interestingly, an up regulation of the percentage of TH17 cells expressing CD146 (CD146+ IL17A+ subset) was found after sCD146 treatment (Fig. 5A). The number of cells was determined at T0, and after 24 h of sCD146 treatment with 492 million +/− 6088 at T0 and 491 million +/− 6441 at T24, no significant difference was observed ($p = 0.8992$) attesting for the absence of cell proliferation. In addition expression of CD146 was up regulated after sCD146 treatment as demonstrated by fluorescence intensity analysis (Fig. 5B). Besides, after treatment with sCD146, mRNA expression of CD146 was increased in PBMCs treated with sCD146 as compared to untreated cells (Fig. 5C).

Discussion

In systemic sclerosis, we recently reported a major role of CD146, a molecule ubiquitously distributed on vascular cells, but also expressed on a subset of lymphocytes involved in the pathogenesis of the disease, TH17 cells. In this study we demonstrated for the time that TH17 lymphocytes expressing CD146 are increased in patients with SSc, suggesting their involvement in the pathology.

In these patients, we found a higher percentage of TH17 cells expressing CD146 and a correlation between sCD146 and IL17A serum concentrations. Interestingly the ratio of TH17 cells expressing CD146/Total TH17 cells in patients with SSc was inversely correlated to pulmonary fibrosis. Finally, *in vitro* treatment of TH17 cells with sCD146 led to an up regulation of CD146 expression. Afterward, PBMCs treatment with sCD146 induced an increase in the mRNA expression of CD146 as compared to untreated cells.

In a previous study, unfavorable evolution of SSc was associated with a decrease of sCD146 concentrations. We recently showed that sCD146 concentrations were increased in patients with SSc and that severe manifestations of the disease, as pulmonary fibrosis, were associated with low sCD146 concentrations[4]. Patients producing high and sustained levels of sCD146 may be protected against the disease complications, accounting for the reduction in the concentration of the soluble form in the case of pulmonary fibrosis[4]. In the present study, we confirm these data, highlighting sCD146 as a novel biomarker for the assessment of the disease. In addition, we evidence a

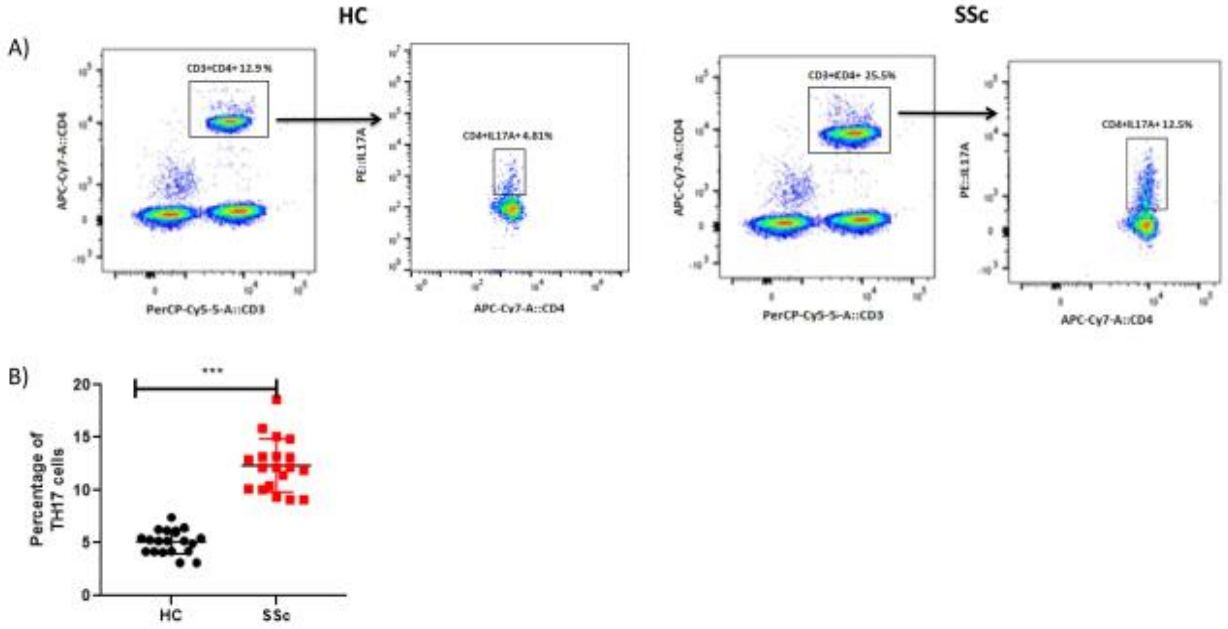


Figure 3. Flow cytometry analysis of TH17 cells in patients with systemic sclerosis as compared to healthy controls. (**A**) Gating strategy of TH17 cells in HC as compared to PBMC of Patients with SSc by FACS: cells were activated with PMA-Ionomycine-Golgi Stop overnight and F_c blocking (Humain TrueStain FcX^{TM} Ozyme FRANCE) was used as an isotype control. (**B**) The percentage of TH17 cells in patients with SSc was found to be increased as compared to HC ($p = 0.0019$).

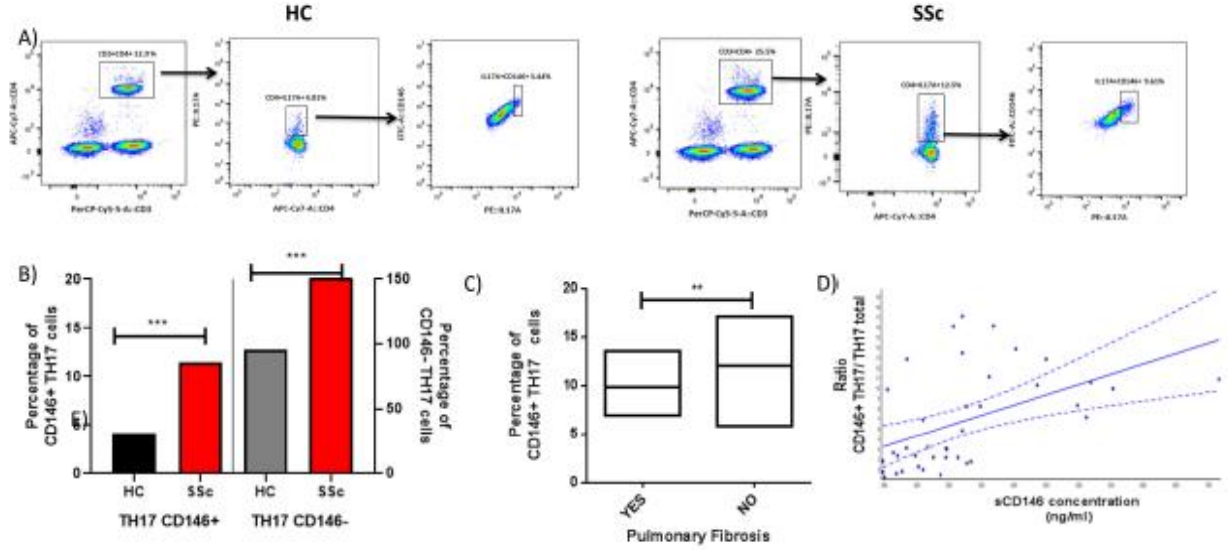


Figure 4. Flow cytometry analysis of TH17 expressing CD146 in Systemic sclerosis. (**A**) Gating strategy for analysis of CD146 expression on TH17 total cells in HC compared to patients with SSc. (**B**) The mean percentage of TH17 cells expressing CD146 (CD146+ TH17cells) and non expressing CD146 (CD146- TH17) among HC and patients with SSc: Percentage of TH17 cells expressing CD146 (CD146 + TH17) is higher in case of SSc than in healthy controls ($p = 0.0019$). (**C**) The percentage of TH17 cells expressing CD146 (CD146+ TH17) is inversely correlated to pulmonary fibrosis ($p = 0.04$) (Yes = have pulmonary fibrosis/No = have other involvement than pulmonary fibrosis). (**D**) A correlation is observed between the ratio (CD146+ TH17/TH17 Total) cells and sCD146 concentration in patients with SSc ($p = 0.0004$).

significant correlation between sCD146 and IL17A concentrations. This positive correlation could explain the protective role of sCD146, interfering with the counterbalance of inflammation and fibrosis mediated by IL17A.

In patients with autoimmune disease, an increased proportion of TH17 cells were described in the peripheral circulation and at the sites of active inflammation[20]. Several studies have shown that in SSc, TH17 cells could affect the inflammatory response of the disease, and potentially the fibrosis process[21]. Our results confirm

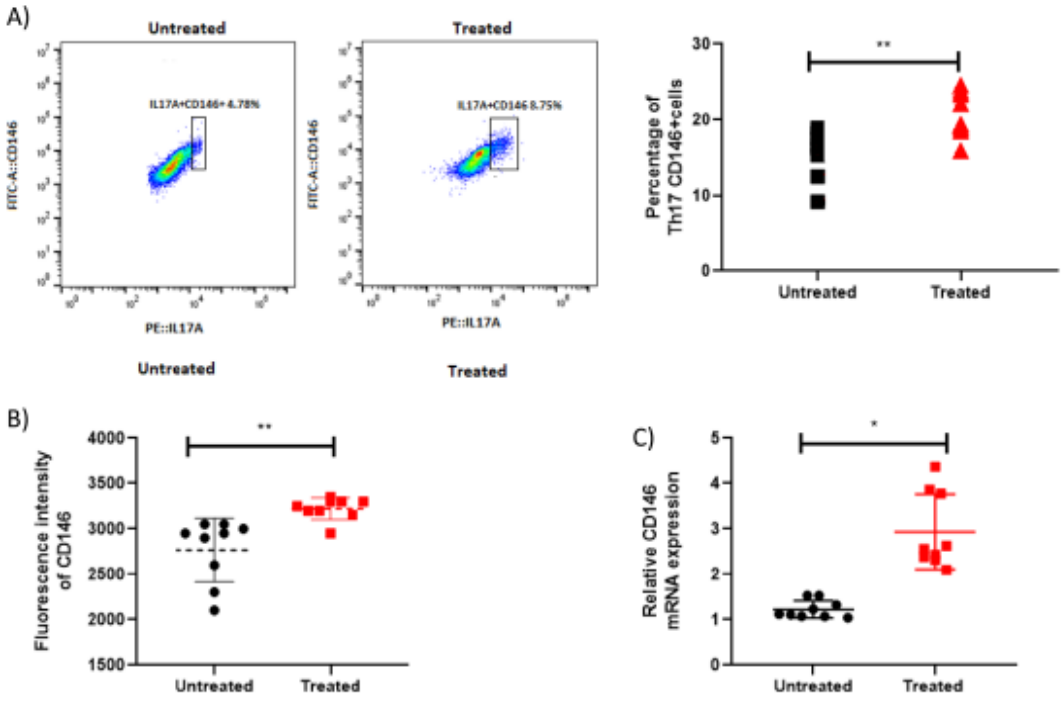


Figure 5. Expression of CD146 on TH17 cells *in vitro*; Expression of CD146 on TH17 cells was analyzed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy controls (HC) and patients with SSc. (**A**) Flow cytometry analysis of TH17 cells expressing CD146 in PBMCs from patients with SSc treated with sCD146: in each subpopulation, expression of CD146 on TH17 cells was compared between untreated PBMCs (squares) and treated ones (triangles) in patients with SSc. (**B**) Flow cytometry analysis of TH17 cells expressing CD146 in PBMCs from patients with SSc treated with sCD146: Fluorescence intensity of CD146 is higher on TH17 cells from PBMCs treated with sCD146 compared to untreated ones. (**C**) The expression of the transcription factor ROR-γT mRNA and IL17A mRNA in PBMCs of patients with SSc before and after treatment with sCD146: there is no difference in ROR-γT mRNA expression ($p = 0.7994$) while IL17A mRNA expression was lower after treatment ($p = 0.0053$). (**D**) CD146 mRNA expression in PBMCs of patients with SSc before and after treatment with sCD146: there is an increase in CD146 mRNA expression after treatment ($p = 0, 0232$).

a higher percentage of TH17 cells in patients with SSc and show for the first time that this increase is partially due to a higher percentage of TH17 cells expressing CD146. We propose that in patients, the up-regulation of this sub-population could be related to the sera sCD146 increase. In accordance with this hypothesis, we showed an *in vitro* increase of TH17 cells expressing CD146 after sCD146 treatment. This increase was attributed to an augmentation of CD146 expression since we showed an up-regulation of fluorescence intensity without TH17 proliferation. Such an increase of membrane CD146 expression has been already reported in endothelial cells[22]. We also showed that sCD146 concentrations correlate with the TH17 expressing CD146/TH17 total cells ratio in patients with SSc.

Altogether our results led us to hypothesize that sCD146 could be involved in TH17 cells differentiation and their homing to the site of the disease. Along this line, it has been described that CD146 positive TH17 cells was the sub-population of TH17 cells with an enhanced ability to bind to, and to cross through, vascular endothelium. In addition, CD146 was described as a marker of mouse NK cell maturation[23]. At last, TH17 expressing CD146 are able to migrate from the peripheral circulation to sites of active inflammation[24]. Further studies will be conducted to confirm the role of this sub-population CD146+ TH17 in the fibrotic process, to get more insights into mechanistic pathways and to investigate the potential interest for therapeutic applications.

In conclusion, TH17 cells expressing CD146 could represent a new component of the adaptive immune response and could be potential targets for therapy, opening the way for the generation of new tools for the management of SSc.

Received: 28 June 2019; Accepted: 11 November 2019;
Published online: 27 November 2019

References

1. van den Hoogen, F. *et al.* 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative: ACR/EULAR Classification Criteria for SSc. *Arthritis & Rheumatism* **65**, 2737–2747 (2013).
2. Zhao, W. *et al.* The status of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis is associated with IRF5, STAT4, IRAK1, and CTGF polymorphisms. *Rheumatol Int* **37**, 1303–1310 (2017).
3. Chu, H. *et al.* Sirtuin1 Protects against Systemic Sclerosis–related Pulmonary Fibrosis by Decreasing Proinflammatory and Profibrotic Processes. *Am J Respir Cell Mol Biol* **58**, 28–39 (2018).

4. Kaspi, E. *et al.* Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **140**, 1448–1451.e6 (2017).
5. Bardin, N., Francès, V., Combes, V., Sampol, J. & Dignat-George, F. CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells. *FEBS Letters* **421**, 12–14 (1998).
6. Bardin, N. *et al.* S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens* **48**, 531–539 (1996).
7. Bardin, N. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* **98**, 3677–3684 (2001).
8. Bardin, N. *et al.* CD146 and its Soluble Form Regulate Monocyte Transendothelial Migration. *ATVB* **29**, 746–753 (2009).
9. Kebir, A. *et al.* CD146 Short Isoform Increases the Proangiogenic Potential of Endothelial Progenitor Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Circulation Research* **107**, 66–75 (2010).
10. Bardin, N. *et al.* Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **12**, 16–21 (2006).
11. Ito, T. *et al.* Elevated serum levels of soluble CD146 in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* **36**, 119–124 (2017).
12. Zheng, H., Chen, G., DeLouise, L. A. & Lou, Z. Detection of the Cancer Marker CD146 Expression in Melanoma Cells with Semiconductor Quantum Dot Label. *j biomed nanotechnol* **6**, 303–311 (2010).
13. Kaspi, E. *et al.* Identification of soluble CD146 as a regulator of trophoblast migration: potential role in placental vascular development. *Angiogenesis* **16**, 329–342 (2013).
14. Wu, C., Goodall, J. C., Busch, R. & Gaston, J. S. H. Relationship of CD146 expression to secretion of interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon-γ by $CD4^+$ T cells in patients with inflammatory arthritis: Cytokine secretion by $CD146^+$ $CD4^+$ T cells. *Clin Exp Immunol* **179**, 378–391 (2015).
15. Castro, G. *et al.* RORγt and RORα signature genes in human TH17 cells. *PLoS One* **12**, e0181868 (2017).
16. Gu, C., Wu, L. & Li, X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* **64**, 477–485 (2013).
17. Bălănescu, P., Bălănescu, E. & Bălănescu, A. IL-17 and TH17 cells in systemic sclerosis: a comprehensive review. *Romanian Journal of Internal Medicine* **55**, 198–204 (2017).
18. Amatya, N., Garg, A. V. & Gaffen, S. L. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends in Immunology* **38**, 310–322 (2017).
19. Zhou, Y. *et al.* The elevated expression of TH17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. *Human Immunology* **76**, 22–29 (2015).
20. Bedoya, S. K., Lam, B., Lau, K. & Larkin, J. TH17 Cells in Immunity and Autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology* **2013**, 1–16 (2013).
21. 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).
22. Bardin, N. *et al.* Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. *Thromb Haemost* **90**, 915–920 (2003).
23. Despoix, N. *et al.* Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2855–2864 (2008).
24. Dagur, P. K. *et al.* MCAM-expressing CD4+ T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* **37**, 319–327 (2011).

Acknowledgements

We would like to thank: All the members of cytometry platform at the faculty of medicine of Tunis for flow cytometry analysis. All the members of Laboratory of toxins and venoms at the Institute Pasteur Tunis. All the members of internal medicine at the RABTA hospital Tunis, La Timone Hospital Marseille and La conception Hospital Marseille for their cooperation. This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Tunisia.

Author contributions

A.G. wrote the main manuscript text and prepared the figs. N.B., M.R. and M.B.C. checked the manuscript and corrected the figures. X.H., A.S.L. and A.B. helped on the sCD146 manipulations. M.S.K., F.S., M.H.H. and B.G. checked the clinical part of the article. A.D., H.S., A.S., A.A. and B.N. helped on the bench for the manipulations of qPCR and flow cytometry. G.A. helped on the flow cytometry analysis. All the authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

18 Partie II : CD146 au carrefour de deux voies fibrosantes : les ROS et la voie Wnt

L'implication de CD146 dans la fibrose cutanée de la SSc nous a conduit à chercher par quels mécanismes il agissait sur la fibrose de la SSc. Nos premiers résultats ont révélé que CD146 jouait un rôle important dans la balance entre les voies Wnt canonique et non canonique puisque son absence induisait une augmentation de l'activité de la β-caténine sous l'action du ligand Wnt3a et une absence d'activation de la voie Wnt non canonique après activation par le ligand Wnt5a. Ces premiers résultats nous ont incité à comprendre précisément comment CD146 régulait ces voies de signalisation dans la SSc. La bléomycine, un agent connu pour induire une fibrose pulmonaire chez l'homme mais aussi chez la souris, agit notamment par la génération de ROS. La bléomycine active aussi plusieurs voies cellulaires dont la voie Wnt β-caténine dépendante (202). Comme décrit dans le cancer, il existerait un lien entre ces deux voies pro-fibrosantes (214). Dans le processus de fibrose, quelques publications ont décrit ces voies interconnectées (219,220). De plus, sous l'influence des ROS, Bu et al. ont montré que CD146 se dimérise et active plusieurs voies de signalisation (242). Cependant, l'implication de ces interactions dans la SSc n'est pas définie et les molécules qui régulent cette interconnexion dans la SSc ne sont pas identifiées.

Nous avons émis l'hypothèse que le CD146 pourrait être un médiateur de l'interaction entre les voies de signalisation Wnt et ROS, participant ainsi au développement de la fibrose chez les patients atteints de SSc. Pour explorer ces interactions complexes, nous avons d'abord commencé par utiliser le modèle de fibrose *in vitro* de MEFs WT et KOCD146. Ce modèle nous a permis d'analyser la régulation des voies de signalisation Wnt et la réponse aux ROS en fonction de CD146 dans un contexte de fibrose chez la souris. Nous avons confirmé que l'expression de CD146 était modulée par les ROS et qu'il régulait l'interface entre les ROS et la voie Wnt, deux voies pro-fibrotiques.

Nous avons ensuite cherché à évaluer la pertinence de nos résultats chez l'homme. Nous avons extrait des fibroblastes cutanés de patients atteints de SSc et de témoins sans SSc en collaboration avec le laboratoire de culture et thérapie cellulaire du professeur Sabatier (APHM). Il s'agissait de prélèvements cutanés provenant de déchets opératoires de chirurgie du protocole Scleradec2 (NCT02558543). En raison de la rareté de la SSc et de l'absence d'indication médicale à réaliser une biopsie cutanée chez les patients SSc, il est difficile

d’obtenir des fibroblastes de patients SSc en routine. Nos résultats confirment chez l’homme que CD146 est au carrefour de régulation entre les voies WNT/ROS. De plus, alors que CD146 est absent des fibroblastes « normaux », nous avons mis en évidence une néo-expression de CD146 sur les fibroblastes cutanés de patients SSc malgré l’hétérogénéité clinique et biologique de la pathologie. Cette néo-expression est liée à la présence de ROS. Nous, montrons également que la présence de CD146 régule la balance entre la voie Wnt et les ROS sur des fibroblastes humains.

Dans ce travail, nous avons donc mis en évidence la présence de CD146 sur les fibroblastes humains de patients atteints de SSc Nous avons aussi démontré l'existence d'une interaction entre les voies ROS et Wnt orchestrée par CD146 dans la fibrose de la SSc et ouvre un nouveau domaine de recherche pour cibler de nouvelles potentielles cibles thérapeutiques dans la SSc.

ORIGINAL ARTICLE

CD146 at the Interface between Oxidative Stress and the Wnt Signaling Pathway in Systemic Sclerosis

JID Open

Xavier Heim[1,2], Julien Bermudez[1], Ahmad Joshkon[1], Elise Kaspi[3], Richard Bachelier[1], Marie Nollet[1], Mélanie Vélier[1,4], Laetitia Dou[1], Alexandre Brodovitch[2], Alexandrine Foucault-Bertaud[1], Aurelie S. Leroyer[1], Audrey Benyamine[1,5], Aurélie Daumas[1,6], Brigitte Granel[1,5], Florence Sabatier[1,7], Françoise Dignat-George[1,4], Marcel Blot-Chabaud[1] and Nathalie Bardin[1,2]

CD146 involvement was recently described in skin fibrosis of systemic sclerosis through its regulation of the Wnt pathway. Because the interaction between Wnt and ROS signaling plays a major role in fibrosis, we hypothesized that in systemic sclerosis, CD146 may regulate Wnt/ROS crosstalk. Using a transcriptomic and western blot analysis performed on CD146 wild-type or knockout mouse embryonic fibroblasts, we showed a procanonical Wnt hallmark in the absence of CD146 that is reversed when CD146 expression is restored. We found an elevated ROS content in knockout cells and an increase in DNA oxidative damage in the skin sections of knockout mice compared with those of wild-type mice. We also showed that ROS increased CD146 and its noncanonical Wnt ligand, WNT5A, only in wild-type cells. In humans, fibroblasts from patients with systemic sclerosis presented higher ROS content and expressed CD146, whereas control fibroblasts did not. Moreover, CD146 and its ligand were upregulated by ROS in both human fibroblasts. The increase in bleomycin-induced WNT5A expression was abrogated when CD146 was silenced. We showed an interplay between Wnt and ROS signaling in systemic sclerosis, regulated by CD146, which promotes the noncanonical Wnt pathway and prevents ROS signaling, opening the way for innovative therapeutic strategies.

Journal of Investigative Dermatology (2022) **142,** 3200–3210; doi:10.1016/j.jid.2022.03.038

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a rare and severe autoimmune disease characterized by fibrosis of the skin but also of multiple internal organs. The pathophysiological process involves the induction of an oxidative burst leading to oxidative stress (Servettaz et al., 2009), ROS accumulation, and subsequent endothelial cell activation (Mostmans et al., 2017). Hence, exacerbated ROS production induces chronic inflammation, autoimmunity, and fibroblast activation that contributes to extracellular collagen deposition and, subsequently, fibrosis of the skin and organs (Doridot et al., 2019; Sambo et al., 2001). Indeed, data from animal models have shown that chronic oxidative stress in the skin, as induced by bleomycin, a pro-oxidative agent, is sufficient to induce fibrosis, perturbation of the vascular system, and autoimmunity (Servettaz et al., 2009). Therefore, a better understanding of the pathogenesis of SSc is needed to identify new molecular targets and develop alternative therapeutic approaches.

CD146 was recently identified as a new molecular actor significantly involved in SSc (Kaspi et al., 2017). CD146 is a cell adhesion molecule of the Ig superfamily that exists as both a membrane-anchored form and a soluble form (soluble CD146) generated by membrane cleavage (Boneberg et al., 2009). Membrane CD146 is preferentially expressed on vascular endothelial cells (Bardin et al., 2001) where it plays an important role in regulating vascular permeability. Moreover, CD146 is also expressed in various other cell types, such as T helper 17 immune cells (Dagur et al., 2011). Physiologically, CD146 and its soluble form are mainly involved in regulating angiogenesis and inflammation (Harhouri et al., 2010). CD146 is required to activate the angiogenic function of VEGF-R2 (Jiang et al., 2012), and CD146 is also known as one of the receptors of WNT5A glycoprotein (Ye et al., 2013). In patients with SSc, we have shown that the decrease in serum concentration of soluble CD146 is associated with a poor prognosis of the disease in two independent cohorts of patients with SSc (Gabsi et al., 2019; Kaspi et al., 2017), further confirming what was established by Ito et al. (2017). Next, in a mouse model of SSc induced by

[1]*Aix Marseille Univ, INSERM, INRAE, C2VN, Marseille, France;* [2]*Service d'immunologie, Biogénopôle, Hôpital de la Timone, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France;* [3]*Aix Marseille University, APHM, INSERM, MMG, Hôpital la Timone, Service de Biologie Cellulaire, Marseille, France;* [4]*Hematology and Vascular Biology Department, Hopital de la Conception, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France;* [5]*Internal Medicine Department, Hopital Nord, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France;* [6]*Internal Medicine, Geriatric and Therapeutic Department, Hopital de la Timone, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France; and* [7]*Cell Therapy Laboratory, INSERM CIC BT 1409, Hôpital de la Conception, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France*

Correspondence: Xavier Heim, Centre de Recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN), Aix Marseille University, 27 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. E-mail: xavier.heim@univ-amu.fr

Abbreviations: HDFC, control-derived human donor fibroblast; HDFS, systemic sclerosis–derived human dermal fibroblast; KO, knockout; MEF, mouse embryonic fibroblast; SSc, systemic sclerosis; WT, wild type

Received 30 September 2020; revised 1 March 2022; accepted 12 March 2022; accepted manuscript published online 9 June 2022; corrected proof published online 26 August 2022

© 2022 The Authors. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

bleomycin, we showed that CD146 knockout (KO) mice were more prone to develop skin fibrosis than wild-type (WT) mice, with an upregulation of the canonical β-catenin–dependent pathway (Kaspi et al., 2017). The Wnt pathway is generally divided into three subpathways: the canonical pathway, the noncanonical planar cell polarity pathway, and the noncanonical Wnt/calcium pathway. The canonical pathway activated inter alia by WNT3a initiates intracellular signaling through β-catenin nuclear translocation. The other two are qualified as β-catenin independent and are associated with differentiation, cell polarity, migration, and canonical pathway inhibition, especially with the noncanonical ligand WNT5A. In addition, in SSc, it has been observed that Wnt antagonists such as Dickkopf, SFRP, and WIF1 are decreased (Dees et al., 2014; Svegliati et al., 2014).

Recent publications have shed light on the link between Wnt and ROS signaling crosstalk (Funato et al., 2006), particularly those involved in the fibrosis process (Andersson-Sjöland et al., 2016; Yu et al., 2017). However, the involvement of this signaling mechanism in SSc is not well-defined and requires identifying the molecular actors of this interplay. We hypothesized that CD146 could represent a mediator of the Wnt/ROS signaling crosstalk participating in the development of fibrosis in patients with SSc.

RESULTS

CD146 mediates a balanced ratio between canonical and noncanonical Wnt signaling

In a previous study, we described an upregulation of the canonical Wnt pathway in the absence of CD146 (Kaspi et al., 2017). To further investigate the molecular mechanisms underlying this initial observation, we performed a transcriptomic analysis focusing on 84 genes implicated in the Wnt signaling pathway as effector or regulatory molecules of the canonical and noncanonical pathways using WT or *Cd146* KO mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Figure 1a). Transcriptomic analysis confirmed our previous in vitro data, which revealed overexpression of 18 genes implicated in the Wnt canonical pathway in MEFs from KO mice. Thus, an accumulating body of evidence points toward a procanonical Wnt hallmark in the absence of CD146. Among the overexpressed genes, the protein expression levels of WNT3a, a typical activator of the canonical pathway, and WIF1 were further analyzed, owing to their well-defined role in the pathophysiology of SSc (Svegliati et al., 2014; Wei et al., 2012). Next, we performed western blots on different batches of WT or KO MEFs. These results confirmed those obtained by transcriptomic analysis by showing a robust increase in both WNT3a and WIF1 in KO MEFs (Figure 1b–d) compared with that in WT MEFs. We also analyzed the protein expression of β-catenin by western blot because it is a major mediator in the Wnt canonical pathway even if its expression was not modified at the transcriptional level. Notably, we found significantly higher protein expression of β-catenin in the MEFs from KO mice than in those from WT mice in two different batches of cells (Figure 1b and e). To further confirm these results, KO MEFs were transiently transfected with a CD146-coding plasmid before the analysis of protein expression. Replenishing CD146 expression in KO MEFs was associated with the loss of WNTa, WIF1, and β-catenin expression and showed that the restoration of CD146 expression inhibited the procanonical signature, confirming the results obtained with WT MEFs (Figure 1b–e). Altogether, our results showed a procanonical Wnt hallmark in the absence of CD146, suggesting that CD146 helps to maintain a balanced ratio between the Wnt canonical and noncanonical signaling pathways.

Absence of CD146 enhances ROS production and sensitivity to ROS effects

To elucidate whether CD146 participates in regulating ROS production, we assessed the generation of ROS in KO and WT MEFs. Basal conditions for up to 6 hours resulted in higher ROS generation in KO cells than in WT cells from the second hour until the sixth hour (Figure 2a). Next, we used bleomycin as an exogenous source of oxidative stress and compared the ROS production of WT MEFs with that of KO MEFs. Bleomycin treatment at a high dose (10 μg/ml) significantly increased ROS generation in both WT and KO MEFs in a similar fashion to that induced by indoxyl sulfate (200 μM), which was used as a positive control (Dou et al., 2007) (Figure 2b). Of interest, this effect was abolished when N-acetylcysteine, an inhibitor of oxidative stress, was added to the treatment (Figure 2c). As shown in Figure 2d, bleomycin at a high concentration, 10 μg/ml, efficiently induced ROS generation in both WT and KO MEFs; however, at doses as low as 1 μg/ml, bleomycin was able to induce ROS only in KO MEFs (Figure 2d). We next examined the level of DNA base oxidative damage in skin sections from WT and KO mice. As shown in Figure 3a (left panel) and b, there was a significant increase in the staining intensity of 8-oxo-2′-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA bases, in the skin sections of KO mice compared with that in WT mice at steady state, confirming that KO mice are more sensitive to ROS than WT mice. After the induction of oxidative stress by bleomycin treatment, skin sections from WT mice showed increased DNA oxidative, suggesting that the protective effect of CD146 from ROS is lost under high oxidative stress conditions (Figure 3a [left panel] and b).

Absence of CD146 enhances skin fibrosis under oxidative stress conditions

To reinforce the link between CD146 and fibrosis mediated by ROS, dermal thickness was analyzed using Masson's trichrome staining, which stains collagen fibers blue (Yang et al., 2012), and the presence of myofibroblasts in dermal tissue was investigated. As shown in Figure 3a (middle panel) and c, dermal thickness was significantly increased in KO mice after bleomycin treatment compared with that after saline solution injection, whereas no difference was observed in WT mice nor between WT mice and KO mice after saline solution injection. These results are consistent with our previously published data (Kaspi et al., 2017), which described an increase in dermal thickness in KO mice after bleomycin injection compared with that after the control condition (saline solution), whereas this concentration of bleomycin (10 μg/ml) was not sufficient to induce a dermal thickness increase in WT mice. Finally, because myofibroblasts produce collagen in the extracellular matrix, we investigated the presence of this type of differentiated fibroblast in our model using α-smooth muscle actin marker (Hinz, 2007). No

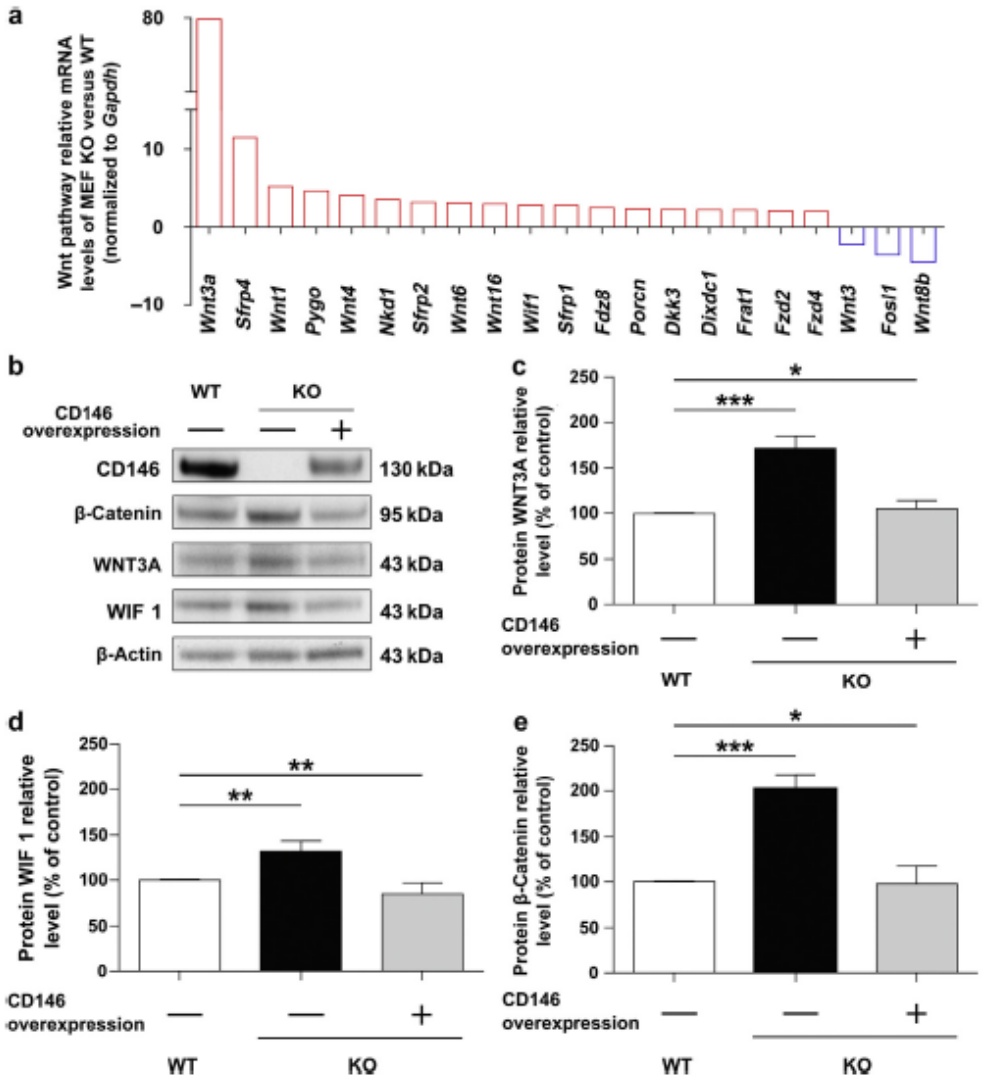


Figure 1. CD146 deficiency is associated with increased Wnt canonical signaling. (**a**) Transcriptional profiling of Wnt signaling components showed 18 upregulated but 3 downregulated genes in MEFs from KO mice compared with those from WT mice. (**b–e**) Representative western blots for the selected proteins (**b**) WNT3A, WIF1, and β-catenin and their corresponding relative quantification ($n \geq 3$) for (**c**) WNT3A, (**d**) WIF1, and (**e**) β-catenin are shown. KO MEFs were also transfected with a plasmid coding for CD146. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$. Data represent the mean ± SEM. KO, knockout; MEF, mouse embryonic fibroblast; WT, wild type.

difference in the number of positive cells between WT and KO mice was observed (data not shown). The dermal thickness was positively correlated with anti–α-smooth muscle actin immunostaining, indicating that dermal collagen content is associated with the presence of myofibroblasts (Figure 3d [right panel] and e). Altogether, our data led us to confirm that KO mice developed more skin fibrosis than WT mice under oxidative stress.

ROS induction increases CD146 and WNT5A expression

Because our results showed a higher basal ROS content in the absence of CD146, we wondered whether ROS could conversely modulate CD146 expression. To assess this hypothesis, WT MEFs were treated with low (1 μg/ml) or high (10 μg/ml) doses of bleomycin for 6 hours, and then the mRNA and protein expression of CD146 was analyzed. Remarkably, not only the high dose of bleomycin induced a steep increase in CD146 protein expression in WT MEFs but also the lower dose (Figure 4a). These results were also confirmed by RT-qPCR, which showed a significant increase in *Cd146* transcripts after 10 μg/ml bleomycin treatment (Figure 4b). Next, we investigated whether the CD146 ligand WNT5A was also altered by bleomycin treatment. As shown in Figure 4c, bleomycin treatment significantly increased WNT5A expression in the same way as CD146 in WT MEFs, whereas there was no variation in WNT5A protein expression in KO cells. The addition of N-acetylcysteine, a ROS inhibitor, to bleomycin treatment abrogated the upregulation of CD146 and WNT5A on WT MEFs (Figure 4d), reinforcing the fact that oxidative stress increases the expression of CD146 and WNT5A. Furthermore, in both WT and KO MEFs, the mRNA levels of *Wnt5a* were not modified by bleomycin treatment (Figure 4e). All our results showed that ROS induction increases the synthesis of CD146 and the expression of both CD146 and WNT5A. To further elucidate the mechanism, we first investigated whether CD146 inhibits the degradation of WNT5A after a cycloheximide multiple-chase experiment and analyzed WNT5A expression (Figure 4f). We confirmed an upregulation of WNT5A expression by bleomycin only in WT MEFs and not in KO MEFs regardless of the time of bleomycin treatment. In WT MEFs, no significant difference between bleomycin and bleomycin/cycloheximide treatment was found at 6, 12, or 24 hours, showing a translation-independent increase in WNT5A expression. This suggests that in the presence of CD146, WNT5A could be protected from degradation. Then, we tested whether WNT5A protein levels were

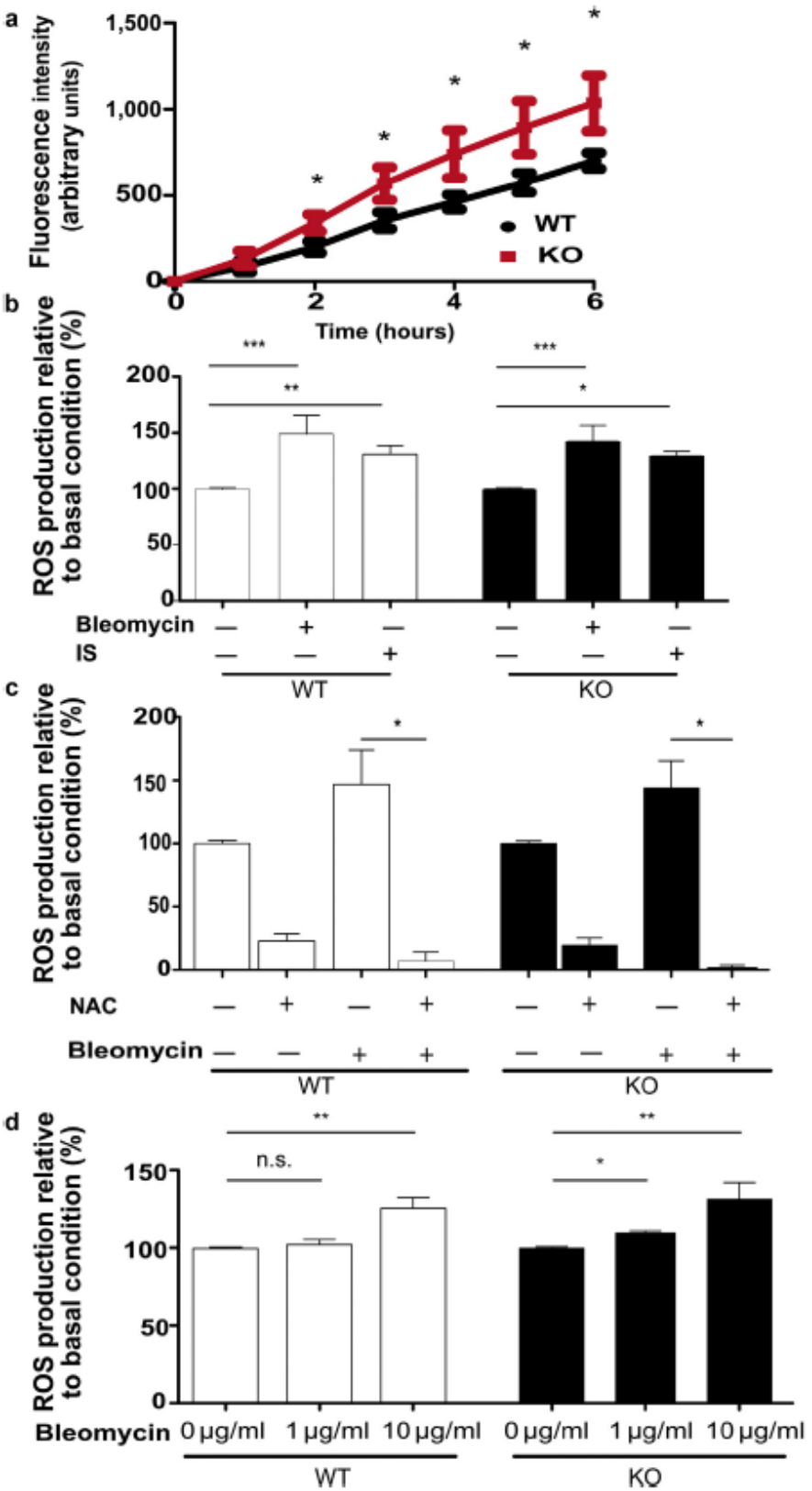


Figure 2. CD146 inhibits ROS production and decreases cell sensitivity to ROS. (**a**) Time course of ROS generation by WT (black) or KO (red) MEFs in basal culture media as assessed by cytofluorimetry. (**b**) ROS generation by MEFs 6 hours after induction by bleomycin (10 µg/ml) or IS (200 µM) relative to nonstimulated cells. (**c**) ROS generation by MEFs 6 hours after induction by bleomycin (10 µg/ml). NAC (at a final concentration of 50 mM) was added to the cultured MEFs before treatment with bleomycin. (**d**) KO and WT MEFs were treated with either a low or a high bleomycin concentration, and the effect on ROS generation was detected by cytofluorimetry. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$. Data represent the mean ± SEM. IS, indoxyl sulfate; KO, knockout; MEF, mouse embryonic fibroblast; NAC, N-acetyl cysteine; n.s., not significant; WT, wild type.

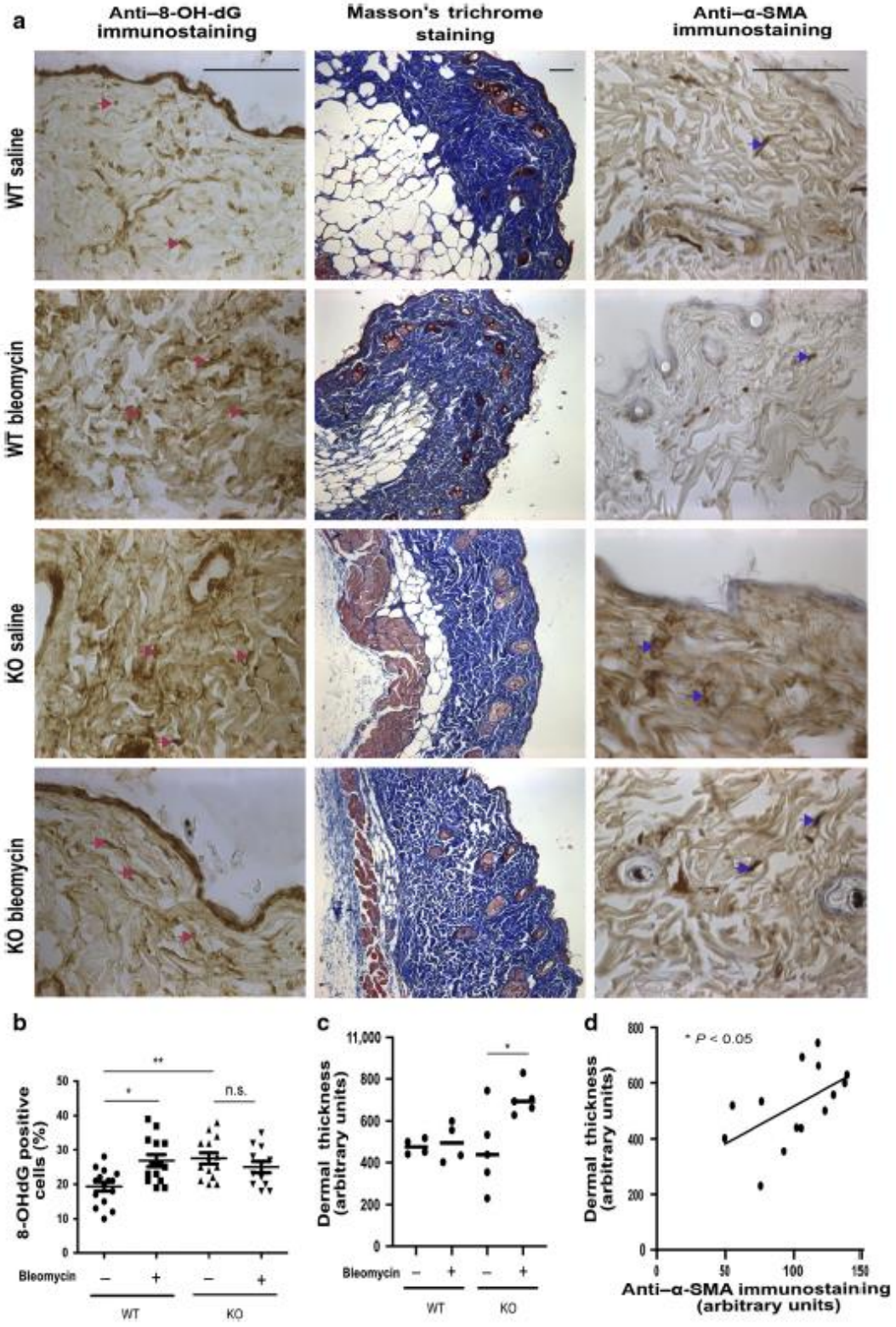


Figure 3. CD146 inhibits ROS-induced skin fibrosis. (**a**) Representative images of anti–8-OH-dG immunostaining (left panel), Masson's trichrome staining (middle panel), and anti–α-SMA immunostaining (right panel) on skin biopsies from WT and KO mice injected with either saline or bleomycin. Examples of cells positive for 8-OH-dG and α-SMA immunostaining are indicated with red and blue arrowheads, respectively. (**b**) Quantification of ROS-induced DNA damage in KO and WT mice treated with or without bleomycin. (**c**) Quantification of dermal thickness in KO and WT mice treated with or without bleomycin. (**d**) Positive correlation between dermal thickness and anti–α-SMA immunostaining in skin sections from WT and KO mice. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$. Data represent the mean ± SEM. Bars = 50 μm. 8-OH-dG, 8-oxo-2′-deoxyguanosine; α-SMA, α-smooth muscle actin; KO, knockout; n.s., not significant; WT, wild type.

modified after proteasome blockade (Supplementary Figure S1). A significant reduction of WNT5A was observed in KO MEFs after proteasome blockade, suggesting, as described in the literature (Fels et al., 2008; Harhouri et al., 2017), that another degradation pathway is stimulated. In contrast, such a decrease was not observed in WT MEFs,

suggesting that degradation pathways are less activated in the presence of CD146. We investigated the potential activation of autophagy by analyzing the expression of LC3. The LC3BII/LC3BI ratio was increased after MG132 treatment in both WT and KO MEFs. Interestingly, the activation of autophagy was significantly higher in KO MEFs than in WT MEFs ($P = 0.03$) (Supplementary Figure S1).

ROS impact CD146/WNT5A regulation in human cells

To assess whether these data were reproducible in human cells, we isolated human dermal fibroblasts from five patients with SSc (i.e., SSc-derived human dermal fibroblasts [HDFSs]) and five healthy controls (i.e., control-derived human dermal fibroblasts [HDFCs]). Patients with SSc presented different clinical presentations and autoimmune profiles to consider the disease heterogeneity (Supplementary Table S1). First, we observed significantly higher ROS production in HDFSs than in HDFCs, using two distinct methods (Figure 5a and Supplementary Figure S2). Second, we evaluated the expression of WNT5A and CD146 on both HDFSs and HDFCs at basal conditions or after bleomycin treatment. Of interest, WNT5A was initially significantly more expressed in HDFSs than in HDFCs (Figure 5b), whereas bleomycin treatment increased significantly WNT5A in HDFCs (Figure 5c). In accordance with previous data (Blasi et al., 2011), we did not detect CD146 expression on HDFCs (Figure 5d); however, HDFSs solely expressed this marker under basal conditions (Figure 5e). This expression of CD146 was confirmed on fibroblasts from different patients with SSc regardless of their clinical presentation or antibody profile (Supplementary Figure S3). Bleomycin treatment induced, to a similar extent to that of hydrogen peroxide, an upregulation in the surface expression of CD146 on HDFCs (Figure 5f), which suggests, at least in part, that the induction of CD146 is ROS dependent in healthy subjects. To confirm these results, the downregulation of CD146 by small interfering RNA was performed in HDFSs before submitting the cells to bleomycin treatment. As shown in Figure 5g and h, the increase in bleomycin-induced WNT5A expression was abrogated when CD146 was silenced on HDFSs, showing that CD146 regulates the augmentation of WNT5A expression after oxidative stress.

DISCUSSION

To date, the interaction between ROS and the Wnt signaling pathway has been established and defined in the literature; however, how adhesion molecules such as CD146 intervene and regulate the interplay between ROS and Wnt signaling still must be elucidated. In this study, we provided insight into the relationship between oxidative stress and Wnt signaling by showing that CD146 is an essential factor mediating the exchange between ROS and Wnt signaling, which to our knowledge, is previously unreported. We also show that CD146 intercedes under oxidative stress in SSc to enhance WNT5A expression and to inhibit the profibrotic Wnt canonical pathway (Figure 6).

A large body of evidence attributes the fibrotic events in SSc to exacerbated canonical Wnt signaling (Bergmann and Distler, 2016). In this study, we confirmed our previous findings by showing that KO mice developed more skin fibrosis than WT mice under oxidative stress in SSc. Although the increase in dermal thickness is associated with fibroblast differentiation into myofibroblasts, which secrete collagen in the extracellular matrix (Hinz, 2007), the dermal thickness increase can also be attributed to other factors, such as ROS, which activate profibrotic gene transcription and collagen synthesis. ROS also inhibit extracellular matrix degradation, participating in the dermal thickness increase and fibrosis (Thuan et al., 2018). In our model, we observed an increase in dermal thickness and collagen content, partly due to activation of myofibroblasts (as indicated by the correlation between α-smooth muscle actin and trichrome staining) and ROS production.

In addition, we showed a significant increase in WNT3a, WIF1, and β-catenin expression in KO but not in WT MEFs. The restoration of CD146 expression in KO MEFs transfected with a plasmid encoding human CD146 inhibited the expression of these procanonical proteins.

We showed in this study that CD146 negatively regulates canonical Wnt signaling preferentially by inhibiting β-catenin expression. Otherwise, because β-catenin is known to be a central mediator of profibrotic Wnt signaling in SSc, our results highlight the important role of CD146 in the regulation of fibrosis (Beyer et al., 2012). The inhibitory function of CD146 on β-catenin was previously reported by Ye et al. (2013). In addition, CD146 is a receptor for WNT5A, a major activator of noncanonical Wnt signaling. These results led us to assume that CD146 is a central regulator of the interrelated canonical and noncanonical Wnt signaling pathways and subsequently fibrosis.

The first finding of our study is that CD146 acts as a mediator linking ROS and the Wnt signaling pathway through WNT5A ligand. Using bleomycin as a ROS-inducing agent, we showed that both CD146 and the main Wnt noncanonical ligand, WNT5A, were highly upregulated only in the presence of CD146. However, because *Wnt5a* gene expression did not change at the transcriptional level after bleomycin treatment, we speculated that CD146 could protect WNT5A from degradation. In agreement with our hypothesis, we showed that cycloheximide multiple-chase experiments did not affect the upregulation of WNT5A expression in WT CD146 cells after bleomycin treatment. Moreover, after proteasome blockade, a significant diminution of WNT5A was observed in KO MEFs but not in WT MEFs, in which CD146 may protect WNT5A from the activation of other degradation pathways (Ding et al., 2007; Harhouri et al., 2017; Kato et al., 2014). Accordingly, an analysis of autophagy showed preferential activation in the absence of CD146, suggesting that CD146 could protect WNT5A from autophagic degradation.

The regulation of Wnt signaling by ROS was first proposed by Funato et al. (2006), who showed that DVL activates the Wnt/β-catenin pathway under oxidative conditions. Then, the crosstalk between ROS and Wnt/β-catenin signaling was further investigated in cancer diseases (Aceto et al., 2020). CD146 acts as a proinflammatory and proangiogenic factor in several types of cancers. SSc disease and cancers share a bundle of common pathological phenomena, as attested by epidemiological studies (Mellemkjaer et al., 2008; Rosenthal et al., 1995; Zeineddine et al., 2016). Similarly, genetic instabilities; environmental factors; and some signaling

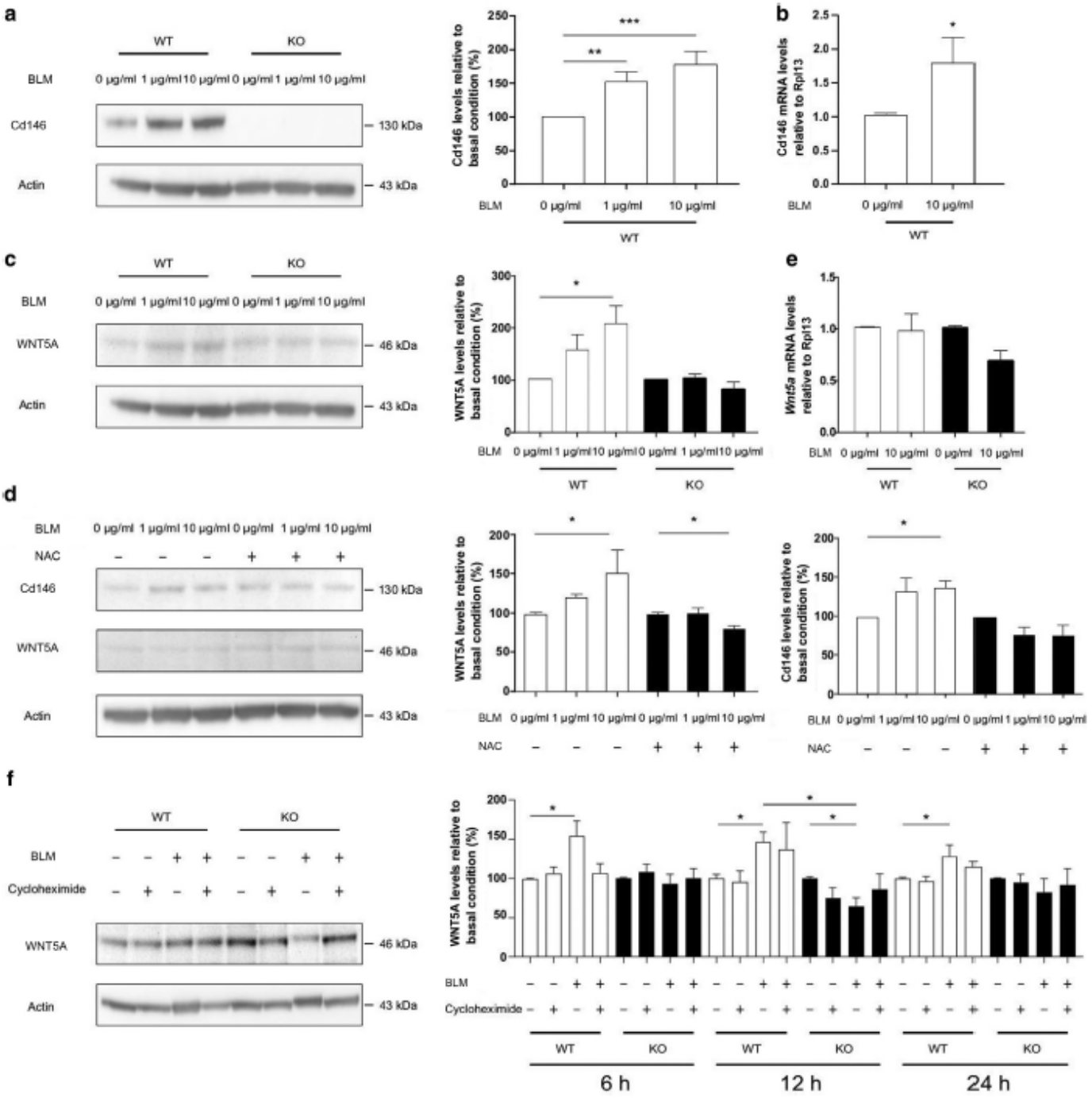


Figure 4. CD146 prevents WNT5A degradation under oxidative stress conditions. (**a**, **b**) WT and KO MEFs were treated with increasing concentrations of BLM, and the effect on (**a**) CD146 protein expression with a representative western blot (left) and the relative quantification (right) and mRNA was studied. (**c**) Representative western blot (left) and the relative quantification (right) of WNT5A protein expression after BLM treatment are shown. (**d**) Representative western blot analysis for the proteins CD146 and WNT5A after BLM treatment with or without NAC and the relative quantification are shown. (**e**) mRNA levels of *Wnt5a* after BLM treatment are shown. (**f**) WT and KO MEFs were treated with CHX and/or BLM for 6, 12, and 24 h, and the effect on WNT5A protein expression was studied. Relative quantification (right) and representative western blot at 12 h (left) are shown. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$. Data represent the mean ± SEM. All experiments were performed in triplicate. BLM, bleomycin; CHX, cycloheximide; h, hour; KO, knockout; MEF, mouse embryonic fibroblast; NAC, N-acetyl cysteine; WT, wild type.

pathways, such as Wnt, are behind the initiation of many cancers as well as autoimmune diseases, including SSc. Thus, our work reinforces the intriguing relationship between cancer and SSc by identifying CD146 as a principal regulator of Wnt/ROS crosstalk.

Although the susceptibility to autoimmune diseases is multifactorial, ROS are increased in many pathologies, especially in SSc (Doridot et al., 2019; Smallwood et al., 2018). In this study, we found higher levels of ROS in patients with HDFS than in those with HDFC. These results are in agreement with previous data showing increased endogenous oxidative stress in patients with SSc (Sambo et al., 2001). The authors evidenced oxidative stress as an early marker in disease pathogenesis, with higher ROS

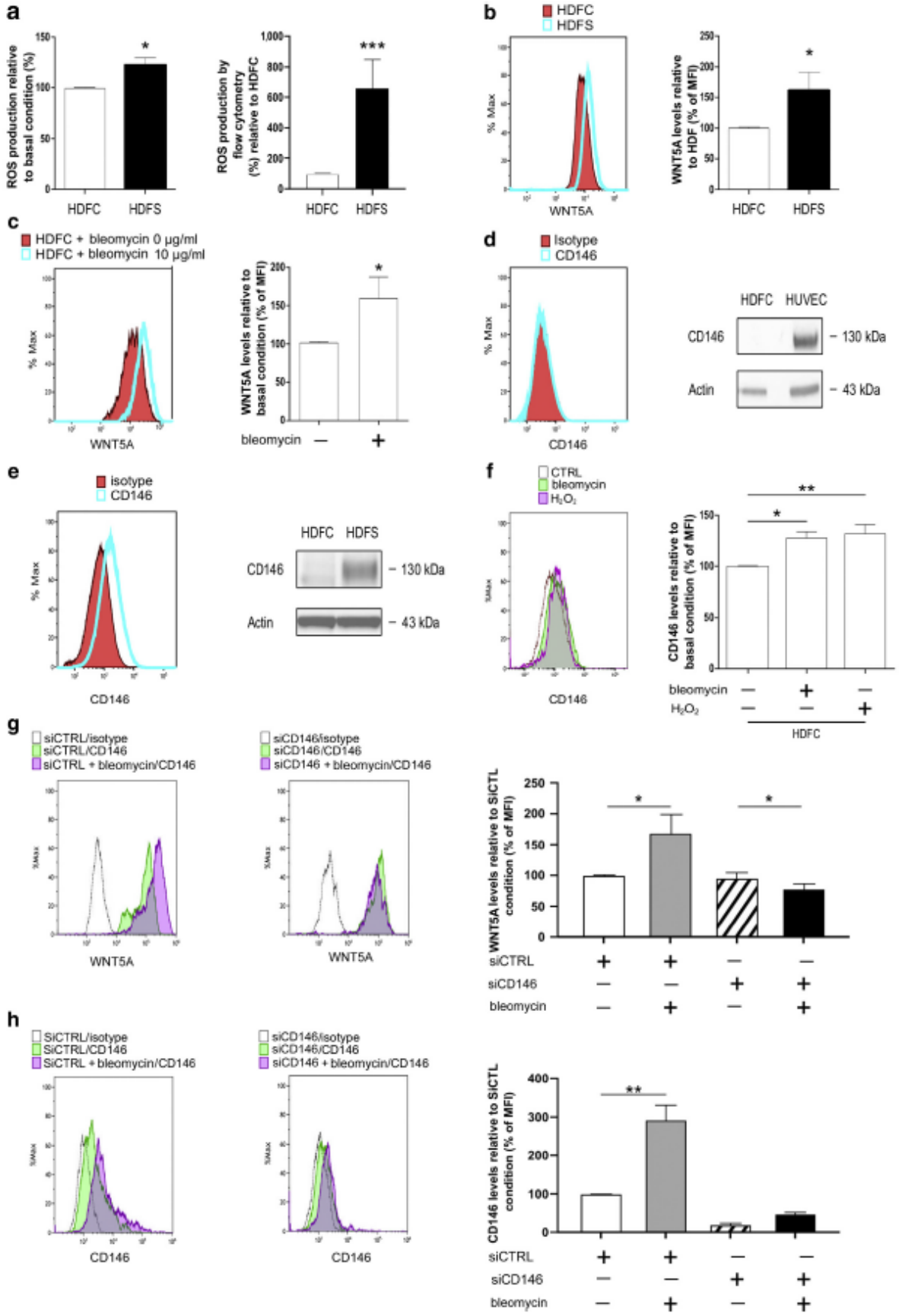


Figure 5. ROS in human fibroblasts enhance WNT5A and CD146 expression. (**a**) HDFCs and HDFSs were serum starved for 6 h, and the generated ROS were evaluated by cytofluorimetry (left) or flow cytometry (right). (**b, c**) Flow cytometry analysis of WNT5A surface expression and the corresponding quantification of the MFI on both HDFCs and HDFSs at (**b**) basal conditions or (**c**) after 48 h of bleomycin treatment (10 µg/ml). (**d, e**) CD146 expression levels on both (**d**) HDFCs and (**e**) HDFSs were assessed by flow cytometry and western blot. (**f**) Flow cytometry analysis of CD146 surface expression on HDFCs after bleomycin (10 µg/ml)

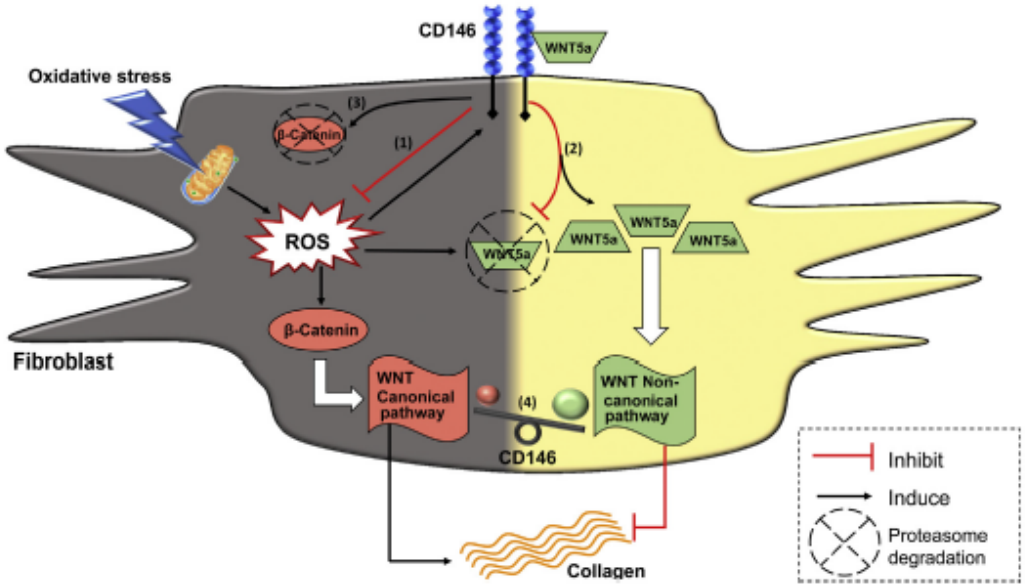


Figure 6. Illustrative summary of events occurring in an oxidative stress environment. In response to oxidative stress, ROS are released from the mitochondria and subsequently activate *CD146* gene transcription, which enhances CD146 surface expression. The interaction between CD146 and its ligand, WNT5A, inhibits ROS secretion (1), protects the WNT5a intracellular pool from degradation (2), and favors the noncanonical Wnt pathway while inhibiting the canonical pathway through selective induction of β-catenin degradation (3). This homeostatic balance between the canonical and noncanonical Wnt pathways, as mediated by CD146 (4), attenuates collagen synthesis and deposition in the extracellular matrix, thereby impeding SSc disease progression. The decrease in β-catenin availability and therefore canonical Wnt signaling has been associated with decreased chronic inflammation, autoimmune diseases, and fibrotic events. SSc, systemic sclerosis.

levels detected in fibroblasts extracted from the skin of patients with SSc than from the skin of control individuals, suggesting that ROS are the main drivers of disease progression.

Furthermore, we validated by western blot and flow cytometry that CD146 is uniquely expressed on HDFSs and not on HDFCs. The expression of CD146 was confirmed on fibroblasts of all patients with SSc independent of their clinical symptoms and autoantibodies profile. In addition, after bleomycin treatment of HDFCs, we induced CD146 expression. We then hypothesized that ROS-induced CD146 expression acts as a feedback regulator on the functional consequences of ROS signaling.

In conclusion, our study evidences the existence of an interplay between ROS and Wnt signaling orchestrated by CD146 in the pathological processes of SSc and opens up a new field of study in autoimmune diseases. These findings add to our understanding of pathological mechanisms in the field of autoimmune diseases and provide potential therapeutic targets and strategies.

MATERIALS AND METHODS

Detailed materials and methods are described in Supplementary Materials and Methods.

MEFs culture

MEFs were isolated from day 13.5 embryos from KO mice or WT mice as previously described (Xu, 2005).

Human dermal fibroblasts culture

The culture of fibroblasts was established from five patients with SSc (i.e., HDFSs) and from controls (i.e., HDFCs) using explant cultures from skin biopsies obtained during surgery. Written informed consent was obtained from patients with SSc in the context of Scleradec II clinical trial: ClinicalTrials.gov NCT02558543 authorized by the Comité de protection des personnes Sud méditerranée V (2014-003023-22). Dermal fibroblasts from healthy donors were obtained from surgical residues of skin for cosmetic purposes. All healthy donors provided written informed nonobjection for the scientific use of surgical residues.

Measurement of ROS

ROS production in MEFs and human dermal fibroblasts was measured by cytofluorimetry or flow cytometry with carboxy-2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Histological analysis and immunostaining of murine skin biopsy

We performed the immunostaining and immunochemistry in the skin section using 8-oxo-2′-deoxyguanosine with avidin-biotin-

or H_2O_2 (200 μM) treatment and the corresponding quantification of the MFI. (**g**, **h**) Flow cytometry analysis of (**g**) WNT5A and (**h**) CD146 expression after transfection with siCTRL or siCD146 (left) and the corresponding quantification of the MFI (right) on HDFSs 48 h after bleomycin (10 μg/ml). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$. Data represent the mean ± SEM for a minimum of three independent experiments on two batches of skin fibroblasts. CTRL, control; h, hour; H_2O_2, hydrogen peroxide; HDF, human donor fibroblast; HDFC, control-derived human donor fibroblast; HDFS, systemic sclerosis–derived human dermal fibroblast; HUVEC, human vein endothelial cell; Max, maximum; MFI, median fluorescence intensity; siCD146, CD146-targeted small interfering RNA; siCTRL, control-targeted small interfering RNA; siRNA, small interfering RNA.

peroxidase complex (Life Technologies, Carlsbad, CA) for 8-oxo-2′-deoxyguanosine and on Ventana Benchmark system for α-smooth muscle actin and Masson's trichrome.

Western blotting

Western blotting of whole-cell lysate extracts was performed to evaluate protein expression. Lysis buffer and primary antibodies are listed in the Supplementary Materials and Methods.

RT-qPCR

Total RNA was isolated and subjected to real-time RT-qPCR using the probes obtained from Thermo Fisher Scientific.

MEFs transfection

Briefly, cells were transiently transfected using jetPRIME transfection agent (Polyplus transfection, Illkirch-Graffenstaden, France) according to the manufacturer's instruction.

Cycloheximide chase analysis

Protein biosynthesis was inhibited by adding cycloheximide (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) to the culture media simultaneously with or without bleomycin.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA). Significant differences were determined using the nonparametric Mann–Whitney U test. When comparing more than two groups, a nonparametric one-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test was used. A $P < 0.05$ was considered to be significant.

Data availability statement

No datasets were generated or analyzed during this study. All the data that support the findings of our study are available from the corresponding author on request.

ORCIDs

Xavier Heim: http://orcid.org/0000-0002-9459-4318
Julien Bermudez: http://orcid.org/0000-0001-8823-0959
Ahmad Joshkon: http://orcid.org/0000-0003-2124-1914
Elise Kaspi: http://orcid.org/0000-0003-0458-5109
Richard Bachelier: http://orcid.org/0000-0002-0236-2633
Marie Nollet: http://orcid.org/0000-0002-9667-8216
Mélanie Velier: http://orcid.org/0000-0002-1121-8270
Laetitia Dou: http://orcid.org/0000-0002-4594-4676
Alexandre Brodovitch: http://orcid.org/0000-0001-7770-0759
Alexandrine Foucault-Bertaud: http://orcid.org/0000-0001-8079-1225
Aurelie S. Leroyer: http://orcid.org/0000-0002-8079-7122
Audrey Benyamine: http://orcid.org/0000-0003-4187-3425
Aurélie Daumas: http://orcid.org/0000-0002-6576-3274
Brigitte Granel: http://orcid.org/0000-0001-7995-8817
Florence Sabatier: http://orcid.org/0000-0002-5702-3815
Françoise Dignat-George: http://orcid.org/0000-0001-7006-4462
Marcel Blot-Chabaud: http://orcid.org/0000-0003-0152-3893
Nathalie Bardin: http://orcid.org/0000-0003-3680-082X

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank BioCytex (Marseille, France) for providing recombinant soluble CD146 and S-Endo-1 antibodies and Stephanie Simoncini, Karim Harhouri, Lucile Tuchtan-Torrents, and Marie-Dominique Piercecchi-Marti for their help and support. The work was done in Marseille, France. Aix-Marseille University, INSERM, INRAE, and GFRS (Groupe Francophone de Recherche sur la Sclérodermie) were funders of the study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: XH, JB, RB, AFB, ASL, MBC, NB; Data Curation: XH, JB, AJ, EK, RB, MN, MV, LD, ASL, ABe, AD, AFB, ASL, BG; Formal Analysis: XH, JB, ABr, AJ, EK, NB; Funding Acquisition: FDG, MBC, NB; Investigation: XH, JB, AJ, EK, RB, MN, MV, LD, ABr, ASL, ABe, AD, AFB, ASL, BG; Methodology: XH, JB, AJ, ABr, ASL, AFB, LD, AD, NB, MBC; Project Administration: XH, JB, NB, MBC; Resources: RB, MV, ASL, AD, FS, BG, MBC, NB; Supervision: MBC, NB; Validation: XH, NB; Visualization: XH, JB, AJ, EK, ABr, NB; Writing - Original Draft Preparation: XH, AJ, RB, MBC, NB; Writing - Review and Editing: XH, JB, AJ, EK, RB, MN, MV, LD, ABr, AFB, ASL, ABe, AD, BG, FS, FDG, MBC, NB

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.jidonline.org, and at https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.03.038.

REFERENCES

Aceto GM, Catalano T, Curia MC. Molecular aspects of colorectal adenomas: the interplay among microenvironment, oxidative stress, and predisposition. Biomed Res Int 2020;2020:1726309.

Andersson-Sjöland A, Karlsson JC, Rydell-Törmänen K. ROS-induced endothelial stress contributes to pulmonary fibrosis through pericytes and Wnt signaling. Lab Invest 2016;96:206–17.

Bardin N, Anfosso F, Massé JM, Cramer E, Sabatier F, Le Bivic A, et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. Blood 2001;98:3677–84.

Bergmann C, Distler JHW. Canonical Wnt signaling in systemic sclerosis. Lab Invest 2016;96:151–5.

Beyer C, Schramm A, Akhmetshina A, Dees C, Kireva T, Gelse K, et al. β-catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2012;71:761–7.

Blasi A, Martino C, Balducci L, Saldarelli M, Soleti A, Navone SE, et al. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. Vasc Cell 2011;3:5.

Boneberg EM, Illges H, Legler DF, Fürstenberger G. Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process. Microvasc Res 2009;78:325–31.

Dagur PK, Biancotto A, Wei L, Sen HN, Yao M, Strober W, et al. MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. J Autoimmun 2011;37:319–27.

Dees C, Schlottmann I, Funke R, Distler A, Palumbo-Zerr K, Zerr P, et al. The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2014;73:1232–9.

Ding W-X, Ni H-M, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. Am J Pathol 2007;171:513–24.

Doridot L, Jeljeli M, Chêne C, Batteux F. Implication of oxidative stress in the pathogenesis of systemic sclerosis via inflammation, autoimmunity and fibrosis. Redox Biol 2019;25:101122.

Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. J Thromb Haemost 2007;5:1302–8.

Fels DR, Ye J, Segan AT, Kridel SJ, Spiotto M, Olson M, et al. Preferential cytotoxicity of bortezomib toward hypoxic tumor cells via overactivation of endoplasmic reticulum stress pathways. Cancer Res 2008;68:9323–30.

Funato Y, Michiue T, Asashima M, Miki H. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled. Nat Cell Biol 2006;8:501–8.

Gabsi A, Heim X, Dlala A, Gati A, Sakhri H, Abidi A, et al. TH17 cells expressing CD146 are significantly increased in patients with Systemic sclerosis. Sci Rep 2019;9:17721.

Harhouri K, Kebir A, Guillet B, Foucault-Bertaud A, Voytenko S, Piercecchi-Marti MD, et al. Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia. Blood 2010;115:3843–51.

Harhouri K, Navarro C, Depetris D, Mattei MG, Nissan X, Cau P, et al. MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. EMBO Mol Med 2017;9:1294–313.

Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol 2007;127:526–37.

Ito T, Tamura N, Okuda S, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, et al. Elevated serum levels of soluble CD146 in patients with systemic sclerosis. Clin Rheumatol 2017;36:119–24.

Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. Blood 2012;120:2330–9.

Kaspi E, Heim X, Granel B, Guillet B, Stalin J, Nollet M, et al. Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis. J Allergy Clin Immunol 2017;140:1448–51.e6.

Kato M, Ospelt C, Gay RE, Gay S, Klein K. Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Rheumatol 2014;66:40–8.

Mellemkjaer L, Pfeiffer RM, Engels EA, Gridley G, Wheeler W, Hemminki K, et al. Autoimmune disease in individuals and close family members and susceptibility to non-Hodgkin's lymphoma. Arthritis Rheum 2008;58:657–66.

Mostmans Y, Cutolo M, Giddelo C, Decuman S, Melsens K, Declercq H, et al. The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: a systematic review. Autoimmun Rev 2017;16:774–86.

Rosenthal AK, McLaughlin JK, Gridley G, Nyrén O. Incidence of cancer among patients with systemic sclerosis. Cancer 1995;76:910–4.

Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, et al. Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. Arthritis Rheum 2001;44:2653–64.

Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. J Immunol 2009;182:5855–64.

Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. Free Radic Biol Med 2018;125:3–14.

Svegliati S, Marrone G, Pezone A, Spadoni T, Grieco A, Moroncini G, et al. Oxidative DNA damage induces the ATM-mediated transcriptional suppression of the Wnt inhibitor WIF-1 in systemic sclerosis and fibrosis. Sci Signal 2014;7:ra84.

Thuan DTB, Zayed H, Eid AH, Abou-Saleh H, Nasrallah GK, Mangoni AA, et al. A potential link between oxidative stress and endothelial-to-mesenchymal transition in systemic sclerosis. Front Immunol 2018;9:1985.

Wei J, Fang F, Lam AP, Sargent JL, Hamburg E, Hinchcliff ME, et al. Wnt/β-catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells. Arthritis Rheum 2012;64:2734–45.

Xu J. Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. Curr. Protoc. Mol. Biol. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.

Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, et al. Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma. PLoS One 2012;7:e41994.

Ye Z, Zhang C, Tu T, Sun M, Liu D, Lu D, et al. Wnt5a uses CD146 as a receptor to regulate cell motility and convergent extension. Nat Commun 2013;4:2803.

Yu Y, Guan X, Nie L, Liu Y, He T, Xiong J, et al. DNA hypermethylation of sFRP5 contributes to indoxyl sulfate-induced renal fibrosis. J Mol Med (Berl) 2017;95:601–13.

Zeineddine N, Khoury LE, Mosak J. Systemic sclerosis and malignancy: a review of current data. J Clin Med Res 2016;8:625–32.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Human dermal fibroblasts culture

The culture of fibroblasts was established from five patients with systemic sclerosis (i.e., systemic sclerosis–derived human dermal fibroblast) and from controls (i.e., control-derived human donor fibroblast). The skin biopsies were obtained as surgical waste during a surgical operation, and nonopposition with informed consent was obtained from the patients according to the Helsinki rules. Tissues were rinsed with DMEM (Gibco, Paisley, United Kingdom) containing 400 IU/ml penicillin, 400 μg/ml streptomycin, and 4 μg/ml amphotericin B and cut into small pieces. Explants were deposited in a 25 cm two-culture flask and incubated in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide in DMEM supplemented with 20% fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 2 μg/ml amphotericin B. In these conditions, fibroblasts leave the explant in 3–5 days and settle at the entire flask surface in 3 weeks. Fibroblasts were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), 100 μg/ml streptomycin, and 100 IU/ml penicillin.

Mouse embryonic fibroblasts culture

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were isolated from day 13.5 embryos from *Cd146* knockout (KO) mice or wild-type (WT) mice as previously described (Xu, 2005). Briefly, the placental membrane, amniotic sac, head, and primordial blood organs were removed, and the remaining carcass was rinsed with PBS and minced in 2 ml PBS. The tissue fragments were passed through a 100 mm strainer to remove large fragments and placed in a 25 cm^2 flask containing DMEM (Gibco), 10% (v/v) fetal calf serum (Gibco), 50 units/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin. At this and subsequent stages of culture, cells were maintained in 5% oxygen. At confluence, the cells were transferred to a 75 cm^2 flask.

Measurement of ROS

For measurement of ROS production by cytofluorimetry, MEFs and human dermal fibroblasts were seeded in 96-well plates at 15,000 cells per well. The next day, fibroblasts were labeled for 45 minutes with 10 μM of di(acetoxymethylester)6-carboxy-2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate. Cells were washed with PBS and treated with bleomycin at 0, 1, and 10 μg/ml in DMEM medium without phenol red. Fluorescence intensity was measured every 1 hour during a 6-hour period. In some experiments, MEFs were incubated with indoxyl sulfate as a positive control (Dou et al., 2007) or in the presence of antioxidant N-acetylcysteine (10 mM). The production of intracellular ROS was detected by measuring the fluorescence of di(acetoxymethylester)6-carboxy-2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate on a Glomax plate reader (Promega, Madison, WI). The fluorescence intensity reflecting ROS production was normalized as expressed in arbitrary units.

For measurement of ROS production by flow cytometry, human dermal fibroblasts were seeded on a 24-well plate. The next day, fibroblasts were labeled for 45 minutes with 2 μM of di(acetoxymethylester)6-carboxy-2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate. Cells were washed with PBS and incubated for 6 hours in basal medium and harvested. Unlabeled cells were used as negative controls to adjust the positivity of the cells in each experiment. Cell fluorescence was analyzed with a flow cytometer (BD FACSCanto II, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) in the channel FL1.

Animal model of systemic sclerosis

Mice were the same as previously described (Kaspi et al., 2017). As a reminder, *Cd146*-KO mice (Jouve et al., 2015) aged between 11 and 18 weeks were treated with subcutaneous bleomycin and were compared with WT littermates of the same age and sex. Skin fibrosis was induced, according to a protocol modified by Ould-Ali et al. (2013), by local subcutaneous injections of 100 μl of bleomycin dissolved in 0.9% sodium chloride at a concentration of 10 μg/ml (Yamamoto and Nishioka, 2005) every other day for 28 days. Bleomycin was injected in defined areas on the right upper back of *Cd146*-KO and WT mice. Vehicle (sodium chloride) was injected in defined areas on the left upper back of *Cd146*-KO and WT mice and was used as controls for the bleomycin experiment. On day 28, mice were killed, and the skin was fixed in 4% formalin and then embedded in paraffin. The protocol received approval from the committee of Aix Marseille University for Animal Care and Use, and experiments were performed in an authorized laboratory and under the supervision of an authorized researcher (GUILLET 13-328).

Histological analysis and immunostaining of murine skin biopsy

Tissues were fixed in 4% formalin and embedded into paraffin. Several 5-μm sections were stained with Masson's trichrome or were used for immunohistochemistry. Masson's trichrome staining was performed on four WT mice versus five *Cd146*-KO mice. Dermal thickness was quantitatively evaluated using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) (six measurements per section). Manual immunohistochemistry was performed with avidin-biotin-peroxidase complex (Life Technologies, Carlsbad, CA) using the anti–8-oxo-2′-deoxyguanosine antibody (sc-66036) diluted by 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) on skin biopsy on seven WT versus seven *Cd146*-KO mice after vehicle or bleomycin injection.

The percentage of positive nuclei/cells was manually evaluated. Blind counts were performed by two distinct operators. Nuclei were counted on 100 cells on two different locations of each section. For each condition, seven sections were counted.

Automatic immunohistochemistry was performed on Ventana Benchmark system using the anti–α-smooth muscle actin antibody from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) (MS-113-R7, ready to use) on skin biopsy from three WT and four KO mice after vehicle or bleomycin injection. Automatic quantification of immunostaining intensity was performed using ImageJ software. In detail, RGB (red, green, blue) images were converted to 8 bits 256 levels, a mask was applied on pictures to select only concerned tissue, and the mean intensity was measured after background subtraction. For each section, four areas were analyzed in the derm.

Western blot experiments

Experiments were performed as previously described (Harhouri et al., 2010). Cells were lysed in 150 µl of non-denaturing lysis buffer (containing 10 mM Tris, pH 8; 1 mM EDTA, pH8; 150 mM sodium chloride; and 1% NP40) to which we added protease and phosphatase inhibitors (numbers 88665 and 88667, Thermo Fisher Scientific), which we recovered and placed in tubes. After 10 minutes in the ice, samples were centrifuged for 10 minutes at 10,000*g* at a temperature of 4 °C. Finally, we recovered the supernatant containing the proteins of cell lysates. Protein concentration was evaluated with a Pierce BCA Protein Assay Kit (number 23225, Thermo Fisher Scientific). Membranes were probed with specific primary antibodies: anti-WNT3A (ab28472), anti-WIF1 (ab186845), and anti-CD146 (ab75769) diluted 1:1,000 (Abcam, Cambridge, United Kingdom); anti–β-catenin (number 9562), anti–beta-actin (number 8457), and anti-LC3B (number 2775) diluted at 1:1,000, 1:5,000, and 1:1,000, respectively (Cell Signaling Technology, Danvers, MA); anti-WNT5A (sc-365370) diluted at 1:200 (Santa Cruz Biotechnology); antimonoubiquitinylated and polyubiquitinylated diluted 1:1,000 (FK2 clone, Enzo Biochem, Farmingdale, NY); and anti-LC3A/LC3B (number PA5-109226) diluted 1:1,000 (Thermo Fisher Scientific), followed by hybridization (incubation) with secondary antibodies coupled to peroxidase. Blots were revealed with ECL substrate (Pierce). Quantifications of band intensities on immunoblots were performed with GeneTools GBox-ImageQuant software (Syngene International, Bangalore, India) and normalized by actin intensity.

Western blot analysis was performed as described earlier with a mouse antimonoubiquitinylated and polyubiquitinylated conjugates mAb (FK2, used at 1:1,000 for the western blot analyses, Enzo Biochem).

Flow cytometry analysis

Human fibroblasts were incubated for 48 hours in basal medium ± 10 µg/ml bleomycin or 200 µM hydrogen peroxide, harvested, fixed with 2% paraformaldehyde, and labeled in permeabilization buffer with either anti-CD146 antibody coupled with phycoerythrin or with anti-WNT5A antibody, followed by incubation with a secondary antibody coupled with Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific). Cell fluorescence was analyzed with a flow cytometer (BD FACSCanto II, BD Biosciences).

RT-qPCR

Total RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A total of 1 µg of total RNA was used for reverse transcription to cDNA using a high-capacity cDNA synthesis kit (Archive, Applied Biosystems, Foster, CA). Real-time PCR amplification was performed using an RT2 Profiler PCR array specific for Wnt signaling pathway components (number 330231 PAMM-043ZA, Qiagen) or Taqman Fast Advanced Master Mix predesigned primers (CD146: mm00522397_m1, WNT5A: mm00437347_m1, RPL13: mm02526700-g1; Applied Biosystems) for bleomycin-induced WNT5A and CD146 expression on a StepOne Plus thermocycler Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The cycling conditions were as follows: 2 minutes at 50 °C, 2 minutes at 95 °C, 40 cycles of 1 second at 95 °C, and 20 seconds at 60 °C. Relative gene expression levels were normalized to that of *Rpl13* or *Gapdh* and quantified using the ΔΔCT method.

MEFs transfection

Briefly, cells were transiently transfected with a plasmid coding for CD146 long isoform (PND28), small interfering RNA inhibiting CD146 (HSS106379, Thermo Fisher Scientific), or control-targeted small interfering RNA (number 6568, Cell Signaling Technology) using jetPRIME transfection agent (Polyplus transfection, Illkirch-Graffenstaden, France) according to the manufacturer's instructions.

Cycloheximide chase analysis

Protein biosynthesis was inhibited by adding 20 µg/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) to the medium of the MEF for 6, 12, and 24 hours. Cells were treated simultaneously with bleomycin (0, 10 µg/ml) for the same time. Then cells were rinsed and lysed for western blot analysis.

Inhibition of proteasome and activation of autophagy

MEFs from WT and KO mice were cultured in a culture medium containing MG132 (number 474790, Millipore-eSigma, Burlington, MA) at a final concentration of 5 µM or with 10 µg/ml bleomycin for 24 hours. Then, cells were rinsed and lysed for western blot analysis.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. J Thromb Haemost 2007;5:1302–8.

Harhouri K, Kebir A, Guillet B, Foucault-Bertaud A, Voytenko S, Piercecchi-Marti MD, et al. Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia. Blood 2010;115:3843–51.

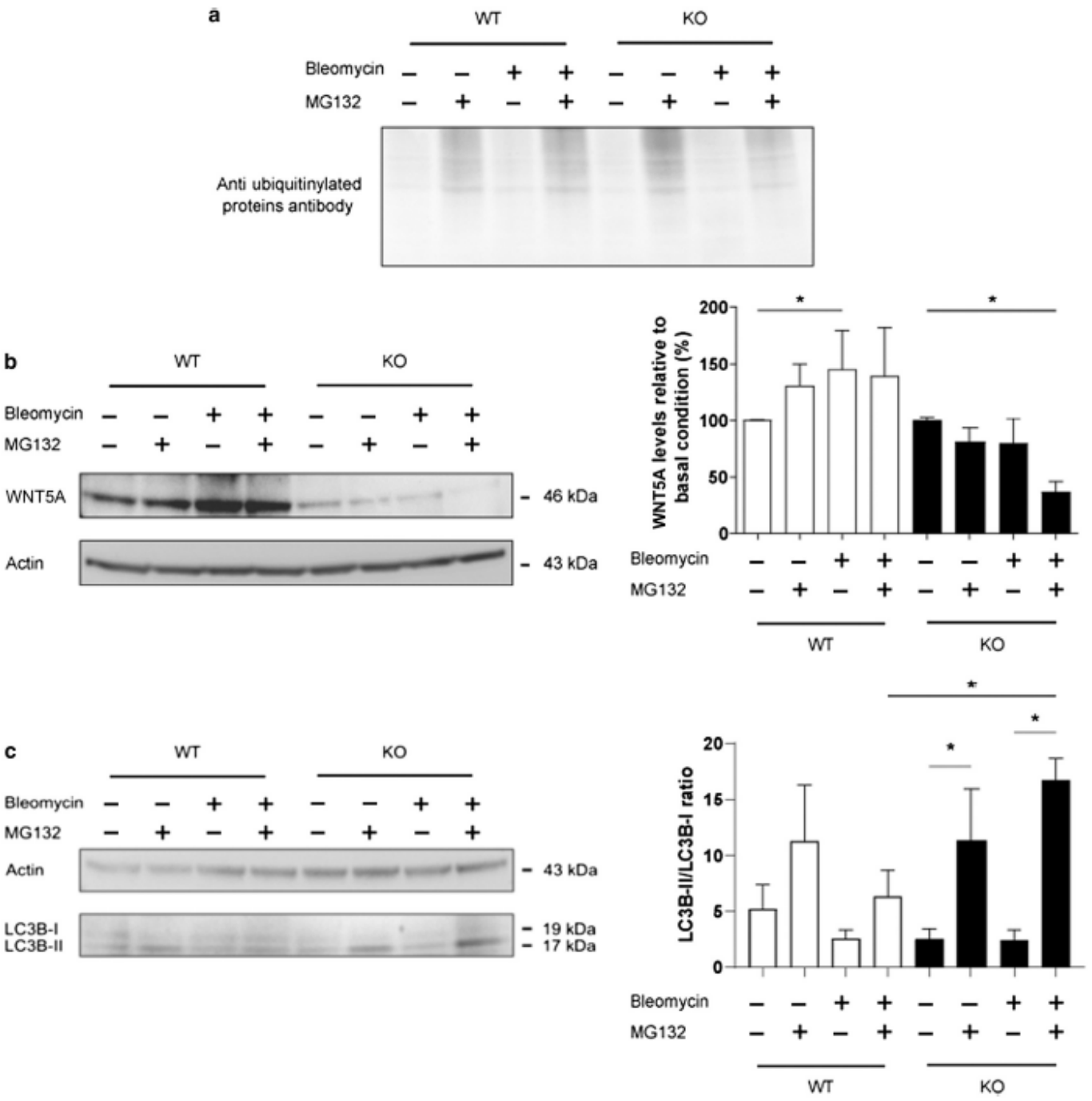
Jouve N, Bachelier R, Despoix N, Blin MG, Matinzadeh MK, Poitevin S, et al. CD146 mediates VEGF-induced melanoma cell extravasation through FAK activation: Host CD146 mediates melanoma metastasis. Int J Cancer 2015;137:50–60.

Kaspi E, Heim X, Granel B, Guillet B, Stalin J, Nollet M, et al. Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis. J Allergy Clin Immunol 2017;140:1448–51.e6.

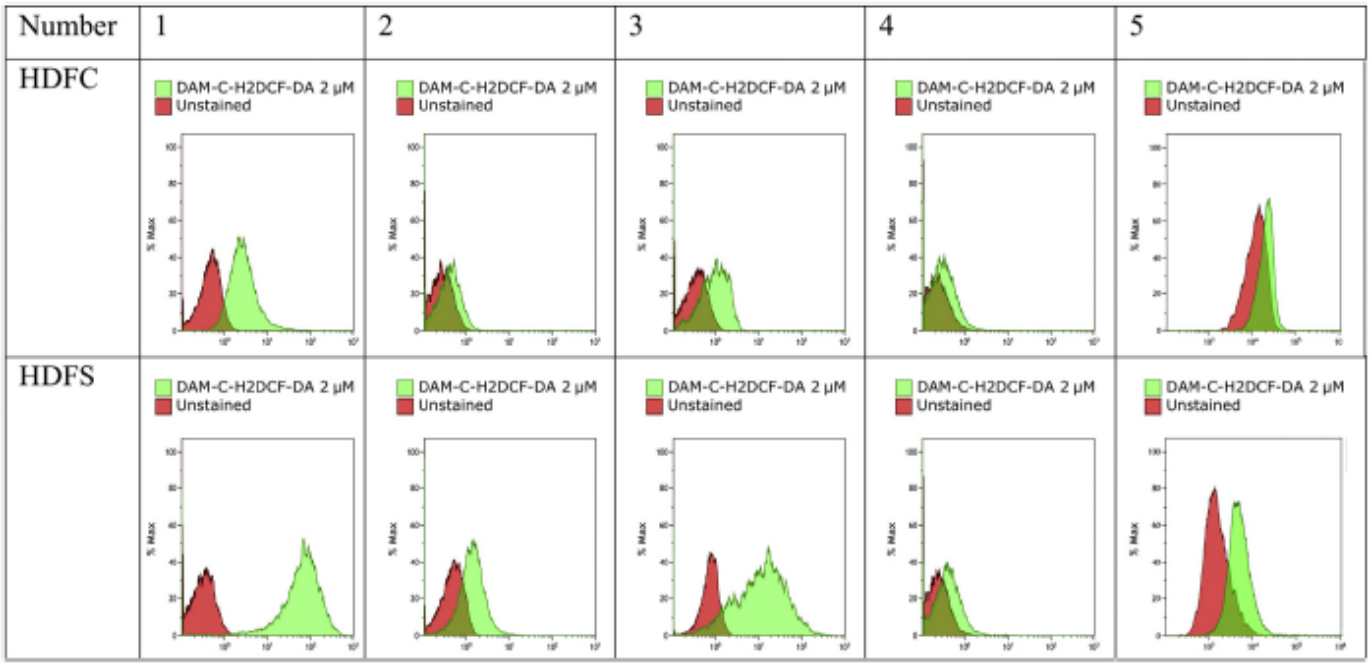
Ould-Ali D. Bleomycin-induced Scleroderma in Nude mice can be reversed by injection of adipose tissue: evidence for a novel therapeutic intervention in systemic sclerosis. J Clin Exp Dermatol Res 2013. https://doi.org/10.4172/2155-9554.1000164.

Xu J. Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. Curr. Protoc. Mol. Biol. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005 [cited 2020 May 19]. p. mb2801s70.

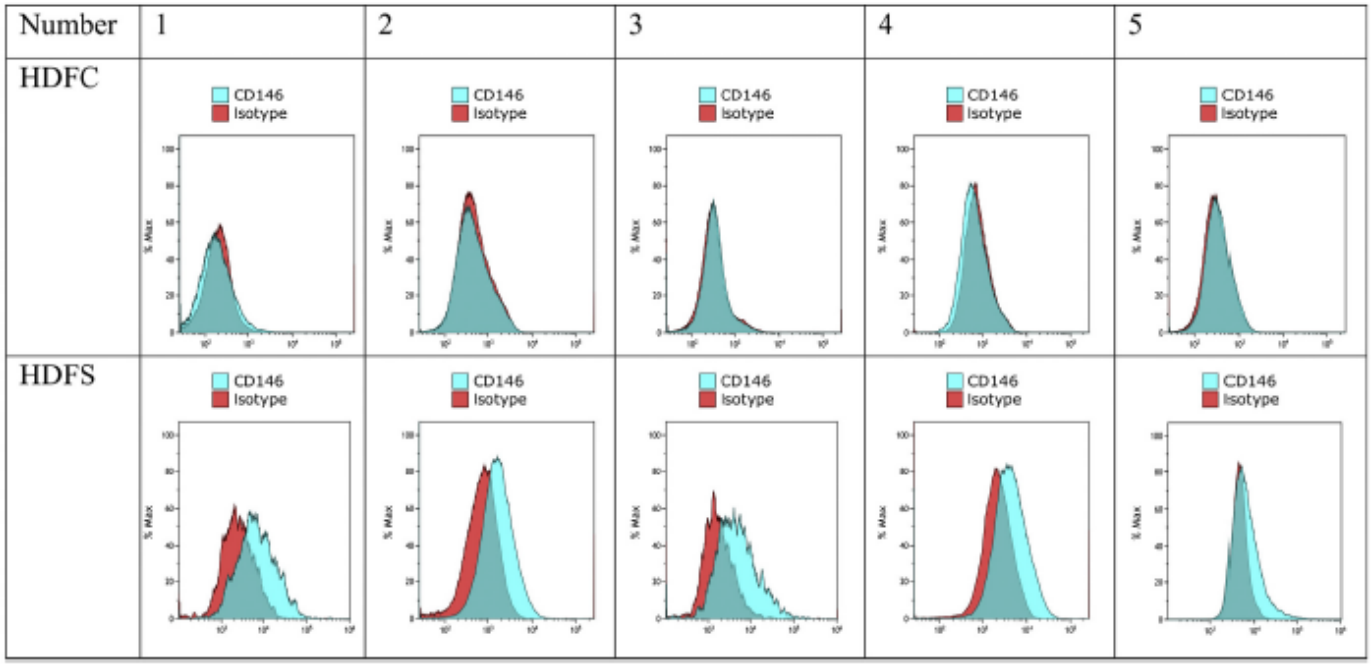
Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. Exp Dermatol 2005;14:81–95.



Supplementary Figure S1. Proteasome blockade increases WNT5A degradation by autophagy. WT and KO MEFs were treated with the proteasome inhibitor MG132 (5 μM) and/or bleomycin (10 μg/ml) for 24 hours. (**a**) Protein ubiquitination was observed by western blot. (**b, c**) WNT5A and LC3B protein expression were studied by western blot. Representative western blot (left) and relative quantification (right) are shown. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$. Data represent the mean ± SEM. All experiments were performed in triplicate. KO, knockout; MEF, mouse embryonic fibroblast; WT, wild type.



Supplementary Figure S2. Fibroblasts from patients with SSc display more ROS than fibroblasts from healthy donors. HDFC and HDFS were serum starved for 6 hours, and the generated ROS were evaluated by flow cytometry. Each column corresponds to a different batch. DAM-C-H2DCF-DA, di(acetoxymethylester)6-carboxy-2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate; HDFC, control-derived human donor fibroblast; HDFS, systemic sclerosis–derived human dermal fibroblast; Max, maximum; SSc, systemic sclerosis.



Supplementary Figure S3. Fibroblasts from patients with SSc express CD146, whereas fibroblasts from healthy donors do not express CD146. The expression level of CD146 on human dermal fibroblasts from healthy donors and donors with SSc was assessed by flow cytometry. Each column corresponds to a different batch. HDFC, control-derived human donor fibroblast; HDFS, systemic sclerosis–derived human dermal fibroblast; Max, maximum; SSc, systemic sclerosis.

Supplementary Table S1. Clinical and Biological Data of Patients with SSc from Whom Fibroblasts Were Collected

Patient	Sex	Age at Diagnosis	Cutaneous Form	Ulcere	Renal Crisis	Interstitial Lung Disease	Pulmonary Hypertension	Antinuclear Autoantibody	Specificity
1	F	53	Limited	Yes	No	Yes	Yes	>1,280	RNA polymerase III
2	F	47	Diffuse	No	No	No	No	>1,280	No specificity
3	F	36	Diffuse	Yes	No	No	No	>1,280	Topoisomerase I
4	F	56	Limited	No	No	No	No	>1,280	Centromer
5	F	53	Limited	No	No	Yes	Yes	>1,280	Topoisomerase I

Abbreviations: F, female; SSc, systemic sclerosis.

19 Partie III : auto-anticorps anti-CD146

Habituellement absent des fibroblastes cutanés humains, nous avons montré une néo-expression de CD146 sur les fibroblastes cutanés dans la SSc. Le stress oxydatif joue un joue un rôle important dans la physiopathologie de la SSc par exemple, l'oxydation de l'ADN topoisomérase I autoantigène induit une rupture de tolérance et la production d'anticorps anti-topoisomérase I chez la souris favorisant la prolifération fibroblastique et l'apparition de fibrose (382). Le stress oxydatif favoriserait aussi la différenciation des lymphocytes Th17, comme le suggère la diminution des cellules Th17 observée suite à un traitement avec un antioxydant chez des souris (383). L'oxydation des lipides, protéines et acides nucléiques provoquent des dommages cellulaires et l'apparition de néo-antigènes induisant de l'apparition de phénomènes auto-immuns (384). En raison de la néo-expression de CD146 dans la SSc et sa modulation par le stress oxydatif, nous avons posé l'hypothèse que les ROS pouvaient conduire à l'apparition d'une réaction auto-immune dirigée contre CD146.

Dans cette optique, nous avons constitué une cohorte de patients atteints de SSc en collaboration avec les services de médecine interne de l'APHM à partir d'une biobanque déclarée (DC 2012 − 1704) conformément aux directives éthiques françaises et agréée par le comité d'éthique de l'APHM.

Nous avons aussi mis au point un test ELISA maison pour détecter la présence d'auto-anticorps dirigés contre CD146 (Brevet n°WO2012098256A1). Chez ces patients, nous avons aussi dosé les concentrations de CD146s, recherché la présence d'auto-anticorps de la SSc et recueilli leurs autres données cliniques. L'objectif était de déterminer non seulement la prévalence de ces auto-anticorps chez les patients SSc, mais également d'examiner leur corrélation avec divers paramètres cliniques et biologiques, tels que la sévérité des manifestations cutanées et des autres organes et les concentrations de CD146s.

Nos résultats montrent l'existence des auto-anticorps anti-CD146 technique ELISA que nous confirmons par Western-blot. L'analyse des données montre une prévalence de 15 % dans la population SSc contre 5% dans une population de témoins sains. Les autres données analysées ne montrent aucune corrélation entre les signes cliniques, les dosages biologiques et la présence des auto-anticorps anti-CD146.

De façon intéressante nous observons que 80% des patients (n=4/5) patients exposés dans le cadre de leur profession à la silice avaient des auto-anticorps anti-CD146. Afin de confirmer nos résultats, nous avons testé une autre population de 23 patients présentant une exposition

professionnelle à la silice ou à l'amiante en dehors du contexte de SSc en collaboration avec l'équipe co-dirigée par le professeur Lecureur de l'Institut de recherche en santé, environnement et travail à Rennes. Nous avons trouvé que plus de 50% des patients exposés présentaient des auto-anticorps anti-CD146 par rapport à des sujets contrôles non exposés ($p = 0,03$).

L'ensemble de nos résultats (article en cours de soumission) nous a conduits à émettre l'hypothèse d'une réponse auto-immune contre CD146 à la suite d'une exposition à la silice. Ainsi les auto-anticorps anti-CD146 représenteraient des biomarqueurs d'effet précoce d'exposition à la silice lors de l'exposition professionnelle. Le développement d'un tel biomarqueur simple d'utilisation permettrait de faciliter le dépistage des travailleurs à risque afin de les prendre en charge à un stade précoce. L'identification des auto-anticorps anti-CD146 font l'objet d'une demande de financement en cours auprès de l'ANSES et d'un PHRC-interrégional pour étudier leur prévalence sur une plus grande cohorte de travailleur du BTP exposés à la silice et suivis par le Service de Santé au Travail des Bouches-du-Rhône pour les entreprises du BTP dans le cadre de la médecine de prévention.

Article sur les Auto-anticorps anti-CD146 dans l'exposition professionnelle à la silice en préparation

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a severe autoimmune disease characterized by vascular damage, autoimmunity, and excessive fibrosis in the skin and internal organs, leading to severe morbidity and premature mortality. In addition to severe complications such as lung fibrosis or pulmonary arterial hypertension, patients with SSc are more prone to develop cancers such as lung cancer or lymphomas (385,386) than healthy subjects (387).

Various autoantibodies are described in SSc, and most of them associated with a particular clinical phenotype. Anti-centromere autoantibodies (ACA) are preferentially associated with limited fibrosis, whereas anti-topoisomerase1 autoantibodies (ATA) with diffuse one. Anti-RNA polymerase III autoantibodies (ARA), the third biological criteria of SSc, are described associated with renal crisis and predictive for the onset of cancers (80).

As recognized for autoimmune diseases, susceptibility to SSc is multifactorial including genetic predisposition and environmental factors, such as exposure to various chemicals as aromatic hydrocarbons, silicates, or bleomycin, a prooxidative agent (388).

The role of oxidative stress is increasingly proposed in the physiopathology of the disease (389). Especially, circulating levels of reactive oxygen species (ROS) related markers have been found to correlate with SSc vasculopathy, the formation of fibrosis and the production of autoantibodies (183).

We have recently identified CD146 as a novel molecular player involved in SSc fibrosis, interfering in the regulation between ROS and Wnt signaling pathway (268). CD146 is an endothelial adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, which exists both in a membrane-anchored form or in a soluble form (sCD146) generated by membrane cleavage. Membrane CD146 is found to be expressed on the vascular endothelial cells and it is primarily localized at the intercellular junction (3) where it regulates vascular permeability. Besides, CD146 can also be found on various other cell types such as Th17 immune cells (146,273). Physiologically, CD146 and its soluble form are mainly involved in the regulation of angiogenesis and inflammation. In a mouse model of bleomycin-induced SSc (ROS), we showed that CD146 knockout mice were more likely to develop fibrosis (skin and lung) than WT mice, and that fibrosis was reduced following injection of soluble CD146 into CD146-KO mice. In this model, we showed the regulatory role of CD146 and its interaction with its non-canonical WNT ligand, Wnt5a (148), through inhibition of the canonical pro-fibrotic WNT pathway. In SSc patients, de-

creased sCD146 levels are associated with worsening disease (146–148). Finally, CD146, absent on control fibroblasts, is expressed on dermal fibroblasts from patients with SSc or stimulated by ROS (268). All these results led us to hypothesize the development of an autoimmune response against CD146 in patients with SSc. To this end, we examined the presence of anti-CD146 autoantibodies (AACD146) in sera of patients with SSc (n= 93) compared to control blood donors (n= 44) according to clinical characteristics of patients and evolution of the disease, and investigate their functional involvement in the disease, in ROS production.

MATERIAL AND METHODS

Cohort of patients

93 patients with SSc were recruited from various internal medicine departments of the AP-HM according to the following inclusion criteria:

- Patients over 18 years old
- Patients meeting the ACR-EULAR criteria

Serum remnants were used from a declared biobank (DC 2012 − 1704).
The recruited controls were blood donors at the French blood establishment.
7 patients with lung cancer were recruited in the pulmonology department of AP-HM

Soluble CD146 dosage :
A capture ELISA (CY-QUANT ELISA) was used to determine the levels of sCD146 (Biocytex, Marseille, France), according to the manufacturer's protocol.

AntiCD146 ELISA auto-antibody detection :
Plates were coated overnight with recombinant human sCD146 (biocytex, Marseille, France) 100µl/well at a concentration of 10µg/ml. Then plates are washed and saturated with PBS-SVF10% 2h at 37°C. Serum samples (ethic committee from 2011-A00095-35) were diluted 1/1000 and positive control s-endo1 (Biocytex, Marseille, France) 1/5000. After 1h the plate is washed and antibody directed against human crystallizable fraction coupled with HRP is distributed at 1/2000 dilution, 100µl/well (1/10000 of goat anti mouse for control). A solution of tetramethylbenzidin TMB was added for 10 minutes as substrat for HRP. The reaction was

stop with HCl 1 M and absorbance was measured at 450nm. Nonspecific binding or background noise was assessed by conducting the same experiment on wells not coated with rh-CD146s, yielding a corrected absorbance. The results are presented as a ratio, calculated as follows: Ratio = (Corrected absorbance of the serum under investigation) / (Average corrected absorbance of control sera).

Confirmation of Autoantibody Specificity:

Depletion or Absorption Test

Positive sera were incubated for one hour on wells coated with rh-CD146s. After this initial absorption, the supernatant was collected and incubated for another hour on fresh wells coated with rh-CD146s. This process was repeated for a total of six absorption steps, conducted in the same manner, followed by the detection of autoantibodies using the ELISA method described previously. Binding was considered specific if the absorbance decreased over the course of the absorption steps.

Western Blot Experiments

rh-CD146s were applied to electrophoresis gels, which separated the proteins based on their molecular weight, and then transferred onto a nitrocellulose membrane. Nonspecific binding sites were blocked using a PBS solution containing 5% skim milk. Positive sera were applied to these membranes, and the binding of autoantibodies was revealed by the addition of peroxidase-conjugated anti-IgG. A positive control was performed using a monoclonal antibody directed against CD146 (S-endo1, Biocytex Marseille, France), revealed by a peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean ± SEM of the indicated number of experiments. Statistical analysis was performed with R software. R Development Core Team (2010). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org. Significant differences were determined using the non-parametric Mann-Whithney U test. When comparing more than two groups, a non-parametric one-way ANOVA followed by a Dunn's multiple comparison test was used. A P value <0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Identification of anti-CD146 autoantibodies in patients with systemic sclerosis

We investigated the presence of AACD146 in sera of patients with systemic sclerosis (n= 93) compared to controls (n= 44 blood donors) by evaluating their potential binding on an in-house ELISA coated with the recombinant sCD146. The positivity of autoantibodies found in 14 / 93 patients with SSc, was significantly higher in patients with SSC than in controls (Figure 1A). To comfort the specificity of the in-house ELISA, detection was done after AACD146 adsorption experiments on sCD146 (Figure 1B). A decrease of 50% of the signal was obtained in three positive samples whereas no change was observed in negative sample used as control. In addition, western blot analysis performed on HUVEC, revealed that sera recognized the recombinant sCD146 at the expected molecular weight of around 100 kDa (Figure 1C)

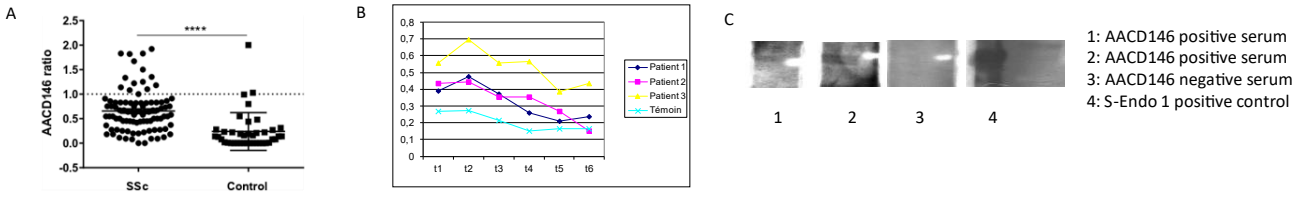


Figure 1: Identification of anti-CD146 autoantibodies in patients with systemic sclerosis. Positivity of anti-CD146 autoantibodies by ELISA method (A). Absorption tests showing a decrease in antibody titers after four ELISAs (B). Western blot of sera from positive patients and controls on rh-CD146s confirming the specificity of the autoantibodies (C).

Association of anti-CD146 autoantibodies and clinical, biological features and evolution of the disease

To evaluate the clinical interest of AACD146 in systemic sclerosis, association of autoantibodies was evaluated regarding the clinical and biological characteristics of patients at the time of sampling, and with respect to the progression of the disease (Table II). At time of sampling, no association was found neither with organ involvements nor with clinical forms subgroups of the disease, i.e diffuse (dcSSc) and limited (lcSSc) forms. We observed a higher frequency of lower digestive tract involvement and digital ulcers (Table II). We did not find a correlation between AACD146 and the concentrations of sCD146 (Figure 2).

Demographic, clinical and serologic characteristics (n=93)	
Sex	

No. (%) female	83 (89.2)
No. (%) male	10 (10.8)
Female-to-male ratio	8.3
Age, mean SD - years	
At diagnosis	51
Disease duration, median – years	7
Disease classification, n (%)	
Diffuse (dsSSc)	31 (33)
Limited (lcSSc)	60 (64)
Sine	2 (2)
Antinuclear antibody (ANA) positive n(%)	90 (97)
Anti-centromer antibody n (%)	35 (37.6)
Anti-topoisomerase I antibody	52 (55.9)

Table I: Description of the patient cohort with systemic sclerosis.

	Anti-CD146 : N (N=79)	Anti-CD146 : P (N=14)	Total (N=93)	p value
Sexe				0.020 (1)
- F	73 (92.4%)	10 (71.4%)	83 (89.2%)	
- M	6 (7.6%)	4 (28.6%)	10 (10.8%)	
Atteinte.Di-gestive.basse				0.026 (1)

- N-Miss	11	5	16	
- 0	48 (70.6%)	3 (33.3%)	51 (66.2%)	
- 1	20 (29.4%)	6 (66.7%)	26 (33.8%)	
CD146s				0.010 (2)
- Mean (SD)	307.698 (142.352)	417.530 (152.982)	324.232 (148.481)	
- Range	72.764 - 836.589	140.458 - 699.381	72.764 - 836.589	
Anuc.Factor				0.012 (1)
- N-Miss	2	1	3	
- 400	0 (0.0%)	1 (7.7%)	1 (1.1%)	
- 600	0 (0.0%)	1 (7.7%)	1 (1.1%)	
- 640	3 (3.9%)	1 (7.7%)	4 (4.4%)	
- 800	24 (31.2%)	4 (30.8%)	28 (31.1%)	
- 1280	50 (64.9%)	6 (46.2%)	56 (62.2%)	
UlcrereDig				0.048 (1)
- N-Miss	0	1	1	
- 0	53 (67.1%)	5 (38.5%)	58 (63.0%)	
- 1	26 (32.9%)	8 (61.5%)	34 (37.0%)	
Cancer				0.001 (1)
- N-Miss	5	1	6	
- 0	71 (95.9%)	9 (69.2%)	80 (92.0%)	
- 1	3 (4.1%)	4 (30.8%)	7 (8.0%)	
Occupational exposure				< 0.001 (1)
- N-Miss	6	1	7	

- 0	72 (98.6%)	9 (69.2%)	81 (94.2%)	
- 1	1 (1.4%)	4 (30.8%)	5 (5.8%)	

Table II: Clinical and biological signs in the anti-CD146 negative autoantibody group and in the anti-CD146 positive autoantibody group.

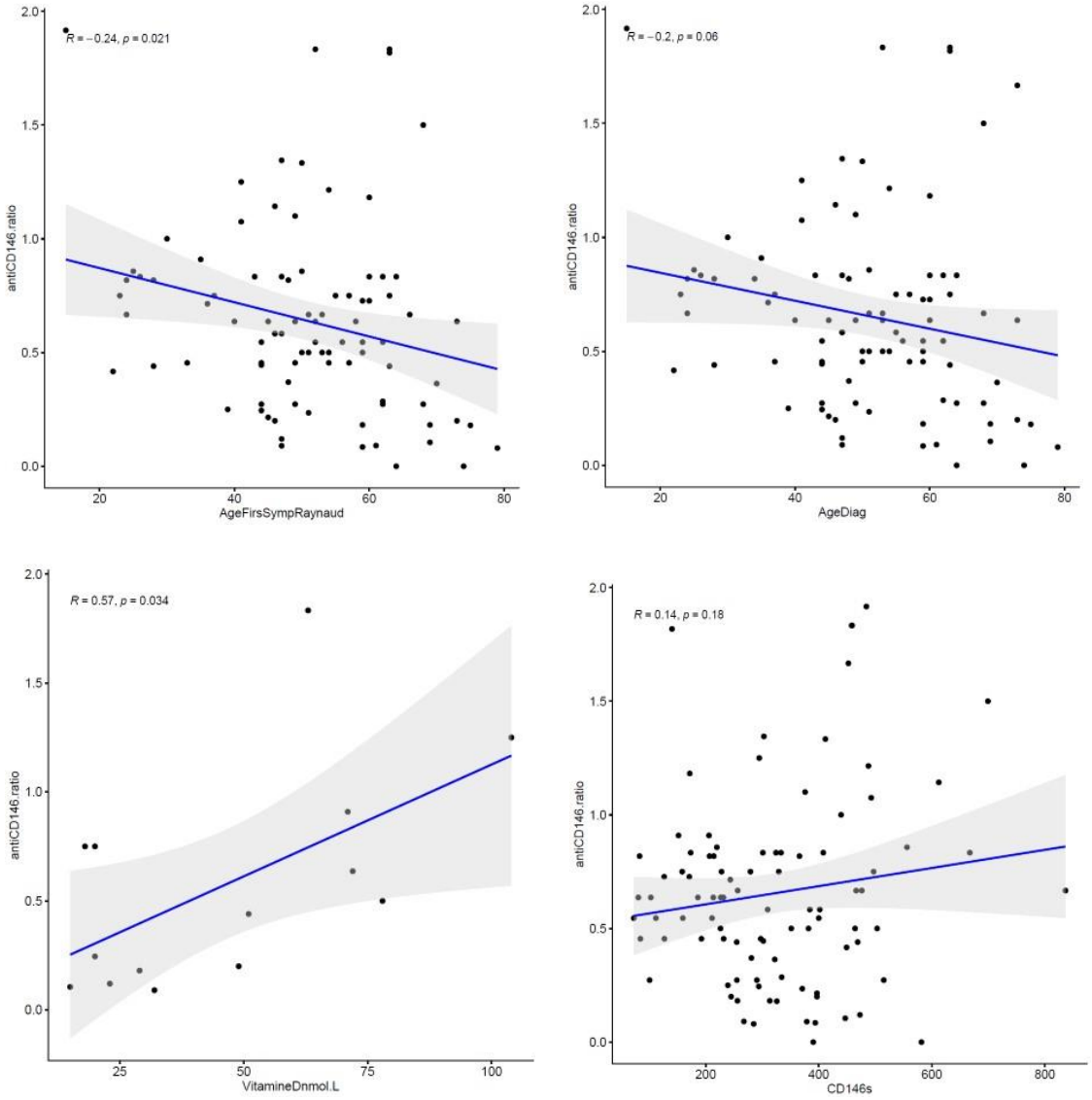


Figure 2: Correlation of anti-CD146 autoantibody titers with the age of onset of Raynaud's syndrome, age at diagnosis of SSc, vitamin D levels, and sCD146 concentrations.

Anti-CD146 autoantibodies in patients with professional exposure and pulmonary cancers

These last results prompted us to investigate the presence of AACD146 in patients followed for professional exposure to asbestos (n=9) or silicosis (n=7) or both (n=7) and in patients with pulmonary cancers (n=7). No autoantibody against CD146 was found in patients with

cancer nor in controls. In contrast more than 50% of patients with silicosis or asbestos exposure were AACD146 positive. Ratio of AACD146 were significantly increase in these patients compared to controls (p=0.03).

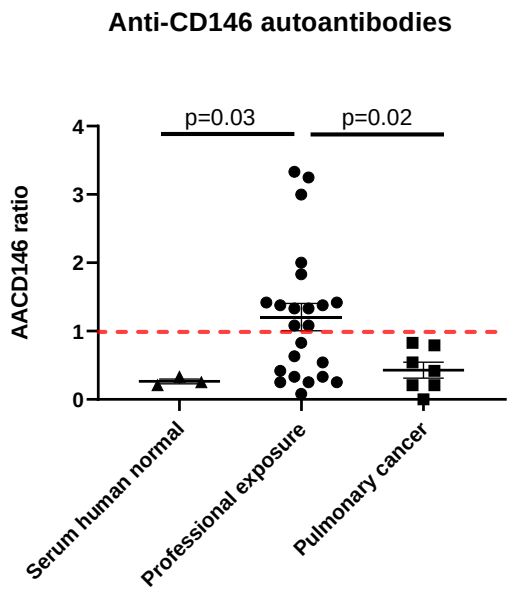


Figure 3: Frequency of anti-CD146 autoantibodies in patients exposed to mineral particles and patients with lung cancer by ELISA test.

DISCUSSION

In this study, we showed the presence of AACD146 in systemic sclerosis associated to silicosis exposure, leading us to propose AACD146 as the first serological biomarker of professional exposure. In addition, we showed an association between the presence of AACD146 and the evolution of the disease into cancer, adding a new autoimmune marker for the prognostic of the disease.

Systemic sclerosis is a severe autoimmune disease characterized by vascular damage, autoimmunity, excessive fibrosis of the skin and internal organs resulting in premature mortality. In addition to complications such as pulmonary fibrosis or pulmonary arterial hypertension, the development of cancer is particularly associated with SSc (Mellemkjaer et al., 2008; Rosenthal et al., 1995; Zeineddine et al., 2016). Various autoantibodies have been described in SSc, and among them, ARA autoantibodies have been linked to the occurrence of cancers (Shah et al., 2010).

Although SSc is recognized as a “professional disease”, no marker has been proposed to date for identifying a disease of professional exposure origin. The diagnosis of occupational exposure presents a significant public health challenge due to its difficulty in detection. yet it affects nearly 1.5 million people in France. Currently, there are no reliable biomarkers for early

detection, making the situation even more precarious. Spirometric tests, often used for assessing lung function, tend to indicate problems only at a later stage, when intervention options are more limited. Moreover, CT scans, though effective, are too costly for routine screening. This gap in early and affordable detection methods underscores the need for enhanced research and development in occupational health safety. In patients with SSc we found 4 patients positive for AACD146 among 5 patients presenting a silicosis exposure as part of their profession. These chief results were corroborated by the fact that we evidenced an important prevalence (more than 50%) of AACD146 in a population of patients presenting professional exposure to silicosis or asbestosis, showing a relationship between exposure to “toxic” and autoantibody positivity.

Discussion

Mon travail de thèse a mis pour la première fois en évidence le rôle de CD146/CD146s dans la sclérodermie systémique, *in vivo* sur un modèle murin de SSc induite par la bléomycine chez des souris sauvages (WT) et déficientes en CD146 (KO), *in vitro* sur des fibroblastes embryonnaires (MEFs) extraits de souris WT et KO, ainsi que chez l'homme sur des explants de fibroblastes cutanés, des PBMC et des sérums de patients avec SSc en comparaison à des contrôles.

Nous montrons que l'absence de CD146 favorise le développement de la fibrose induite par la bléomycine, en favorisant la voie Wnt canonique. De plus, nous avons établi une interaction entre la voie Wnt et celle des ROS en montrant que CD146 régule l'axe pro-fibrotique Wnt/ROS. Nous avons également mis en évidence que CD146 participe à l'orientation Th17 et qu'il est la cible d'auto-anticorps. Enfin nous montrons que la forme soluble de CD146 (CD146s) représente un biomarqueur dans le suivi des patients SSc.

Mise en place des modèles d'étude

Nos travaux sur l'implication de CD146 dans la SSc a nécessité de mettre en place au laboratoire un modèle *in vivo* de fibrose pour mimer la SSc chez des souris KO que nous avions déjà produites au laboratoire (390) en comparaison à des souris WT. L'utilisation d'un modèle murin de SSc induite par bléomycine est un des modèles les plus utilisés pour l'exploration de la SSc en raison de sa facilité d'utilisation et la reproductibilité de ces résultats. Ce modèle permet des études standardisées sur la fibrose cutanée et pulmonaire, il se rapproche de la SSc en reproduisant une réponse inflammatoire et la présence d'anticorps antinucléaires (391,392). Ainsi, pour étudier l'impact du déficit en CD146 dans le développement de la SSc, ce modèle s'est avéré pertinent.

Plusieurs autres modèles murins de SSc existent. Les modèles génétiques, tels que les souris Tsk-1, développent spontanément la fibrose et une atteinte auto-immune. Dans ce modèle, la fibrose apparaît spontanément ce qui empêche d'étudier les facteurs déclenchants de la fibrose pour comprendre les mécanismes à l'origine de la « rupture de tolérance ». Ces modèles nécessitent de maintenir les lignées génétiquement modifiées et, pour étudier

l'implication de CD146 aurait nécessité de réaliser des croisements supplémentaires avec les souris KO. Il existe aussi des modèles inductibles d'immunisation contre la topoisomérase I (393,394) qui semblent plus proches de la pathologie mais restent coûteux et compliqués à mettre en place.

Suite à la mise en place de la SSc avec fibrose cutanée nous avons mis au point dans le cadre d'un master suivi d'une thèse, le modèle de SSc avec fibrose pulmonaire par instillation de bléomycine chez des souris WT et KO. Des premiers résultats ont montré une augmentation de la fibrose chez le KO par rapport au WT comme nous l'avons décrit dans le modèle cutané. Ce modèle de fibrose pulmonaire de la SSc nous permettra également d'analyser les anomalies de l'angiogenèse chez le KO en comparaison avec le WT.

CD146 et fibrose de la ssc

L'injection de faibles doses de bléomycine a induit l'apparition de fibrose chez la souris KO uniquement, comme nous l'avons montré en utilisant la coloration au Trichrome, qui colore le collagène ou par la présence de myofibroblastes, cellules activées et produisant du collagène. Ainsi, l'absence de CD146 favorise le développement de la fibrose chez la souris KO, et nous avons analysé la signature moléculaire des souris KO par rapport au WT au niveau des voies pro-fibrotiques Wnt et ROS.

Dans la SSc, **le stress oxydatif** provenant de radicaux libres de l'oxygène contribue à la pathogénie de la maladie (181,183). Plusieurs éléments participent à la génération de ROS. Le stress endothélial, l'ischémie reperfusion et l'apoptose des cellules endothéliales induisent la production d'endothéline-1, génératrice de ROS (132). Le dysfonctionnement endothélial diminue la synthèse de NO par les eNOS et favorise la production de ROS par les Nox2 et Nox4. Le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des macrophages participe aussi aux dommages tissulaires et à la production de ROS (129). Enfin, des études ont montré *in vivo* que le ciblage pharmacologique pour inhiber le stress oxydatif inhibait la fibrose (182). Les fibroblastes de patients avec SSc explantés génèrent spontanément des ROS (183). Plusieurs modèles murins de SSc induite par un toxique utilisent des molécules génératrices de ROS telle que la bléomycine (391,392).

Dans notre modèle de SSc induite par bléomycine, l'administration de bléomycine générait bien des ROS chez le KO et le WT. Chez les souris KO, nous pouvions observer la présence de

dommages liées au ROS à l'état basal, contrairement à la souris WT. Nous avons voulu confirmer ces résultats sur des MEFs KO qui ont montré une plus grande production de ROS que les WT à l'état de base et une plus grande production de ROS après stimulation par la bléomycine.

La **voie Wnt canonique** a largement été étudiée dans la fibrose de la SSc. L'augmentation d'activateur de la voie canonique et la diminution des inhibiteurs a été observé dans des fibroblastes de patients SSc (200,201). Une accumulation de β-caténine est observée dans la peau de patients SSc par rapport à des sujets sains (203). L'un des modèles murins de SSc consiste à la surexpression de Wnt10b, un ligand de la voie canonique (207). Dans les modèles de SSc Tsk-1 et induite par bléomycine, l'activation de la voie canonique est aussi observée (202). *In vitro*, le ligand Wnt3a induit un phénotype pro-fibrotique chez des fibroblastes murins. L'inhibition de β-caténine par des SiRNA inverse les effets de cette fibrose (211). De plus, l'activation pharmacologique de la signalisation canonique de Wnt par l'inhibition pharmacologique de GSK-3β a exacerbé la fibrose cutanée (210).

Nous avons dans un premier temps mis en évidence chez le KO une diminution de l'expression de Wnt5a. Wnt5a est un ligand de CD146 qui active la voie Wnt non canonique et inhibe la voie Wnt canonique pro-fibrosante (319). Dans un modèle de fibrose *in vitro* de MEFs KO et WT, nous avons activé la voie Wnt canonique avec le ligand Wnt3a et activé la voie non canonique avec le ligand Wnt5a. Nous avons confirmé qu'en présence de CD146, Wnt5a activait la voie non canonique et Wnt3a était inactif. Sur le KO, Wnt3a activait la voie canonique, β-caténine dépendant, pro-fibrosante et Wnt5a n'était pas actif. Ces résultats dépendants de CD146 ont été montré sur d'autres types cellulaires (319,373). L'analyse transcriptomique et protéique de la voie Wnt a montré une signature pro-fibrosante chez le KO que nous réversions après transfection de CD146 sur les cellules KO. Fait intéressant, l'expression transcriptomique de β-caténine restait inchangée chez le KO alors que son expression protéique était augmentée chez le KO suggérant que CD146 participe à la dégradation de la β-caténine. Ce résultat, déjà décrit dans le cancer (373), explique pourquoi le ligand Wnt3a active la voie canonique uniquement chez le KO alors que CD146 n'est pas son ligand. Ces résultats nous ont amenés à proposer que CD146 est un régulateur central des voies de signalisation Wnt canoniques et non canoniques qui sont interconnectées et, par conséquent, de la fibrose. En outre, l'analyse transcriptomique a révélé une diminution d'expression du facteur de transcription Sox17 en l'absence de CD146. Sox17 est un facteur de transcription indispensable à la vasculogenèse au cours du développement embryonnaire. Des

résultats préliminaires sur des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires de souris (LMEC) montrent que CD146 et CD146s participent à la régulation de l'expression de Sox17 constituant un autre axe stratégique d'étude des fonctions de CD146 sur la voie Wnt. De plus, d'autres résultats préliminaires ont montré que la vitesse d'étalement et la rigidité des LMECs est différente entre le KO et le WT. De plus, l'utilisation de CD146s diminue la rigidité cellulaire chez le WT. Nous pouvons poser l'hypothèse que CD146 participe au maintien de rigidité cellulaire, nécessaire à la migration des cellules endothéliales.

Interaction Wnt-ROS régulée par CD146

Un des aspects importants de notre travail a été de confirmer l'interaction entre les voies Wnt et ROS et de comprendre comment cette interaction est régulée par CD146. Plusieurs études ont montré sur des systèmes cellulaires que les voies Wnt et ROS interagissaient et se régulaient réciproquement. La NRX, par exemple, est rendu inactive par les ROS ce qui a pour effet d'activer la voie Wnt canonique pro-fibrosante (213). L'activation de Nox1 participe à la stabilisation de la β-caténine montrant un effet des ROS sur le dialogue Wnt/ROS (215). Chez le rongeur, les particules fines sont aussi capables d'induire une EMT des cellules épithéliales pulmonaires via la génération de ROS en passant par la β-caténine (217). L'utilisation de N-acétyl-cystéine, un inhibiteur des ROS, a entraîné une diminution de l'expression des protéines liées à la voie Wnt/β-Caténine et d'apoptose liée aux microparticules de plastique (218). Par ailleurs la bléomycine favorise la différenciation des péricytes en myofibroblastes par activation de la protéines Wnt3a dans la fibrose pulmonaire (219). Dans la SSc, une seule étude a étudié les interactions entre Wnt et ROS. Elle décrit une activation de la protéine ATM par les ROS qui va diminuer la synthèse de l'inhibiteur WIF-1 sur des fibroblastes en culture et des souris traitées à la bléomycine (221).

Nous avons montré que les ROS augmentent de la même manière l'expression de Wnt5a et CD146 chez les MEFs WT alors que, chez les MEFs KO, les ROS ne modifient pas l'expression de Wnt5a. Nous avons également observé que la transcription de Wnt5a n'est pas diminuée par les ROS. Nous avons donc posé l'hypothèse que CD146 agit au centre des voies Wnt et ROS en empêchant la dégradation de Wnt5a par les ROS. L'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse protéique et d'un activateur de l'autophagie nous a permis de démontrer que CD146 protège Wnt5a d'une dégradation par autophagie.

Relevance chez l'homme

Une particularité de mon travail de thèse a été de démontrer chez l'homme les résultats obtenus chez la souris. Pour cela, nous avons isolé des fibroblastes humains de 5 patients SSc et 5 contrôles sains obtenus en tant que déchets opératoires de chirurgie reconstructrice. En adéquation avec les résultats de Servettaz et al. 2007 (183), nous avons confirmé que les fibroblastes de patients SSc produisaient plus de ROS. Nous avons aussi décrit une augmentation de CD146 associée à la présence de ROS sur les fibroblastes de donneurs sains et à une élévation de l'expression protéique de Wnt5a. Ces résultats confirment ceux obtenus sur les MEFs. L'utilisation de SiRNA inhibant CD146 nous a aussi permis de confirmer que l'inhibition de CD146 en présence de ROS diminuait l'expression de Wnt5a. Enfin, fait très important, nous avons montré une néo-expression de CD146 sur les fibroblastes de SSc alors qu'il est absent des fibroblastes cutanés humains.

Dans la SSc, il existe différents degrés de fibrose cutanée, allant d'une sclérose limitée au coup et aux membres genoux à une sclérose diffuse s'étendant sur les membres et le tronc. La SSc peut affecter de manière très variable les différents organes et plusieurs profils d'anticorps ont été trouvés dans la SSc. Malgré l'hétérogénéité de la maladie, nos résultats ont montré que CD146 est exprimé à la surface des fibroblastes de patients SSc. En effet, habituellement absent des fibroblastes en conditions physiologiques, nous avons pu observer *ex vivo* l'expression de CD146 la surface des fibroblastes cutanés de 5 patients SSc. Notre échantillonnage était faible en raison de la difficulté d'obtenir des échantillons cutanés puisqu'il n'existe pas d'indication à réaliser une biopsie cutanée dans la SSc. Cependant, il était représentatif de l'hétérogénéité clinique et biologique de la pathologie comme indiqué dans la tableS1 du troisième article. Dans une autre condition pathologique, le cancer, CD146 est aussi exprimé par des fibroblastes, les CAFs, sur lesquels il inhibe la progression de la tumeur et représente un marqueur de bon pronostique (266). CD146 agit comme un facteur pro-inflammatoire et pro-angiogénique dans plusieurs types de cancers. La SSc et le cancer partagent un ensemble de phénomènes pathologiques communs, comme en attestent les études épidémiologiques (385–387).

Une des explications possibles de l'expression de CD146 à la surface des fibroblastes de patients avec SSc pourrait être la persistance du CD146 endothélial la transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) ou pourrait être due au fait que les fibroblastes proviennent de péricytes exprimant CD146 (153). Cependant, nous avons pu induire *in vitro* la néo-expression de CD146 sur des fibroblastes de donneurs non SSc en recréant un stress oxydatif. Ceci nous a permis de supposer que la présence de CD146 à la surface des fibroblastes cutanés dans la SSc est préférentiellement liée à l'augmentation de la transcription de CD146 après un stress

oxydatif. Il a été observé que les ROS pouvaient promouvoir l'expression de HIF1-α qui augmente en conséquence l'expression de CD146 (395). Pour répondre à cette hypothèse, nous allons étudier le facteur de transcription HIF1-α.

Pour confirmer la néo-expression de CD146 sur des fibroblastes de patients SSc, nous allons également étudier l'expression de CD146 sur des fibroblastes pulmonaires de patients SSc-PID par rapport à des patients avec fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Ces fibroblastes seront isolés à partir de déchets opératoires de poumons transplantés dont l'indication est la fibrose pulmonaire. Ce projet a déjà obtenu l'accord éthique de la société de chirurgie thoracique. Nous pourrons ainsi vérifier si CD146 est aussi présent uniquement sur les fibroblastes pulmonaires dans la SSc ou s'il est présent dans d'autres pathologies pulmonaires fibrosantes.

Auto-immunité et CD146

Une augmentation du nombre de lymphocytes Th17 a été montrée dans le sang, dans le derme et dans les poumons des patients atteints de SSc (383). Les lymphocytes TH17 sont impliquées dans la pathogenèse de plusieurs maladies auto-immunes, y compris la SSc (396). Ils synthétisent de l'IL-17 qui se lie principalement à IL-17RA (397) et initie un signal pro-inflammatoire, qui est fortement impliqué dans la progression de nombreuses maladies auto-immunes chez l'homme (398). Par ailleurs, CD146 participe à l'orientation lymphocytaire vers le sous-type Th17 (269). Une augmentation des lymphocytes Th17 exprimant CD146 a été observé dans des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque. Etant donné l'importance des lymphocytes Th17 en auto-immunité et le rôle de CD146 dans la transmigration leucocytaire (322,327), il a été proposé, dans la sclérose en plaque, de bloquer CD146 pour inhiber la migration cellulaire vers le SNC (325,399). Dans la SSc, nous avons exploré le rôle de CD146 dans la sous-population lymphocytaire Th17. Nous avons donc isolé des PBMC de patients SSc. Nous avons ont mis en évidence une élévation des concentrations d'IL-17A et de la sous-population lymphocytaire Th17 en concordance avec d'autres travaux (90,400). Une corrélation positive a également été mise en évidence entre les niveaux sériques de CD146s et d'IL17A, ainsi qu'avec les proportions de lymphocytes Th17 exprimant CD146. Le traitement des lymphocytes Th17 avec CD146s a entraîné une hausse de l'expression de CD146 sur les lymphocytes Th17, suggérant que CD146s peut moduler la réponse Th17 exprimant CD146. A ce jour aucune autre étude n'a montré que CD146s pouvait augmenter l'expression de CD146 sur les lymphocytes Th17. En revanche, il a déjà été montré que CD146s augmente l'expression de CD146 sur les cellules endothéliales (244) ou dans le cancer (308). Cette

observation est particulièrement pertinente étant donné que l'augmentation des lymphocytes Th17 exprimant CD146 est associée à une fibrose pulmonaire moins sévère. L'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant CD146 ou CD146s permettrait de moduler la migration et l'orientation Th17 pour réguler la réponse auto-immune dans la fibrose de la SSc.

Il a été suggéré que le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathophysiologie de la sclérodermie, y compris son impact sur la composante auto-immune de la maladie. Une étude chez la souris a montré que l'oxydation de l'ADN topoisomérase I est suffisante pour rompre la tolérance envers cet antigène, menant à l'activation de l'auto-immunité et à la production d'auto-anticorps anti-topoisomérase I (382). La silice est un toxique qui induit la production de ROS au niveau local par activation des cellules phagocytaires. L'inflammation pulmonaire qui survient dans des contextes infectieux ou toxiques peuvent stimuler la production de CD146 dans les cellules épithéliales et macrophages comme dans l'asthme (339). Nous avons vu que les ROS pouvaient aussi stimuler la production de CD146 au niveau cellulaire. Nous pouvons supposer que les modifications ainsi subies par CD146 pourraient modifier sa conformation pour faire apparaître des épitopes cryptiques et favoriser une rupture de tolérance. Il s'en suivrait l'apparition d'une auto-immunité anti-CD146 avec production d'auto-anticorps.

Intérêt des auto-anticorps anti-CD146

La SSc fait partie des maladies professionnelles d'exposition à la silice. Cependant, le diagnostic d'exposition à la silice est un processus complexe nécessitant de prouver qu'il y a eu exposition pendant une période prolongée. La découverte de biomarqueurs précoces d'exposition représenterait un marqueur d'intérêt dans le suivi des travailleurs exposés aux particules de Silice. Chez 93 patients atteints de SSc, 15% avaient des auto-anticorps anti-CD146 contre 5% dans une population contrôle. Aucune association clinique spécifique n'a été identifiée en analysant les données cliniques, biologiques et démographiques des patients. La distribution des sexes parmi les patients SSc correspondait aux données épidémiologiques habituelles de la SSc (8), avec une majorité de femmes (89,2%). Cependant, parmi ceux présentant des auto-anticorps anti-CD146, une proportion plus élevée d'hommes a été observée (28,6% contre 71,4% de femmes), indiquant une répartition différente du sex-ratio chez les patients avec auto-anticorps anti-CD146. Bien que l'échantillon de patients avec ces auto-anticorps soit faible (n=14), cette différence de distribution des sexes était statistiquement significative. Dans cette cohorte de 93 patients avec SSc, 80% des patients exposés professionnellement à la silice (n=5) avaient des auto-anticorps anti-CD146. La présence d'auto-anticorps anti-CD146 associée à l'exposition professionnelle a été confirmée dans une autre cohorte de sujets

exposée à la silice et/ou à l'amiante. En effet 56% des sujets exposée à la silice et/ou à l'amiante étaient positifs aux auto-anticorps anti-CD146.

Dans le cadre de projets recherche clinique, deux lettres d'intentions ont été acceptées pour déterminer la prévalence des auto-anticorps anti-CD146 sur des sujets exposés à différentes doses la silice. Ce projet de recherche est réalisé en collaboration avec les médecins du travail de l'ASTBTP 13, le Service de Santé au Travail des Bouches-du-Rhône pour les entreprises du BTP.

CD146 soluble : acteur et marqueur ?

De façon intéressante, l'injection de CD146s par voie sous-cutanée dans la souris KO traitée par la bléomycine a réduit la fibrose cutanée suggérant que CD146s protège de la fibrose induite par la bléomycine. Ce résultat suggère que CD146s est impliqué dans la régulation du processus pro-fibrotique au niveau de la fibrose cutanée. Les récepteurs connus de CD146s sont l'angiomotine (371) ainsi que les intégrines αvβ1 (349) et αvβ3 (310). Les intégrines αvβ1 et αvβ3 sont hautement exprimées par les fibroblastes activés et sont des récepteurs au TGF-β. L'inhibition de ces intégrines limite la fibrose induite par le TGF-β (401). Il est possible que CD146s puisse être en compétition avec le TGF-β pour se fixer sur les récepteurs αvβ1 et αvβ3. Une autre hypothèse est que, étant donné le rôle de CD146s dans l'angiogenèse, il est probable que CD146s favorise la prolifération endothéliale et l'angiogenèse (317,371) des progéniteurs endothéliaux. Nous pouvons poser l'hypothèse que CD146s est ainsi une cible thérapeutique dans la SSc. Nous allons confirmer ces résultats en étudiant son potentiel thérapeutique dans le modèle de fibrose pulmonaire par instillation de bléomycine.

Compte tenu du rôle de CD146 et des effets de CD146s dans notre modèle de SSc *in vivo*, nous avons évalué la pertinence de nos résultats chez l'homme. Nous avons mis en évidence une élévation significative des concentrations de CD146s dans le sérum de patients SSc par rapport à des témoins. De plus, l'analyse de ces concentrations avec les données cliniques ont révélées que les taux de CD146s sont inversement corrélés à la gravité de la maladie avec des complications de type fibrose pulmonaire et apparition d'ulcères digitaux. Le suivi d'une de ces deux populations a également révélé que l'évolution défavorable de la maladie était associée à de faibles niveaux de CD146s. Une élévation des concentrations de CD146s et leur corrélation inverse avec des complications cliniques ont aussi été mis en évidence par une équipe japonaise (147). Les concentrations de CD146s dans le sang peuvent aussi varier dans d'autres contextes tels que l'insuffisance rénale chronique (244), le cancer (402), ou la pré-

éclampsie (321). Dans la maladie de Crohn, l'utilisation d'anti-TNF-α diminuent les concentrations de CD146s le proposant comme un marqueur potentiel de réponse au traitement (345). Au vu de ces résultats, une étude prospective sur des patients SSc permettra de confirmer si CD146s est un biomarqueur prédictif des complications de la SSc.

Perspectives du travail

La SSc reste une maladie grave dont la principale cause de décès provient de l'apparition d'une **fibrose pulmonaire**. La corrélation inverse de CD146s avec l'apparition de fibrose pulmonaire chez l'homme et l'existence d'un modèle de PID chez la souris induite par bléomycine nous ont poussé à explorer l'absence de CD146 dans le contexte de la fibrose pulmonaire. Ce travail fait actuellement l'objet d'une thèse de science au laboratoire. Pour lequel, l'utilisation de CD146s comme cible thérapeutique dans la fibrose pulmonaire est en cours.

Concernant la corrélation de CD146s avec la fibrose pulmonaire dans la SSc, des résultats sont en cours d'analyse. En effet, nous avons recruté des patients SSc, des patients SSc-PID et des FPI comme contrôles. Nous avons réalisé le dosage de CD146s à M1 et à M12 que nous sommes actuellement en train de comparer avec d'autres examens tels que les examens fonctionnels respiratoires ou le scanner thoracique afin de trouver des corrélations et le valider en tant que biomarqueur pour le suivi de la SSc-PID.

Compte tenu de l'expression de novo-de CD146 dans un contexte de stress oxydatif, il est pertinent d'explorer les facteurs de transcription à l'origine de l'augmentation de CD146 sous l'action de ROS. En raison de son rôle dans l'angiogenèse, de ses modifications par rapport au stress oxydant et de sa capacité à induire l'expression de CD146, le facteur de transcription qui sera étudié en premier sera HIF-1α. La connaissance des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de CD146 peut aider à identifier des cibles moléculaires spécifiques des voies de signalisations Wnt et ROS impliquées dans la fibrose.

Des résultats préliminaires ont montré que CD146 et CD146s agissent sur la régulation du facteur de transcription Sox17 impliqué dans la vasculogenèse et l'inhibition de l'activité de la β-caténine dans la voie Wnt canonique pro-fibrosante. Nous allons explorer les mécanismes à l'origine de cette régulation et explorer la relevance de CD146 et CD146s sur l'activité de Sox17 de la vasculogenèse, de la migration cellulaire, de l'étalement et la rigidité cellulaire.

L'ensemble de ces résultats participeront à développer des axes de recherches autour de CD146, Wnt, des ROS et de leur régulation par Sox17 afin de trouver de nouvelles thérapeutiques ciblées sur plusieurs voies de signalisation permettant d'inhiber et entraver les phénomènes de fibrose dans la SSc.

Enfin, La positivité des **auto-anticorps anti-CD146** dans l'exposition à la silice nécessite cependant de réaliser des études sur de plus grandes cohortes et de développer un test ELISA industriel qui permettra de rechercher ces auto-anticorps à une échelle beaucoup plus importante.

Conclusion générale

En conclusion, notre travail constitue la première étude démontrant l'implication de CD146/CD146s dans la SSc et la mise en évidence de son rôle central dans la régulation des voies Wnt et ROS.

Il apparaît que CD146 soluble représente un marqueur d'intérêt pronostique dans l'évolution des complications de la SSc et faciliter le suivi des patients malades en anticipant la survenue de complications et ainsi diminuer les coûts liés aux soins.

CD146 apparaît aussi comme un marqueur diagnostic potentiel de la SSc puisqu'il n'est exprimé que par les fibroblastes cutanés des patients atteints de SSc.

Les auto-anticorps anti-CD146 pourrait permettre, dans un contexte plus large que la SSc, de diagnostiquer une exposition chronique aux particules de silice.

En dehors de ces contextes où CD146 représenterait un biomarqueur, il s'agit d'une molécule active sur les trois composantes de la SSc avec une présence ubiquitaire sur l'endothélium, participant à l'angiogenèse, l'inflammation, la migration leucocytaire, sur la composante immunitaire en favorisant l'orientation Th17 et sur la fibrose en participant à la régulation du dialogue Wnt-ROS. Il pourrait ainsi servir de cible thérapeutique pour développer de nouvelles thérapies ciblées ou bien pour être lui-même la cible d'anticorps monoclonaux.

Annexes

Annexe 1 : **Heim X**, Joshkon A, Bermudez J, Bachelier R, Dubrou C, Boucraut J, Foucault-Bertaud A, Leroyer AS, Dignat-George F, Blot-Chabaud M, Bardin N. CD146/sCD146 in the Pathogenesis and Monitoring of Angiogenic and Inflammatory Diseases. Biomedicines. 2020 Dec 10;8(12):592.

Revue de la littérature sur l'intérêt de CD146 et CD146s dans le suivi des pathologies auto-immunes et inflammatoires.

biomedicines

MDPI

Review

CD146/sCD146 in the Pathogenesis and Monitoring of Angiogenic and Inflammatory Diseases

Xavier Heim [1,2,*], Ahmad Joshkon [1], Julien Bermudez [1,3], Richard Bachelier [1], Cléa Dubrou [1], José Boucraut [2,4], Alexandrine Foucault-Bertaud [1], Aurélie S. Leroyer [1], Francoise Dignat-George [1,5], Marcel Blot-Chabaud [1] and Nathalie Bardin [1,2]

1 Hematology Department, Center for CardioVascular and Nutrition Research C2VN, Faculty of Pharmacy, Timone Campus, Aix-Marseille University, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut National de Recherche Pour L'agriculture, L'alimentation et L'environnement (INRAE), 13005 Marseille, France; ahmadjoshkon@hotmail.com (A.J.); Julien.bermudez@ap-hm.fr (J.B.); richard.bachelier@inserm.fr (R.B.); cldubrou@gmail.com (C.D.); Alexandrine.bertaud@univ-amu.fr (A.F.-B.); Aurelie.leroyer@univ-amu.fr (A.S.L.); Francoise.dignat-george@univ-amu.fr (F.D.-G.); marcel.blot-chabaud@laposte.net (M.B.-C.); Nathalie.bardin@univ-amu.fr (N.B.)

2 Service d'immunologie, Pôle de Biologie, Hôpital de la Conception, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (AP-HM), 13005 Marseille, France; jose.boucraut@univ-amu.fr

3 Pulmonology Department and Lung Transplant Team, North Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (AP-HM), 13015 Marseille, France

4 Timone Neuroscience Institute, UMR CNRS 7289, Aix-Marseille University, 13005 Marseille, France

5 Hematology and Vascular Biology Department, Hopital de la Conception, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (AP-HM), 13005 Marseille, France

* Correspondence: xavier.heim@univ-amu.fr

Received: 30 October 2020; Accepted: 4 December 2020; Published: 10 December 2020

check for updates

Abstract: CD146 is a cell adhesion molecule expressed on endothelial cells, as well as on other cells such as mesenchymal stem cells and Th17 lymphocytes. This protein also exists in a soluble form, whereby it can be detected in biological fluids, including the serum or the cerebrospinal fluid (CSF). Some studies have highlighted the significance of CD146 and its soluble form in angiogenesis and inflammation, having been shown to contribute to the pathogenesis of many inflammatory autoimmune diseases, such as systemic sclerosis, mellitus diabetes, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases, and multiple sclerosis. In this review, we will focus on how CD146 and sCD146 contribute to the pathogenesis of the aforementioned autoimmune diseases and discuss the relevance of considering it as a biomarker in these pathologies.

Keywords: CD146; soluble CD146; inflammation angiogenesis; autoimmunity

1. Introduction

CD146 is a cell adhesion molecule belonging to the immunoglobulin superfamily. It is expressed by all types of human endothelial cells, regardless of the type or caliber of the vessel, with a preferential localization at the endothelial junctions, however outside the adherents junction [1,2]. This expression is not limited to endothelial cells, as it was found to be expressed by other cell types, such as Th17 lymphocytes [3], extravillous trophoblasts [4], mesenchymal stem cells [5], melanoma cells [6], and cancer-associated fibroblasts [7]. The molecule also exists in a soluble form generated by membrane cleavage via the action of metalloproteases [8]. Soluble CD146 (sCD146) was first discovered in endothelial cell (EC) supernatants [9] and has been assayed in other biological fluids, such as cerebrospinal fluid (CSF) and blood [10,11]. In healthy subjects, sCD146 concentrations were found

Annexe 2 : Benyamine A, **Heim X**, Resseguier N, Bertin D, Gomez C, Ebbo M, Harlé JR, Kaplanski G, Rossi P, Bardin N, Granel B. Elevated serum Krebs von den Lungen-6 in systemic sclerosis: a marker of lung fibrosis and severity of the disease. Rheumatol Int. 2018 May;38(5):813-819.

Dosage des concentrations de la mucine Krebs von den Lungen-6 dans la SSc, un biomarqueur prédictif de la fibrose pulmonaire de la SSc.

Rheumatology International (2018) 38:813–819
https://doi.org/10.1007/s00296-018-3987-3

Rheumatology
INTERNATIONAL

BIOMARKERS

Elevated serum Krebs von den Lungen-6 in systemic sclerosis: a marker of lung fibrosis and severity of the disease

Audrey Benyamine[1,2] · Xavier Heim[2,3] · Noémie Resseguier[4] · Daniel Bertin[3] · Carine Gomez[5] · Mikaël Ebbo[6] · Jean-Robert Harlé[6] · Gilles Kaplanski[7] · Pascal Rossi[1,2] · Nathalie Bardin[2,3] · Brigitte Granel[1,2]

Received: 17 November 2017 / Accepted: 27 January 2018 / Published online: 17 February 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Objectives We aimed to assess the clinical significance of Krebs von den Lungen-6 (KL-6) in the diagnosis and severity of interstitial lung disease (ILD) in a French cohort of patients with systemic sclerosis (SSc).

Methods Serum KL-6 concentrations were measured with chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) in 75 SSc patients. Patients were divided into two groups according to the presence of interstitial lung disease (SSc-ILD versus SSc-without ILD) on chest High-Resolution Computed Tomography. Pulmonary function tests, main manifestations and severity of the lung disease (Medsger's severity scale) were collected.

Results KL-6 serum concentrations were significantly higher in SSc-ILD patients than in those without ILD ($p < 10^{-4}$) and were inversely correlated with forced vital capacity, total lung capacity and diffuse lung capacity of carbon monoxide. Serum KL-6 level superior to 872 U/ml appeared as the optimal cut-off value associated with ILD. Patients with a restrictive pulmonary syndrome and dyspnoea had significant higher KL-6 serum concentrations. SSc patients with anti-topoisomerase 1 antibodies had higher KL-6 serum levels than patients with anti-centromere antibodies ($p < 10^{-4}$). ILD and anti-topoisomerase 1 antibodies were independent factors associated with KL-6 in multivariate analysis. Interestingly, KL-6 serum concentrations positively increased with the patient lung severity.

Conclusions Our study confirms that KL-6 is an accurate biomarker for the diagnosis of SSc-ILD in a French cohort of patients. High KL-6 levels should prompt physicians to assess ILD with pulmonary imaging and pulmonary functions tests. Prospective clinical studies are still required to determine whether levels of KL-6 might predict progression of ILD as well as its usefulness in the timing of therapeutic intervention.

Keywords Krebs von den Lungen-6 · Systemic sclerosis · Lung fibrosis · Disease severity · Anti-topoisomerase 1 antibody (Scl70)

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a relatively rare autoimmune disease characterized by fibrosis involving skin and viscera such as lung and digestive tract. Pulmonary disease related to SSc typically consists of interstitial lung disease (ILD), which is a frequent manifestation observed in up to 50% of SSc patients [1, 2]. Typically, the onset of SSc-ILD is insidious and often diagnosed at an advanced stage, with significant morbidity and an increasing mortality [3]. Current treatments have a limited efficacy, particularly if given at an advanced stage of the pulmonary disease [4].

Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a high molecular weight mucin-like glycoprotein, secreted by type II alveolar pneumocytes and bronchial epithelial cells in response to cellular damage and regeneration in patients with ILD [5]. Due to its chemotactic, pro-fibrotic and anti-apoptotic roles on lung fibroblasts, serum KL-6 level has been studied in ILD of various aetiologies and revealed to be an important serum marker for ILD whatever its cause [6–9]. The number of publications of KL-6 in the context of SSc is growing in the literature [6, 10–14]. However, most of them come from Japan. As differences in KL-6 expression related to ethnic and/or genetic variants may exist [15], studies have to be performed in different genetic backgrounds to determine the

✉ Audrey Benyamine
audrey.benyamine@ap-hm.fr
Extended author information available on the last page of the article

Bibliographie

1. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: systematic review and meta-analysis. Semin Arthritis Rheum. oct 2014;44(2):208-19.

2. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. J Cell Mol Med. juin 2010;14(6A):1241-54.

3. Bardin N, Anfosso F, Massé JM, Cramer E, Sabatier F, Le Bivic A, et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. Blood. 15 déc 2001;98(13):3677-84.

4. Bardin N, Francès V, Combes V, Sampol J, Dignat-George F. CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells. FEBS Lett. 2 janv 1998;421(1):12-4.

5. Kebir A, Harhouri K, Guillet B, Liu JW, Foucault-Bertaud A, Lamy E, et al. CD146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. Circ Res. 9 juill 2010;107(1):66-75.

6. Bardin N, Blot-Chabaud M, Despoix N, Kebir A, Harhouri K, Arsanto JP, et al. CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol. mai 2009;29(5):746-53.

7. Tian J, Kang S, Zhang D, Huang Y, Zhao M, Gui X, et al. Global, regional, and national incidence and prevalence of systemic sclerosis. Clin Immunol. mars 2023;248:109267.

8. Valentini G, Black C. Systemic sclerosis. Best Pract Res Clin Rheumatol. déc 2002;16(5):807-16.

9. Elhai M, Avouac J, Walker UA, Matucci-Cerinic M, Riemekasten G, Airò P, et al. A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. Ann Rheum Dis. janv 2016;75(1):163-9.

10. Gelber AC, Manno RL, Shah AA, Woods A, Le EN, Boin F, et al. Race and association with disease manifestations and mortality in scleroderma: a 20-year experience at the Johns Hopkins Scleroderma Center and review of the literature. Medicine (Baltimore). juill 2013;92(4):191-205.

11. Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. Arthritis & Rheumatism. août 2003;48(8):2246-55.

12. Royle JG, Lanyon PC, Grainge MJ, Abhishek A, Pearce FA. The incidence, prevalence, and survival of systemic sclerosis in the UK Clinical Practice Research Datalink. Clin Rheumatol. août 2018;37(8):2103-11.

13. Elhai M, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis at the crossroad of polyautoimmunity. Autoimmun Rev. sept 2013;12(11):1052-7.

14. Fuschiotti P. Current perspectives on the immunopathogenesis of systemic sclerosis. Immunotargets Ther. 2016;5:21-35.

15. Makino T, Jinnin M. Genetic and epigenetic abnormalities in systemic sclerosis. J Dermatol. janv 2016;43(1):10-8.

16. Murdaca G, Contatore M, Gulli R, Mandich P, Puppo F. Genetic factors and systemic sclerosis. Autoimmun Rev. mai 2016;15(5):427-32.

17. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. The Lancet. oct 2017;390(10103):1685-99.

18. Broen JCA, Radstake TRDJ, Rossato M. The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. Nat Rev Rheumatol. nov 2014;10(11):671-81.

19. Saigusa R, Asano Y, Taniguchi T, Yamashita T, Ichimura Y, Takahashi T, et al. Multifaceted contribution of the TLR4-activated IRF5 transcription factor in systemic sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 8 déc 2015;112(49):15136-41.

20. Sharif R, Mayes MD, Tan FK, Gorlova OY, Hummers LK, Shah AA, et al. IRF5 polymorphism predicts prognosis in patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. juill 2012;71(7):1197-202.

21. Asano Y, Bujor AM, Trojanowska M. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. J Dermatol Sci. sept 2010;59(3):153-62.

22. Noda S, Asano Y, Nishimura S, Taniguchi T, Fujiu K, Manabe I, et al. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. Nat Commun. 12 déc 2014;5:5797.

23. Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. Arthritis Rheum. juill 2006;54(7):2271-9.

24. De Martinis M, Ciccarelli F, Sirufo MM, Ginaldi L. An overview of environmental risk factors in systemic sclerosis. Expert Review of Clinical Immunology. 2 avr 2016;12(4):465-78.

25. Marie I, Menard JF, Duval-Modeste AB, Joly P, Dominique S, Bravard P, et al. Association of occupational exposure with features of systemic sclerosis. J Am Acad Dermatol. mars 2015;72(3):456-64.

26. Black C. GENETIC SUSCEPTIBILITY TO SCLERODERMA-LIKE SYNDROME INDUCED BY VINYL CHLORIDE. The Lancet. janv 1983;321(8314-8315):53-5.

27. deShazo RD. Current concepts about the pathogenesis of silicosis and asbestosis. J Allergy Clin Immunol. juill 1982;70(1):41-9.

28. Haustein UF, Herrmann K. Environmental scleroderma. Clin Dermatol. 1994;12(3):467-73.

29. Diot E, Lesire V, Guilmot JL, Metzger MD, Pilore R, Rogier S, et al. Systemic sclerosis and occupational risk factors: a case-control study. Occup Environ Med. août 2002;59(8):545-9.

30. Bovenzi M, Barbone F, Pisa FE, Betta A, Romeo L, Tonello A, et al. A case-control study of occupational exposures and systemic sclerosis. Int Arch Occup Environ Health. janv 2004;77(1):10-6.

31. Goldman JA. Connective tissue disease in people exposed to organic chemical solvents: systemic sclerosis (scleroderma) in dry cleaning plant and aircraft industry workers. J Clin Rheumatol. août 1996;2(4):185-90.

32. Bottomley WW, Sheehan-Dare RA, Hughes P, Cunliffe WJ. A sclerodermatous syndrome with unusual features following prolonged occupational exposure to organic solvents. Br J Dermatol. févr 1993;128(2):203-6.

33. De Roos AJ, Cooper GS, Alavanja MC, Sandler DP. Rheumatoid arthritis among women in the Agricultural Health Study: risk associated with farming activities and exposures. Ann Epidemiol. nov 2005;15(10):762-70.

34. Cooper GS, Parks CG, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, Dooley MA. Occupational risk factors for the development of systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. oct 2004;31(10):1928-33.

35. Marie I, Gehanno JF, Bubenheim M, Duval-Modeste AB, Joly P, Dominique S, et al. Systemic sclerosis and exposure to heavy metals: A case control study of 100 patients and 300 controls. Autoimmunity Reviews. mars 2017;16(3):223-30.

36. Masi AT, Subcommittee For Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis & Rheumatism. mai 1980;23(5):581-90.

37. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. nov 2013;65(11):2737-47.

38. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol. févr 1988;15(2):202-5.

39. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. J Rheumatol. juill 2001;28(7):1573-6.

40. Toya SP, Tzelepis GE. The many faces of scleroderma sine scleroderma: a literature review focusing on cardiopulmonary complications. Rheumatol Int. juin 2009;29(8):861-8.

41. Moinzadeh P, Aberer E, Ahmadi-Simab K, Blank N, Distler JHW, Fierlbeck G, et al. Disease progression in systemic sclerosis-overlap syndrome is significantly different from limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. avr 2015;74(4):730-7.

42. Avouac J, Fransen J, Walker UA, Riccieri V, Smith V, Muller C, et al. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. Ann Rheum Dis. mars 2011;70(3):476-81.

43. Ebata S, Yoshizaki-Ogawa A, Sato S, Yoshizaki A. New Era in Systemic Sclerosis Treatment: Recently Approved Therapeutics. JCM. 8 août 2022;11(15):4631.

44. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. J Rheumatol. juill 1995;22(7):1281-5.

45. Furst DE, Clements PJ, Steen VD, Medsger TA, Masi AT, D'Angelo WA, et al. The modified Rodnan skin score is an accurate reflection of skin biopsy thickness in systemic sclerosis. J Rheumatol. janv 1998;25(1):84-8.

46. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, Allanore Y, Baron M, Czirjak L, et al. Standardization of the Modified Rodnan Skin Score for Use in Clinical Trials of Systemic Sclerosis. Journal of Scleroderma and Related Disorders. janv 2017;2(1):11-8.

47. Hughes M, Hodgson R, Harris J, Porter N, Jackson S, Kirwadi A, et al. Imaging calcinosis in patients with systemic sclerosis by radiography, computerised tomography and magnetic resonance imaging. Semin Arthritis Rheum. oct 2019;49(2):279-82.

48. Zanatta E, Desportes M, Do HH, Avouac J, Doria A, Feydy A, et al. Pseudotumoral calcinosis in systemic sclerosis: Data from systematic literature review and case series from two referral centres. Semin Arthritis Rheum. déc 2020;50(6):1339-47.

49. Pauling JD, Hughes M, Pope JE. Raynaud's phenomenon-an update on diagnosis, classification and management. Clin Rheumatol. déc 2019;38(12):3317-30.

50. Hachulla E, Clerson P, Launay D, Lambert M, Morell-Dubois S, Queyrel V, et al. Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. J Rheumatol. déc 2007;34(12):2423-30.

51. Hughes M, Herrick AL. Digital ulcers in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). janv 2017;56(1):14-25.

52. Bérezné A, Seror R, Morell-Dubois S, de Menthon M, Fois E, Dzeing-Ella A, et al. Impact of systemic sclerosis on occupational and professional activity with attention to patients with digital ulcers. Arthritis Care Res (Hoboken). févr 2011;63(2):277-85.

53. Mouthon L, Mestre-Stanislas C, Bérezné A, Rannou F, Guilpain P, Revel M, et al. Impact of digital ulcers on disability and health-related quality of life in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. janv 2010;69(1):214-7.

54. Giuggioli D, Manfredi A, Colaci M, Lumetti F, Ferri C. Osteomyelitis complicating scleroderma digital ulcers. Clin Rheumatol. mai 2013;32(5):623-7.

55. Sharp CA, Akram Q, Hughes M, Muir L, Herrick AL. Differential diagnosis of critical digital ischemia in systemic sclerosis: Report of five cases and review of the literature. Semin Arthritis Rheum. oct 2016;46(2):209-16.

56. Winstone TA, Assayag D, Wilcox PG, Dunne JV, Hague CJ, Leipsic J, et al. Predictors of mortality and progression in scleroderma-associated interstitial lung disease: a systematic review. Chest. août 2014;146(2):422-36.

57. Goldin JG, Lynch DA, Strollo DC, Suh RD, Schraufnagel DE, Clements PJ, et al. High-resolution CT scan findings in patients with symptomatic scleroderma-related interstitial lung disease. Chest. août 2008;134(2):358-67.

58. Goh NSL, Desai SR, Anagnostopoulos C, Hansell DM, Hoyles RK, Sato H, et al. Increased epithelial permeability in pulmonary fibrosis in relation to disease progression. Eur Respir J. juill 2011;38(1):184-90.

59. Khanna D, Tseng CH, Farmani N, Steen V, Furst DE, Clements PJ, et al. Clinical course of lung physiology in patients with scleroderma and interstitial lung disease: analysis of the Scleroderma Lung Study Placebo Group. Arthritis Rheum. oct 2011;63(10):3078-85.

60. Jung E. Clinical Characteristics of Systemic Sclerosis With Interstitial Lung Disease. Arch Rheumatol. 5 sept 2018;33(3):322-7.

61. Solomon JJ, Olson AL, Fischer A, Bull T, Brown KK, Raghu G. Scleroderma lung disease. European Respiratory Review. 1 mars 2013;22(127):6-19.

62. Strollo D, Goldin J. Imaging Lung Disease in Systemic Sclerosis. Curr Rheumatol Rep. avr 2010;12(2):156-61.

63. Benan M, Hande I, Gul O. The natural course of progressive systemic sclerosis patients with interstitial lung involvement. Clin Rheumatol. 2 févr 2007;26(3):349-54.

64. Wangkaew S, Euathrongchit J, Wattanawittawas P, Kasitanon N, Louthrenoo W. Incidence and predictors of interstitial lung disease (ILD) in Thai patients with early systemic sclerosis: Inception cohort study. Modern Rheumatology. 3 juill 2016;26(4):588-93.

65. Perelas A, Silver RM, Arrossi AV, Highland KB. Systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. The Lancet Respiratory Medicine. mars 2020;8(3):304-20.

66. Bruni C, Cuomo G, Rossi FW, Praino E, Bellando-Randone S. Kidney involvement in systemic sclerosis: From pathogenesis to treatment. Journal of Scleroderma and Related Disorders. févr 2018;3(1):43-52.

67. Penn H, Howie AJ, Kingdon EJ, Bunn CC, Stratton RJ, Black CM, et al. Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes. QJM. août 2007;100(8):485-94.

68. McFarlane IM, Bhamra MS, Kreps A, Iqbal S, Al-Ani F, Saladini-Aponte C, et al. Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis. Rheumatology (Sunnyvale). 2018;8(1):235.

69. Lepri G, Bellando Randone S, Matucci Cerinic M, Allanore Y. Systemic sclerosis and primary biliary cholangitis: An overlapping entity? Journal of Scleroderma and Related Disorders. juin 2019;4(2):111-7.

70. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. Medicine (Baltimore). mars 2002;81(2):139-53.

71. Steen VD, Medsger TA. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. Arthritis Rheum. nov 2000;43(11):2437-44.

72. Kahan A, Coghlan G, McLaughlin V. Cardiac complications of systemic sclerosis. Rheumatology. juin 2006;48(suppl_3):iii45-8.

73. Ho M, Veale D, Eastmond C, Nuki G, Belch J. Macrovascular disease and systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. janv 2000;59(1):39-43.

74. Kahan A, Nitenberg A, Foult JM, Amor B, Menkes CJ, Devaux JY, et al. Decreased coronary reserve in primary scleroderma myocardial disease. Arthritis Rheum. juin 1985;28(6):637-46.

75. Lefèvre G, Dauchet L, Hachulla E, Montani D, Sobanski V, Lambert M, et al. Survival and prognostic factors in systemic sclerosis-associated pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis. Arthritis Rheum. sept 2013;65(9):2412-23.

76. Shahane A. Pulmonary hypertension in rheumatic diseases: epidemiology and pathogenesis. Rheumatol Int. juill 2013;33(7):1655-67.

77. Shah AA, Wigley FM, Hummers LK. Telangiectases in scleroderma: a potential clinical marker of pulmonary arterial hypertension. J Rheumatol. janv 2010;37(1):98-104.

78. Avouac J, Huscher D, Furst DE, Opitz CF, Distler O, Allanore Y, et al. Expert consensus for performing right heart catheterisation for suspected pulmonary arterial hypertension in

systemic sclerosis: a Delphi consensus study with cluster analysis. Ann Rheum Dis. janv 2014;73(1):191-7.

79. Khanna D, Gladue H, Channick R, Chung L, Distler O, Furst DE, et al. Recommendations for screening and detection of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. Arthritis Rheum. déc 2013;65(12):3194-201.

80. Shah AA, Rosen A, Hummers L, Wigley F, Casciola-Rosen L. Close temporal relationship between onset of cancer and scleroderma in patients with RNA polymerase I/III antibodies. Arthritis Rheum. sept 2010;62(9):2787-95.

81. Bonifazi M, Tramacere I, Pomponio G, Gabrielli B, Avvedimento EV, La Vecchia C, et al. Systemic sclerosis (scleroderma) and cancer risk: systematic review and meta-analysis of observational studies. Rheumatology. 1 janv 2013;52(1):143-54.

82. Onishi A, Sugiyama D, Kumagai S, Morinobu A. Cancer Incidence in Systemic Sclerosis: Meta-Analysis of Population-Based Cohort Studies. Arthritis & Rheumatism. juill 2013;65(7):1913-21.

83. Igusa T, Hummers LK, Visvanathan K, Richardson C, Wigley FM, Casciola-Rosen L, et al. Autoantibodies and scleroderma phenotype define subgroups at high-risk and low-risk for cancer. Ann Rheum Dis. 20 avr 2018;annrheumdis-2018-212999.

84. Joseph CG, Darrah E, Shah AA, Skora AD, Casciola-Rosen LA, Wigley FM, et al. Association of the Autoimmune Disease Scleroderma with an Immunologic Response to Cancer. Science. 10 janv 2014;343(6167):152-7.

85. Bhattacharyya S, Varga J. Endogenous ligands of TLR4 promote unresolving tissue fibrosis: Implications for systemic sclerosis and its targeted therapy. Immunology Letters. mars 2018;195:9-17.

86. Kräling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuciear Cellular Infiltrates in Clinically Involved Skin from Patients with Systemic Sclerosis of Recent Onset Predominantly Consist of Monocytes/Macrophages. Pathobiology. 1995;63(1):48-56.

87. Fang D, Chen B, Lescoat A, Khanna D, Mu R. Immune cell dysregulation as a mediator of fibrosis in systemic sclerosis. Nat Rev Rheumatol. déc 2022;18(12):683-93.

88. Chizzolini C, Parel Y, Scheja A, Dayer JM. Polarized subsets of human T-helper cells induce distinct patterns of chemokine production by normal and systemic sclerosis dermal fibroblasts. Arthritis Res Ther. 2006;8(1):R10.

89. Gasparini G, Cozzani E, Parodi A. Interleukin-4 and interleukin-13 as possible therapeutic targets in systemic sclerosis. Cytokine. janv 2020;125:154799.

90. Yang X, Yang J, Xing X, Wan L, Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. Arthritis Res Ther. 7 janv 2014;16(1):R4.

91. Ugor E, Simon D, Almanzar G, Pap R, Najbauer J, Németh P, et al. Increased proportions of functionally impaired regulatory T cell subsets in systemic sclerosis. Clin Immunol. nov 2017;184:54-62.

92. Hur J, Yang HM, Yoon CH, Lee CS, Park KW, Kim JH, et al. Identification of a Novel Role of T Cells in Postnatal Vasculogenesis: Characterization of Endothelial Progenitor Cell Colonies. Circulation. 9 oct 2007;116(15):1671-82.

93. Jin W, Zheng Y, Zhu P. T cell abnormalities in systemic sclerosis. Autoimmunity Reviews. nov 2022;21(11):103185.

94. Skaug B, Khanna D, Swindell WR, Hinchcliff ME, Frech TM, Steen VD, et al. Global skin gene expression analysis of early diffuse cutaneous systemic sclerosis shows a prominent innate and adaptive inflammatory profile. Ann Rheum Dis. mars 2020;79(3):379-86.

95. Matsushita T, Kobayashi T, Mizumaki K, Kano M, Sawada T, Tennichi M, et al. BAFF inhibition attenuates fibrosis in scleroderma by modulating the regulatory and effector B cell balance. Sci Adv. juill 2018;4(7):eaas9944.

96. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. Am J Pathol. juin 2008;172(6):1650-63.

97. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. J Clin Invest. juin 2002;109(11):1453-62.

98. Numajiri H, Kuzumi A, Fukasawa T, Ebata S, Yoshizaki-Ogawa A, Asano Y, et al. B Cell Depletion Inhibits Fibrosis via Suppression of Profibrotic Macrophage Differentiation in a Mouse Model of Systemic Sclerosis. Arthritis Rheumatol. nov 2021;73(11):2086-95.

99. Derk CT, Jimenez SA. Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. Autoimmunity Reviews. juin 2003;2(4):181-91.

100. Mouthon L, García De La Peña-Lefebvre P, Chanseaud Y, Tamby MC, Boissier MC, Guillevin L. [Pathogenesis of systemic scleroderma: immunological aspects]. Ann Med Interne (Paris). mai 2002;153(3):167-78.

101. Ahmed SS, Tan FK. Identification of novel targets in scleroderma: update on population studies, cDNA arrays, SNP analysis, and mutations. Curr Opin Rheumatol. nov 2003;15(6):766-71.

102. Genth E, Mierau R. [Diagnostic significance of scleroderma and myositis-associated autoantibodies]. Z Rheumatol. févr 1995;54(1):39-49.

103. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. Arthritis Res Ther. 2003;5(2):80-93.

104. Hachulla E, Dubucquoi S. [Nuclear auto-antibodies: a useful tool for the diagnosis, the classification and the prognosis of systemic sclerosis]. Rev Med Interne. juin 2004;25(6):442-7.

105. Meyer O. [CREST syndrome]. Ann Med Interne (Paris). mai 2002;153(3):183-8.

106. Diot E, Valat C, Boissinot E, Giraudeau B, Asquier E, Guilmot JL, et al. [Strategy for early diagnosis of lung involvement in systemic scleroderma]. Rev Mal Respir. déc 2000;17(6):1073-80.

107. Yalaoui S, Gorgi Y, Ayed K. [Comparison of three methods for the detection of anti-SCL70 autoantibodies]. Ann Biol Clin (Paris). oct 2001;59(5):639-42.

108. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K. Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). oct 2001;40(10):1135-40.

109. Le Thi Huong null, Sauvaget F, Johanet C, De Gennes C, Raguin G, Abuaf N, et al. [Anti-Scl-70 antibodies in systemic scleroderma]. Ann Dermatol Venereol. 1990;117(2):103-7.

110. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. Curr Opin Rheumatol. nov 2003;15(6):778-84.

111. Bunn CC, Denton CP, Shi-Wen X, Knight C, Black CM. Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. Br J Rheumatol. janv 1998;37(1):15-20.

112. Harvey GR, Butts S, Rands AL, Patel Y, McHugh NJ. Clinical and serological associations with anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis. Clin Exp Immunol. août 1999;117(2):395-402.

113. Benyamine A, Bertin D, Heim X, Granel B, Bardin N. Should we look for anti-RNA polymerase III antibodies in systemic sclerosis patients with anti-centromere or anti-topoisomerase I antibodies? European Journal of Internal Medicine. oct 2017;44:e42-4.

114. Iyer-Bierhoff A, Krogh N, Tessarz P, Ruppert T, Nielsen H, Grummt I. SIRT7-Dependent Deacetylation of Fibrillarin Controls Histone H2A Methylation and rRNA Synthesis during the Cell Cycle. Cell Rep. 11 déc 2018;25(11):2946-2954.e5.

115. Mejia Otero C, Assassi S, Hudson M, Mayes MD, Estrada-Y-Martin R, Pedroza C, et al. Antifibrillarin Antibodies Are Associated with Native North American Ethnicity and Poorer Survival in Systemic Sclerosis. J Rheumatol. juin 2017;44(6):799-805.

116. Sharif R, Fritzler MJ, Mayes MD, Gonzalez EB, McNearney TA, Draeger H, et al. Anti-fibrillarin antibody in African American patients with systemic sclerosis: immunogenetics, clinical features, and survival analysis. J Rheumatol. août 2011;38(8):1622-30.

117. Benyamine A, Bertin D, Resseguier N, Heim X, Bermudez J, Launay D, et al. Quantification of Antifibrillarin (anti-U3 RNP) Antibodies: A New Insight for Patients with Systemic Sclerosis. Diagnostics (Basel). 9 juin 2021;11(6):1064.

118. Muller R, Benyamine A, Bertin D, Harlé JR, Kaplanski G, Mazodier K, et al. Characteristics of Systemic Sclerosis patients with positive anti-Th/To antibodies: About 6 patients and literature review. La Revue de Médecine Interne. juill 2020;41(7):440-5.

119. Günther J, Rademacher J, van Laar JM, Siegert E, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. Semin Immunopathol. sept 2015;37(5):529-42.

120. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, et al. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. J Clin Invest. 15 mai 1998;101(10):2029-35.

121. Wolf SI, Howat S, Abraham DJ, Pearson JD, Lawson C. Agonistic anti-ICAM-1 antibodies in scleroderma: activation of endothelial pro-inflammatory cascades. Vascul Pharmacol. 2013;59(1-2):19-26.

122. Furue M, Mitoma C, Mitoma H, Tsuji G, Chiba T, Nakahara T, et al. Pathogenesis of systemic sclerosis—current concept and emerging treatments. Immunol Res. août 2017;65(4):790-7.

123. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N, et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. PLoS Med. janv 2006;3(1):e2.

124. Lunardi C, Bason C, Navone R, Millo E, Damonte G, Corrocher R, et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. Nat Med. oct 2000;6(10):1183-6.

125. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. Autoimmun Rev. mars 2011;10(5):276-81.

126. Khaddaj Mallat R, Mathew John C, Kendrick DJ, Braun AP. The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system. Crit Rev Clin Lab Sci. 2017;54(7-8):458-70.

127. Asano Y, Sato S. Vasculopathy in scleroderma. Semin Immunopathol. sept 2015;37(5):489-500.

128. Ntelis K, Solomou EE, Sakkas L, Liossis SN, Daoussis D. The role of platelets in autoimmunity, vasculopathy, and fibrosis: Implications for systemic sclerosis. Semin Arthritis Rheum. déc 2017;47(3):409-17.

129. Baraut J, Michel L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. Autoimmunity Reviews. déc 2010;10(2):65-73.

130. Ichimura Y, Asano Y, Akamata K, Takahashi T, Noda S, Taniguchi T, et al. Fli1 deficiency contributes to the suppression of endothelial CXCL5 expression in systemic sclerosis. Arch Dermatol Res. mai 2014;306(4):331-8.

131. Mostmans Y, Cutolo M, Giddelo C, Decuman S, Melsens K, Declercq H, et al. The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: A systematic review. Autoimmunity Reviews. août 2017;16(8):774-86.

132. Fonseca C, Abraham D, Renzoni EA. Endothelin in pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. janv 2011;44(1):1-10.

133. Piera-Velazquez S, Mendoza FA, Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. J Clin Med. 11 avr 2016;5(4):45.

134. Romano E, Rosa I, Fioretto BS, Matucci-Cerinic M, Manetti M. New Insights into Profibrotic Myofibroblast Formation in Systemic Sclerosis: When the Vascular Wall Becomes the Enemy. Life (Basel). 24 juin 2021;11(7):610.

135. Manetti M, Romano E, Rosa I, Guiducci S, Bellando-Randone S, De Paulis A, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. mai 2017;76(5):924-34.

136. Distler JHW, Gay S, Distler O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). oct 2006;45 Suppl 3:iii26-27.

137. Rabquer BJ, Koch AE. Angiogenesis and vasculopathy in systemic sclerosis: evolving concepts. Curr Rheumatol Rep. févr 2012;14(1):56-63.

138. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Impaired Angiogenesis in Systemic Sclerosis: The Emerging Role of the Antiangiogenic VEGF165b Splice Variant. Trends in Cardiovascular Medicine. oct 2011;21(7):204-10.

139. Hirigoyen D, Burgos PI, Mezzano V, Duran J, Barrientos M, Saez CG, et al. Inhibition of angiogenesis by platelets in systemic sclerosis patients. Arthritis Res Ther. déc 2015;17(1):332.

140. Del Papa N, Pignataro F. The Role of Endothelial Progenitors in the Repair of Vascular Damage in Systemic Sclerosis. Front Immunol. 18 juin 2018;9:1383.

141. Reglero-Real N, Colom B, Bodkin JV, Nourshargh S. Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. oct 2016;36(10):2048-57.

142. Hou Y, Rabquer BJ, Gerber ML, Del Galdo F, Jimenez SA, Haines GK, et al. Junctional adhesion molecule-A is abnormally expressed in diffuse cutaneous systemic sclerosis skin and mediates myeloid cell adhesion. Ann Rheum Dis. janv 2010;69(1):249-54.

143. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. Clin Rheumatol. avr 2005;24(2):111-6.

144. Valim V, Assis LSS, Simões MFJ, Trevisani VFM, Pucinelli MLC, Andrade LEC. Correlation between serum E-selectin levels and panoramic nailfold capillaroscopy in systemic sclerosis. Braz J Med Biol Res. sept 2004;37(9):1423-7.

145. Bruni C, Frech T, Manetti M, Rossi FW, Furst DE, De Paulis A, et al. Vascular Leaking, a Pivotal and Early Pathogenetic Event in Systemic Sclerosis: Should the Door Be Closed? Front Immunol. 2018;9:2045.

146. Gabsi A, Heim X, Dlala A, Gati A, Sakhri H, Abidi A, et al. TH17 cells expressing CD146 are significantly increased in patients with Systemic sclerosis. Sci Rep. 27 nov 2019;9(1):17721.

147. Ito T, Tamura N, Okuda S, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, et al. Elevated serum levels of soluble CD146 in patients with systemic sclerosis. Clin Rheumatol. janv 2017;36(1):119-24.

148. Kaspi E, Heim X, Granel B, Guillet B, Stalin J, Nollet M, et al. Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis. J Allergy Clin Immunol. nov 2017;140(5):1448-1451.e6.

149. Nollet M, Bachelier R, Joshkon A, Traboulsi W, Mahieux A, Moyon A, et al. Involvement of Multiple Variants of Soluble CD146 in Systemic Sclerosis: Identification of a Novel Profibrotic Factor. Arthritis Rheumatol. juin 2022;74(6):1027-38.

150. Gomes RN, Manuel F, Nascimento DS. The bright side of fibroblasts: molecular signature and regenerative cues in major organs. npj Regen Med. 10 août 2021;6(1):43.

151. Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, Keene DR, He R, Adams HP, et al. Postnatal induction of transforming growth factor β signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. Arthritis Rheum. janv 2007;56(1):334-44.

152. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. J Clin Invest. août 2004;114(3):438-46.

153. Duffield JS, Lupher M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. Annu Rev Pathol. 24 janv 2013;8:241-76.

154. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. Nat Rev Rheumatol. 25 oct 2011;8(1):42-54.

155. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. J Clin Invest. oct 1974;54(4):880-9.

156. Bergmann C, Brandt A, Merlevede B, Hallenberger L, Dees C, Wohlfahrt T, et al. The histone demethylase Jumonji domain-containing protein 3 (JMJD3) regulates fibroblast activation in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. janv 2018;77(1):150-8.

157. Krämer M, Dees C, Huang J, Schlottmann I, Palumbo-Zerr K, Zerr P, et al. Inhibition of H3K27 histone trimethylation activates fibroblasts and induces fibrosis. Ann Rheum Dis. avr 2013;72(4):614-20.

158. Reich N, Maurer B, Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Zerr P, et al. The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. janv 2010;62(1):280-90.

159. Gur C, Wang SY, Sheban F, Zada M, Li B, Kharouf F, et al. LGR5 expressing skin fibroblasts define a major cellular hub perturbed in scleroderma. Cell. 14 avr 2022;185(8):1373-1388.e20.

160. Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, et al. Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. Hepatology. mars 2003;37(3):528-33.

161. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Constitutive phosphorylation of focal adhesion kinase is involved in the myofibroblast differentiation of scleroderma fibroblasts. J Invest Dermatol. mai 2005;124(5):886-92.

162. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. Front Pharmacol. 2014;5:123.

163. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. Front Immunol. 2014;5:491.

164. Ihn H. Autocrine TGF-beta signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. J Dermatol Sci. févr 2008;49(2):103-13.

165. Hinz B, Lagares D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. Nat Rev Rheumatol. janv 2020;16(1):11-31.

166. Lagares D, Santos A, Grasberger PE, Liu F, Probst CK, Rahimi RA, et al. Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis. Sci Transl Med. 13 déc 2017;9(420):eaal3765.

167. Jain R, Shaul PW, Borok Z, Willis BC. Endothelin-1 Induces Alveolar Epithelial–Mesenchymal Transition through Endothelin Type A Receptor–Mediated Production of TGF-β1. Am J Respir Cell Mol Biol. juill 2007;37(1):38-47.

168. Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. Proc Am Thorac Soc. juin 2006;3(4):377-82.

169. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops *in vivo* during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci USA. 29 août 2006;103(35):13180-5.

170. Zhou G, Dada LA, Wu M, Kelly A, Trejo H, Zhou Q, et al. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. déc 2009;297(6):L1120-1130.

171. Li Z, Jimenez SA. Protein kinase Cδ and c-Abl kinase are required for transforming growth factor β induction of endothelial-mesenchymal transition in vitro. Arthritis Rheum. août 2011;63(8):2473-83.

172. Reka AK, Kurapati H, Narala VR, Bommer G, Chen J, Standiford TJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition. Mol Cancer Ther. déc 2010;9(12):3221-32.

173. Tan X, Dagher H, Hutton CA, Bourke JE. Effects of PPAR gamma ligands on TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. Respir Res. 23 févr 2010;11(1):21.

174. Oshikawa J, Kim SJ, Furuta E, Caliceti C, Chen GF, McKinney RD, et al. Novel role of p66Shc in ROS-dependent VEGF signaling and angiogenesis in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1 févr 2012;302(3):H724-732.

175. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol. mars 2004;4(3):181-9.

176. Ahmarani L, Avedanian L, Al-Khoury J, Perreault C, Jacques D, Bkaily G. Whole-cell and nuclear NADPH oxidases levels and distribution in human endocardial endothelial, vascular smooth muscle, and vascular endothelial cells. Can J Physiol Pharmacol. janv 2013;91(1):71-9.

177. Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. Cardiovasc Res. 15 juill 2006;71(2):226-35.

178. Khatri JJ, Johnson C, Magid R, Lessner SM, Laude KM, Dikalov SI, et al. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. Circulation. 3 févr 2004;109(4):520-5.

179. Datla SR, Peshavariya H, Dusting GJ, Mahadev K, Goldstein BJ, Jiang F. Important role of Nox4 type NADPH oxidase in angiogenic responses in human microvascular endothelial cells in vitro. Arterioscler Thromb Vasc Biol. nov 2007;27(11):2319-24.

180. Zhang M, Brewer AC, Schröder K, Santos CXC, Grieve DJ, Wang M, et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 19 oct 2010;107(42):18121-6.

181. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. N Engl J Med. 7 mai 2009;360(19):1989-2003.

182. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. Nat Med. sept 2009;15(9):1077-81.

183. Servettaz A, Guilpain P, Goulvestre C, Chéreau C, Hercend C, Nicco C, et al. Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. sept 2007;66(9):1202-9.

184. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. N Engl J Med. 22 juin 2006;354(25):2667-76.

185. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. J Clin Invest. mars 2007;117(3):557-67.

186. Labus MB, Stirk CM, Thompson WD, Melvin WT. Expression of Wnt genes in early wound healing. Wound Repair Regen. 1998;6(1):58-64.

187. Yardy GW, Brewster SF. Wnt signalling and prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2005;8(2):119-26.

188. Sato M. Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids. Acta Derm Venereol. 2006;86(4):300-7.

189. Wang X, Xiao Y, Mou Y, Zhao Y, Blankesteijn WM, Hall JL. A role for the beta-catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling. Circ Res. 22 févr 2002;90(3):340-7.

190. Königshoff M, Balsara N, Pfaff EM, Kramer M, Chrobak I, Seeger W, et al. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One. 14 mai 2008;3(5):e2142.

191. Qin K, Yu M, Fan J, Wang H, Zhao P, Zhao G, et al. Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. Genes Dis. janv 2024;11(1):103-34.

192. Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. Nature. mai 2012;485(7397):195-200.

193. Huang SMA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. Nature. oct 2009;461(7264):614-20.

194. Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 1 mars 2013;5(3):a015081-a015081.

195. Clevers H, Nusse R. Wnt/β-Catenin Signaling and Disease. Cell. juin 2012;149(6):1192-205.

196. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β-Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context. Arias AM, éditeur. PLoS Biol. 4 avr 2006;4(4):e115.

197. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. Developmental Cell. juill 2009;17(1):9-26.

198. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. juill 2009;10(7):468-77.

199. Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Riehle KJ, Hubbert C, Major MB, Fausto N, et al. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. Development. 1 févr 2007;134(3):479-89.

200. Dees C, Schlottmann I, Funke R, Distler A, Palumbo-Zerr K, Zerr P, et al. The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. juin 2014;73(6):1232-9.

201. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. Proc Natl Acad Sci USA. 14 oct 2003;100(21):12319-24.

202. Bayle J, Fitch J, Jacobsen K, Kumar R, Lafyatis R, Lemaire R. Increased expression of Wnt2 and SFRP4 in Tsk mouse skin: role of Wnt signaling in altered dermal fibrillin deposition and systemic sclerosis. J Invest Dermatol. avr 2008;128(4):871-81.

203. Beyer C, Schramm A, Akhmetshina A, Dees C, Kireva T, Gelse K, et al. β-catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. mai 2012;71(5):761-7.

204. Ren S, Johnson BG, Kida Y, Ip C, Davidson KC, Lin SL, et al. LRP-6 is a coreceptor for multiple fibrogenic signaling pathways in pericytes and myofibroblasts that are inhibited by DKK-1. Proc Natl Acad Sci USA. 22 janv 2013;110(4):1440-5.

205. Wei J, Fang F, Lam AP, Sargent JL, Hamburg E, Hinchcliff ME, et al. Wnt/β-catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells. Arthritis Rheum. août 2012;64(8):2734-45.

206. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-β-mediated fibrosis. Nat Commun. 13 mars 2012;3(1):735.

207. Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R, et al. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? Arthritis Rheum. juin 2011;63(6):1707-17.

208. Distler A, Ziemer C, Beyer C, Lin NY, Chen CW, Palumbo-Zerr K, et al. Inactivation of evenness interrupted (EVI) reduces experimental fibrosis by combined inhibition of canonical and non-canonical Wnt signalling. Ann Rheum Dis. mars 2014;73(3):624-7.

209. Hamburg-Shields E, DiNuoscio GJ, Mullin NK, Lafyatis R, Atit RP. Sustained β-catenin activity in dermal fibroblasts promotes fibrosis by up-regulating expression of extracellular matrix protein-coding genes. The Journal of Pathology. avr 2015;235(5):686-97.

210. Bergmann C, Akhmetshina A, Dees C, Palumbo K, Zerr P, Beyer C, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 induces dermal fibrosis by activation of the canonical Wnt pathway. Annals of the Rheumatic Diseases. 1 déc 2011;70(12):2191-8.

211. Carthy JM, Garmaroudi FS, Luo Z, McManus BM. Wnt3a Induces Myofibroblast Differentiation by Upregulating TGF-β Signaling Through SMAD2 in a β-Catenin-Dependent Manner. Gottardi C, éditeur. PLoS ONE. 18 mai 2011;6(5):e19809.

212. Shin SY, Kim CG, Jho EH, Rho MS, Kim YS, Kim YH, et al. Hydrogen peroxide negatively modulates Wnt signaling through downregulation of beta-catenin. Cancer Lett. 30 août 2004;212(2):225-31.

213. Funato Y, Miki H. Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin. Free Radic Res. avr 2010;44(4):379-88.

214. Funato Y, Terabayashi T, Sakamoto R, Okuzaki D, Ichise H, Nojima H, et al. Nucleoredoxin sustains Wnt/β-catenin signaling by retaining a pool of inactive dishevelled protein. Curr Biol. 9 nov 2010;20(21):1945-52.

215. Kajla S, Mondol AS, Nagasawa A, Zhang Y, Kato M, Matsuno K, et al. A crucial role for Nox 1 in redox-dependent regulation of Wnt-β-catenin signaling. FASEB J. mai 2012;26(5):2049-59.

216. Myant KB, Cammareri P, McGhee EJ, Ridgway RA, Huels DJ, Cordero JB, et al. ROS production and NF-κB activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. Cell Stem Cell. 6 juin 2013;12(6):761-73.

217. Xu Z, Ding W, Deng X. PM2.5, Fine Particulate Matter: A Novel Player in the Epithelial-Mesenchymal Transition? Front Physiol. 2019;10:1404.

218. An R, Wang X, Yang L, Zhang J, Wang N, Xu F, et al. Polystyrene microplastics cause granulosa cells apoptosis and fibrosis in ovary through oxidative stress in rats. Toxicology. 15 févr 2021;449:152665.

219. Andersson-Sjöland A, Karlsson JC, Rydell-Törmänen K. ROS-induced endothelial stress contributes to pulmonary fibrosis through pericytes and Wnt signaling. Lab Invest. févr 2016;96(2):206-17.

220. Yu Y, Guan X, Nie L, Liu Y, He T, Xiong J, et al. DNA hypermethylation of sFRP5 contributes to indoxyl sulfate-induced renal fibrosis. J Mol Med (Berl). juin 2017;95(6):601-13.

221. Svegliati S, Marrone G, Pezone A, Spadoni T, Grieco A, Moroncini G, et al. Oxidative DNA damage induces the ATM-mediated transcriptional suppression of the Wnt inhibitor WIF-1 in systemic sclerosis and fibrosis. Sci Signal [Internet]. 2 sept 2014 [cité 28 déc 2023];7(341). Disponible sur: https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2004592

222. Morin F, Kavian N, Nicco C, Cerles O, Chéreau C, Batteux F. Niclosamide Prevents Systemic Sclerosis in a Reactive Oxygen Species-Induced Mouse Model. J Immunol. 15 oct 2016;197(8):3018-28.

223. Lehmann JM, Holzmann B, Breitbart EW, Schmiegelow P, Riethmüller G, Johnson JP. Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. Cancer Res. 1 févr 1987;47(3):841-5.

224. Kishimoto T, éditeur. Leucocyte typing VI: white cell differentiation antigens: proceedings of the sixth international workshop and conference held in Kobe, Japan, 10-14 November 1996. New York: Garland Pub; 1998. 1342 p.

225. Kuske MD, Johnson JP. Assignment of the human melanoma cell adhesion molecule gene (MCAM) to chromosome 11 band q23.3 by radiation hybrid mapping. Cytogenet Cell Genet. 1999;87(3-4):258.

226. Sers C, Kirsch K, Rothbächer U, Riethmüller G, Johnson JP. Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. Proc Natl Acad Sci USA. 15 sept 1993;90(18):8514-8.

227. Vainio O, Dunon D, Aïssi F, Dangy JP, McNagny KM, Imhof BA. HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit+ hemopoietic progenitors. J Cell Biol. déc 1996;135(6 Pt 1):1655-68.

228. Campbell IG, Foulkes WD, Senger G, Trowsdale J, Garin-Chesa P, Rettig WJ. Molecular cloning of the B-CAM cell surface glycoprotein of epithelial cancers: a novel member of the immunoglobulin superfamily. Cancer Res. 15 nov 1994;54(22):5761-5.

229. Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, et al. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. J Exp Med. 1 juin 1995;181(6):2213-20.

230. Peduzzi JD, Irwin MH, Geisert EE. Distribution and characteristics of a 90 kDa protein, KG-CAM, in the rat CNS. Brain Res. 21 mars 1994;640(1-2):296-307.

231. Taira E, Takaha N, Taniura H, Kim CH, Miki N. Molecular cloning and functional expression of gicerin, a novel cell adhesion molecule that binds to neurite outgrowth factor. Neuron. avr 1994;12(4):861-72.

232. Yang H, Wang SW, Liu Z, Wu MWH, McAlpine B, Ansel J, et al. Isolation and characterization of mouse MUC18 cDNA gene, and correlation of MUC18 expression in mouse melanoma cell lines with metastatic ability. Gene. mars 2001;265(1-2):133-45.

233. Mintz-Weber CS, Johnson JP. Identification of the Elements Regulating the Expression of the Cell Adhesion Molecule MCAM/MUC18. Journal of Biological Chemistry. nov 2000;275(44):34672-80.

234. Lehmann JM, Riethmüller G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A. déc 1989;86(24):9891-5.

235. Kohama K, Tsukamoto Y, Furuya M, Okamura K, Tanaka H, Miki N, et al. Molecular cloning and analysis of the mouse gicerin gene. Neurochemistry International. mai 2005;46(6):465-70.

236. Lei X, Guan CW, Song Y, Wang H. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. Cancer Cell Int. 2015;15(1):3.

237. Rapanotti MC, Cugini E, Nuccetelli M, Terrinoni A, Di Raimondo C, Lombardo P, et al. MCAM/MUC18/CD146 as a Multifaceted Warning Marker of Melanoma Progression in Liquid Biopsy. IJMS. 17 nov 2021;22(22):12416.

238. Wang W, Runkle KB, Terkowski SM, Ekaireb RI, Witze ES. Protein Depalmitoylation Is Induced by Wnt5a and Promotes Polarized Cell Behavior. J Biol Chem. 19 juin 2015;290(25):15707-16.

239. Sadeghi RS, Kulej K, Kathayat RS, Garcia BA, Dickinson BC, Brady DC, et al. Wnt5a signaling induced phosphorylation increases APT1 activity and promotes melanoma metastatic behavior. Elife. 12 avr 2018;7:e34362.

240. Guezguez B, Vigneron P, Alais S, Jaffredo T, Gavard J, Mège RM, et al. A dileucine motif targets MCAM-l cell adhesion molecule to the basolateral membrane in MDCK cells. FEBS Letters. 26 juin 2006;580(15):3649-56.

241. Colomb F, Wang W, Simpson D, Zafar M, Beynon R, Rhodes JM, et al. Galectin-3 interacts with the cell-surface glycoprotein CD146 (MCAM, MUC18) and induces secretion of metastasis-promoting cytokines from vascular endothelial cells. J Biol Chem. 19 2017;292(20):8381-9.

242. Bu P, Zhuang J, Feng J, Yang D, Shen X, Yan X. Visualization of CD146 dimerization and its regulation in living cells. Biochim Biophys Acta. avr 2007;1773(4):513-20.

243. Zheng C, Qiu Y, Zeng Q, Zhang Y, Lu D, Yang D, et al. Endothelial CD146 is required for in vitro tumor-induced angiogenesis: the role of a disulfide bond in signaling and dimerization. Int J Biochem Cell Biol. nov 2009;41(11):2163-72.

244. Bardin N, Moal V, Anfosso F, Daniel L, Brunet P, Sampol J, et al. Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. Thromb Haemost. nov 2003;90(5):915-20.

245. Duan H, Luo Y, Hao H, Feng L, Zhang Y, Lu D, et al. Soluble CD146 in cerebrospinal fluid of active multiple sclerosis. Neuroscience. 3 avr 2013;235:16-26.

246. Boneberg EM, Illges H, Legler DF, Fürstenberger G. Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process. Microvasc Res. déc 2009;78(3):325-31.

247. Chen J, Luo Y, Hui H, Cai T, Huang H, Yang F, et al. CD146 coordinates brain endothelial cell–pericyte communication for blood–brain barrier development. Proc Natl Acad Sci USA [Internet]. 5 sept 2017 [cité 11 déc 2023];114(36). Disponible sur: https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1710848114

248. Bardin N, Anfosso F, Massé JM, Cramer E, Sabatier F, Bivic AL, et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. Blood. 15 déc 2001;98(13):3677-84.

249. Bernaudin JF, Kambouchner M, Lacave R. La circulation lymphatique, structure des vaisseaux, développement, formation de la lymphe. Revue générale. Revue de Pneumologie Clinique. avr 2013;69(2):93-101.

250. Amatschek S, Kriehuber E, Bauer W, Reininger B, Meraner P, Wolpl A, et al. Blood and lymphatic endothelial cell-specific differentiation programs are stringently controlled by the tissue environment. Blood. 1 juin 2007;109(11):4777-85.

251. Nanni M, Rütsche D, Bächler C, Pontiggia L, Klar AS, Moehrlen U, et al. CD146 expression profile in human skin and pre-vascularized dermo-epidermal skin substitutes in vivo. J Biol Eng. 31 janv 2023;17(1):9.

252. Yan H, Zhang C, Wang Z, Tu T, Duan H, Luo Y, et al. CD146 is required for VEGF-C-induced lymphatic sprouting during lymphangiogenesis. Sci Rep. 7 août 2017;7(1):7442.

253. Espagnolle N, Guilloton F, Deschaseaux F, Gadelorge M, Sensébé L, Bourin P. CD 146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. J Cell Mol Med. janv 2014;18(1):104-14.

254. Nakai T, Sakai D, Nakamura Y, Nukaga T, Grad S, Li Z, et al. CD146 defines commitment of cultured annulus fibrosus cells to express a contractile phenotype. J Orthop Res. août 2016;34(8):1361-72.

255. Du J, Guo W, Häckel S, Hoppe S, Garcia JP, Alini M, et al. The function of CD146 in human annulus fibrosus cells and mechanism of the regulation by TGF-β. J Orthop Res. juill 2022;40(7):1661-71.

256. Errede M, Mangieri D, Longo G, Girolamo F, De Trizio I, Vimercati A, et al. Tunneling nanotubes evoke pericyte/endothelial communication during normal and tumoral angiogenesis. Fluids Barriers CNS. déc 2018;15(1):28.

257. Kim JM, Hong KS, Song WK, Bae D, Hwang IK, Kim JS, et al. Perivascular Progenitor Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells Exhibit Functional Characteristics of Pericytes and Improve the Retinal Vasculature in a Rodent Model of Diabetic Retinopathy. Stem Cells Transl Med. sept 2016;5(9):1268-76.

258. Davaine JM, Quillard T, Brion R, Lapérine O, Guyomarch B, Merlini T, et al. Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability. PLoS One. 2014;9(9):e107642.

259. Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. Exp Hematol. août 2008;36(8):1035-46.

260. Harkness L, Zaher W, Ditzel N, Isa A, Kassem M. CD146/MCAM defines functionality of human bone marrow stromal stem cell populations. Stem Cell Res Ther. 11 janv 2016;7:4.

261. Wu CC, Liu FL, Sytwu HK, Tsai CY, Chang DM. CD146+ mesenchymal stem cells display greater therapeutic potential than CD146- cells for treating collagen-induced arthritis in mice. Stem Cell Res Ther. 3 févr 2016;7:23.

262. Hörl S, Ejaz A, Ernst S, Mattesich M, Kaiser A, Jenewein B, et al. CD146 (MCAM) in human cs-DLK1−/cs-CD34+ adipose stromal/progenitor cells. Stem Cell Research. juill 2017;22:1-12.

263. Wu Z, Liu J, Chen G, Du J, Cai H, Chen X, et al. CD146 is a Novel ANGPTL2 Receptor that Promotes Obesity by Manipulating Lipid Metabolism and Energy Expenditure. Advanced Science. mars 2021;8(6):2004032.

264. von Ahrens D, Bhagat TD, Nagrath D, Maitra A, Verma A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. J Hematol Oncol. 28 mars 2017;10(1):76.

265. Kobayashi H, Gieniec KA, Lannagan TRM, Wang T, Asai N, Mizutani Y, et al. The Origin and Contribution of Cancer-Associated Fibroblasts in Colorectal Carcinogenesis. Gastroenterology. mars 2022;162(3):890-906.

266. Zheng B, Ohuchida K, Chijiiwa Y, Zhao M, Mizuuchi Y, Cui L, et al. CD146 attenuation in cancer-associated fibroblasts promotes pancreatic cancer progression. Mol Carcinog. nov 2016;55(11):1560-72.

267. Brechbuhl HM, Barrett AS, Kopin E, Hagen JC, Han AL, Gillen AE, et al. Fibroblast subtypes define a metastatic matrisome in breast cancer. JCI Insight. 27 févr 2020;5(4):130751.

268. Heim X, Bermudez J, Joshkon A, Kaspi E, Bachelier R, Nollet M, et al. CD146 at the Interface between Oxidative Stress and the Wnt Signaling Pathway in Systemic Sclerosis. J Invest Dermatol. déc 2022;142(12):3200-3210.e5.

269. Seftalioğlu A, Karakoç L. Expression of CD146 adhesion molecules (MUC18 or MCAM) in the thymic microenvironment. Acta Histochem. févr 2000;102(1):69-83.

270. Elshal MF, Khan SS, Takahashi Y, Solomon MA, McCoy JP. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. Blood. 15 oct 2005;106(8):2923-4.

271. Pickl WF, Majdic O, Fischer GF, Petzelbauer P, Faé I, Waclavicek M, et al. MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. J Immunol. 1 mars 1997;158(5):2107-15.

272. Schön M, Kähne T, Gollnick H, Schön MP. Expression of gp130 in tumors and inflammatory disorders of the skin: formal proof of its identity as CD146 (MUC18, Mel-CAM). J Invest Dermatol. août 2005;125(2):353-63.

273. Kamiyama T, Watanabe H, Iijima M, Miyazaki A, Iwamoto S. Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells. J Dermatol. oct 2012;39(10):838-42.

274. Mehta NN, Dagur PK, Rose SM, Naik HB, Stansky E, Doveikis J, et al. IL-17A production in human psoriatic blood and lesions by CD146+ T cells. J Invest Dermatol. janv 2015;135(1):311-4.

275. Dagur PK, Tatlici G, Gourley M, Samsel L, Raghavachari N, Liu P, et al. CD146+ T lymphocytes are increased in both the peripheral circulation and in the synovial effusions of patients with various musculoskeletal diseases and display pro-inflammatory gene profiles. Cytometry B Clin Cytom. mars 2010;78(2):88-95.

276. Schneider-Hohendorf T, Rossaint J, Mohan H, Böning D, Breuer J, Kuhlmann T, et al. VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. J Exp Med. 25 août 2014;211(9):1833-46.

277. Olajuyin AM, Olajuyin AK, Wang Z, Zhao X, Zhang X. CD146 T cells in lung cancer: its function, detection, and clinical implications as a biomarker and therapeutic target. Cancer Cell Int. déc 2019;19(1):247.

278. Despoix N, Walzer T, Jouve N, Blot-Chabaud M, Bardin N, Paul P, et al. Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. Eur J Immunol. oct 2008;38(10):2855-64.

279. Dunon D, Allioli N, Vainio O, Ody C, Imhof BA. Renewal of thymocyte progenitors and emigration of thymocytes during avian development. Developmental & Comparative Immunology. mai 1998;22(3):279-87.

280. Dunon D, Allioli N, Vainio O, Ody C, Imhof BA. Quantification of T-Cell Progenitors During Ontogeny: Thymus Colonization Depends on Blood Delivery of Progenitors. Blood. 1 avr 1999;93(7):2234-43.

281. Blin MG, Bachelier R, Fallague K, Moussouni K, Aurrand-Lions M, Fernandez S, et al. CD146 deficiency promotes plaque formation in a mouse model of atherosclerosis by enhancing RANTES secretion and leukocyte recruitment. J Mol Cell Cardiol. mai 2019;130:76-87.

282. Luo Y, Duan H, Qian Y, Feng L, Wu Z, Wang F, et al. Macrophagic CD146 promotes foam cell formation and retention during atherosclerosis. Cell Res. mars 2017;27(3):352-72.

283. Wu Q, Case SR, Minor MN, Jiang D, Martin RJ, Bowler RP, et al. A novel function of MUC18: amplification of lung inflammation during bacterial infection. Am J Pathol. mars 2013;182(3):819-27.

284. Liu Q, Zhang B, Zhao X, Zhang Y, Liu Y, Yan X. Blockade of adhesion molecule CD146 causes pregnancy failure in mice. J Cell Physiol. juin 2008;215(3):621-6.

285. Lee Y, Kim KR, McKeon F, Yang A, Boyd TK, Crum CP, et al. A unifying concept of trophoblastic differentiation and malignancy defined by biomarker expression. Human Pathology. juill 2007;38(7):1003-13.

286. Cierna Z, Varga I, Danihel L, Kuracinova K, Janegova A, Danihel L. Intermediate trophoblast--A distinctive, unique and often unrecognized population of trophoblastic cells. Ann Anat. mars 2016;204:45-50.

287. Shih I, Wang T, Wu T, Kurman RJ, Gearhart JD. Expression of Mel-CAM in implantation site intermediate trophoblastic cell line, IST-1, limits its migration on uterine smooth muscle cells. J Cell Sci. sept 1998;111 (Pt 17):2655-64.

288. Wang H bo, Du X, Xu Y hui, Wang Z hua. Identification of CD146 Expression in Human and Mouse Preimplantation Embryo. Journal of Reproduction and Contraception. mars 2008;19(1):17-26.

289. Bouvier S, Paulmyer-Lacroix O, Molinari N, Bertaud A, Paci M, Leroyer A, et al. Soluble CD146, an innovative and non-invasive biomarker of embryo selection for in vitro fertilization. PLoS One. 2017;12(3):e0173724.

290. Pruszak J, Sonntag KC, Aung MH, Sanchez-Pernaute R, Isacson O. Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations. Stem Cells. sept 2007;25(9):2257-68.

291. Fayazi M, Salehnia M, Ziaei S. Differentiation of human CD146-positive endometrial stem cells to adipogenic-, osteogenic-, neural progenitor-, and glial-like cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim. avr 2015;51(4):408-14.

292. Taira E, Kohama K, Tsukamoto Y, Okumura S, Miki N. Characterization of Gicerin/MUC18/CD146 in the rat nervous system. J Cell Physiol. mars 2004;198(3):377-87.

293. Tu T, Gao Q, Luo Y, Chen J, Lu D, Feng J, et al. CD146 deletion in the nervous system impairs appetite, locomotor activity and spatial learning in mice. PLoS ONE. 2013;8(9):e74124.

294. Taira E, Nagino T, Tsukamoto Y, Ding Y, Sakuma S, Miki N. Neurite promotion from ciliary ganglion neurons by gicerin. Neurochem Int. janv 1998;32(1):23-9.

295. Shen Y, Zhu J, Liu Q, Ding S, Dun X, He J. Up-Regulation of CD146 in Schwann Cells Following Peripheral Nerve Injury Modulates Schwann Cell Function in Regeneration. Front Cell Neurosci. 2021;15:743532.

296. Xiao L, Ide R, Saiki C, Kumazawa Y, Okamura H. Human Dental Pulp Cells Differentiate toward Neuronal Cells and Promote Neuroregeneration in Adult Organotypic Hippocampal Slices In Vitro. Int J Mol Sci. 11 août 2017;18(8).

297. Sers C, Riethmüller G, Johnson JP. MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread. Cancer Res. 1 nov 1994;54(21):5689-94.

298. Anfosso F, Bardin N, Vivier E, Sabatier F, Sampol J, Dignat-George F. Outside-in Signaling Pathway Linked to CD146 Engagement in Human Endothelial Cells. Journal of Biological Chemistry. janv 2001;276(2):1564-9.

299. Wu GJ, Varma VA, Wu MW, Wang SW, Qu P, Yang H, et al. Expression of a human cell adhesion molecule, MUC18, in prostate cancer cell lines and tissues. Prostate. 15 sept 2001;48(4):305-15.

300. Ueno K, Hirata H, Majid S, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R. IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma. Int J Cancer. 15 nov 2011;129(10):2360-9.

301. Cavazzini F, Campioni D, Ferrari L, Buldini B, Bardi MA, Michielotto B, et al. Expression of the immunoglobulin superfamily cell membrane adhesion molecule Cd146 in acute leukemia: Cd146 EXPRESSION IN ACUTE LEUKEMIA. Cytometry. mai 2016;90(3):247-56.

302. Imbert AM, Garulli C, Choquet E, Koubi M, Aurrand-Lions M, Chabannon C. CD146 Expression in Human Breast Cancer Cell Lines Induces Phenotypic and Functional Changes Observed in Epithelial to Mesenchymal Transition. De Wever O, éditeur. PLoS ONE. 30 août 2012;7(8):e43752.

303. Minato H, Kurose N, Fukushima M, Nojima T, Usuda K, Sagawa M, et al. Comparative Immunohistochemical Analysis of IMP3, GLUT1, EMA, CD146, and Desmin for Distinguishing Malignant Mesothelioma From Reactive Mesothelial Cells. American Journal of Clinical Pathology. 1 janv 2014;141(1):85-93.

304. Wragg JW, Finnity JP, Anderson JA, Ferguson HJM, Porfiri E, Bhatt RI, et al. MCAM and LAMA4 Are Highly Enriched in Tumor Blood Vessels of Renal Cell Carcinoma and Predict Patient Outcome. Cancer Research. 15 avr 2016;76(8):2314-26.

305. Zeng G fang, Cai S xi, Wu GJ. Up-regulation of METCAM/MUC18 promotes motility, invasion, and tumorigenesis of human breast cancer cells. BMC Cancer. déc 2011;11(1):113.

306. Stalin J, Traboulsi W, Vivancos-Stalin L, Nollet M, Joshkon A, Bachelier R, et al. Therapeutic targeting of soluble CD146/MCAM with the M2J-1 monoclonal antibody prevents metastasis development and procoagulant activity in CD146-positive invasive tumors. Int J Cancer. 15 sept 2020;147(6):1666-79.

307. Dufies M, Nollet M, Ambrosetti D, Traboulsi W, Viotti J, Borchiellini D, et al. Soluble CD146 is a predictive marker of pejorative evolution and of sunitinib efficacy in clear cell renal cell carcinoma. Theranostics. 2018;8(9):2447-58.

308. Joshkon A, Heim X, Dubrou C, Bachelier R, Traboulsi W, Stalin J, et al. Role of CD146 (MCAM) in Physiological and Pathological Angiogenesis—Contribution of New Antibodies for Therapy. Biomedicines. 19 déc 2020;8(12):633.

309. Solovey AN, Gui L, Chang L, Enenstein J, Browne PV, Hebbel RP. Identification and functional assessment of endothelial P1H12. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. nov 2001;138(5):322-31.

310. Wang D, Duan H, Feng J, Xiang J, Feng L, Liu D, et al. Soluble CD146, a cerebrospinal fluid marker for neuroinflammation, promotes blood-brain barrier dysfunction. Theranostics. 2020;10(1):231-46.

311. Chan B, Sinha S, Cho D, Ramchandran R, Sukhatme VP. Critical roles of CD146 in zebrafish vascular development. Dev Dyn. janv 2005;232(1):232-44.

312. So JH, Hong SK, Kim HT, Jung SH, Lee MS, Choi JH, et al. Gicerin/Cd146 is involved in zebrafish cardiovascular development and tumor angiogenesis: Gicerin/Cd146 function in angiogenesis. Genes to Cells. nov 2010;15(11):1099-110.

313. Yan X. A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. Blood. 20 mars 2003;102(1):184-91.

314. Halt KJ, Pärssinen HE, Junttila SM, Saarela U, Sims-Lucas S, Koivunen P, et al. CD146 + cells are essential for kidney vasculature development. Kidney International. août 2016;90(2):311-24.

315. Jouve N, Despoix N, Espeli M, Gauthier L, Cypowyj S, Fallague K, et al. The involvement of CD146 and its novel ligand Galectin-1 in apoptotic regulation of endothelial cells. J Biol Chem. 25 janv 2013;288(4):2571-9.

316. Tu T, Zhang C, Yan H, Luo Y, Kong R, Wen P, et al. CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development. Cell Res. mars 2015;25(3):275-87.

317. Harhouri K, Kebir A, Guillet B, Foucault-Bertaud A, Voytenko S, Piercecchi-Marti MD, et al. Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia. Blood. 6 mai 2010;115(18):3843-51.

318. Gao Q, Zhang J, Wang X, Liu Y, He R, Liu X, et al. The signalling receptor MCAM coordinates apical-basal polarity and planar cell polarity during morphogenesis. Nat Commun. 7 juin 2017;8:15279.

319. Ye Z, Zhang C, Tu T, Sun M, Liu D, Lu D, et al. Wnt5a uses CD146 as a receptor to regulate cell motility and convergent extension. Nat Commun. 2013;4:2803.

320. Kaspi E, Guillet B, Piercecchi-Marti MD, Alfaidy N, Bretelle F, Bertaud-Foucault A, et al. Identification of soluble CD146 as a regulator of trophoblast migration: potential role in placental vascular development. Angiogenesis. avr 2013;16(2):329-42.

321. Bouvier S, Traboulsi W, Blois SM, Demattei C, Joshkon A, Mousty E, et al. Soluble CD146 is increased in preeclampsia and interacts with galectin-1 to regulate trophoblast migration through VEGFR2 receptor. F S Sci. févr 2022;3(1):84-94.

322. Bardin N, Blot-Chabaud M, Despoix N, Kebir A, Harhouri K, Arsanto JP, et al. CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol. mai 2009;29(5):746-53.

323. Kratzer A, Chu HW, Salys J, Moumen Z, Leberl M, Bowler R, et al. Endothelial cell adhesion molecule CD146: implications for its role in the pathogenesis of COPD: CD146 in the pathogenesis of COPD. J Pathol. août 2013;230(4):388-98.

324. Duan H, Xing S, Luo Y, Feng L, Gramaglia I, Zhang Y, et al. Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS. Sci Rep. 2013;3:1687.

325. Larochelle C, Lécuyer MA, Alvarez JI, Charabati M, Saint-Laurent O, Ghannam S, et al. Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. Ann Neurol. juill 2015;78(1):39-53.

326. Raychaudhuri SK, Abria C, Raychaudhuri SP. Phenotype and pathological significance of MCAM+ (CD146+) T cell subset in psoriatic arthritis. Mol Biol Rep. oct 2021;48(10):6787-96.

327. Guezguez B, Vigneron P, Lamerant N, Kieda C, Jaffredo T, Dunon D. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. J Immunol. 15 nov 2007;179(10):6673-85.

328. Okumura S, Muraoka O, Tsukamoto Y, Tanaka H, Kohama K, Miki N, et al. Involvement of Gicerin in the Extension of Microvilli. Experimental Cell Research. déc 2001;271(2):269-76.

329. Witze ES, Litman ES, Argast GM, Moon RT, Ahn NG. Wnt5a Control of Cell Polarity and Directional Movement by Polarized Redistribution of Adhesion Receptors. Science. 18 avr 2008;320(5874):365-9.

330. Luo Y, Zheng C, Zhang J, Lu D, Zhuang J, Xing S, et al. Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration. Oncogene. 19 janv 2012;31(3):306-21.

331. Connacher MK, Tay JW, Ahn NG. Rear-polarized Wnt5a-receptor-actin-myosin-polarity (WRAMP) structures promote the speed and persistence of directional cell migration. Parent C, éditeur. MBoC. 7 juill 2017;28(14):1924-36.

332. Liu J, Kang L, Ratnayake I, Ahrenkiel P, Smith S, Wang C. Targeting cancer cell adhesion molecule, CD146, with low-dose gold nanorods and mild hyperthermia disrupts actin cytoskeleton and cancer cell migration. J Colloid Interface Sci. nov 2021;601:556-69.

333. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. Immunity. avr 2008;28(4):454-67.

334. Dagur PK, Biancotto A, Wei L, Nida Sen H, Yao M, Strober W, et al. MCAM-expressing CD4+ T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. Journal of Autoimmunity. déc 2011;37(4):319-27.

335. Elshal MF, Khan SS, Raghavachari N, Takahashi Y, Barb J, Bailey JJ, et al. A unique population of effector memory lymphocytes identified by CD146 having a distinct immunophenotypic and genomic profile. BMC Immunol. déc 2007;8(1):29.

336. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. J Exp Med. 1 juin 1996;183(6):2593-603.

337. Schrage A, Loddenkemper C, Erben U, Lauer U, Hausdorf G, Jungblut PR, et al. Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. Histochem Cell Biol. avr 2008;129(4):441-51.

338. Weninger W, Rendl M, Mildner M, Mayer C, Ban J, Geusau A, et al. Keratinocytes Express the CD146 (Muc18/S-Endo) Antigen in Tissue Culture and During Inflammatory Skin Diseases11This work was supported by a grant from the Austrian Science Foundation (Grant P01437-MED). Journal of Investigative Dermatology. août 2000;115(2):219-24.

339. Simon GC, Martin RJ, Smith S, Thaikoottathil J, Bowler RP, Barenkamp SJ, et al. Up-Regulation of MUC18 in Airway Epithelial Cells by IL-13: Implications in Bacterial Adherence. Am J Respir Cell Mol Biol. mai 2011;44(5):606-13.

340. Berman R, Jiang D, Wu Q, Stevenson CR, Schaefer NR, Chu HW. MUC18 Regulates Lung Rhinovirus Infection and Inflammation. PLoS One. 2016;11(10):e0163927.

341. Berman R, Huang C, Jiang D, Finigan JH, Wu Q, Chu HW. MUC18 Differentially Regulates Pro-Inflammatory and Anti-Viral Responses in Human Airway Epithelial Cells. J Clin Cell Immunol. oct 2014;5(5):257.

342. Daniel L, Bardin N, Moal V, Dignat-George F, Berland Y, Figarella-Branger D. Tubular CD146 expression in nephropathies is related to chronic renal failure. Nephron Exp Nephrol. 2005;99(4):e105-111.

343. Wang F, Xing T, Wang N, Liu L. Clinical significance of plasma CD146 and P-selectin in patients with type 2 diabetic nephropathy. Cytokine. janv 2012;57(1):127-9.

344. Bardin N, Reumaux D, Geboes K, Colombel JF, Blot-Chabaud M, Sampol J, et al. Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. janv 2006;12(1):16-21.

345. Reumaux D, Bardin N, Colombel JF, Dignat-George F, Duthilleul P, Vermeire S. Restoration of soluble CD146 in patients with Crohn's disease treated with the TNF-alpha antagonist infliximab. Inflamm Bowel Dis. oct 2007;13(10):1315-7.

346. Zhang L, Luo Y, Teng X, Wu Z, Li M, Xu D, et al. CD146: a potential therapeutic target for systemic sclerosis. Protein Cell. déc 2018;9(12):1050-4.

347. Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. Blood. 13 sept 2012;120(11):2330-9.

348. Nollet M, Stalin J, Moyon A, Traboulsi W, Essaadi A, Robert S, et al. A novel anti-CD146 antibody specifically targets cancer cells by internalizing the molecule. Oncotarget. 22 déc 2017;8(68):112283-96.

349. Joshkon A, Tabouret E, Traboulsi W, Bachelier R, Simoncini S, Roffino S, et al. Soluble CD146, a biomarker and a target for preventing resistance to anti-angiogenic therapy in glioblastoma. Acta Neuropathol Commun. 23 oct 2022;10(1):151.

350. Zeng Q, Li W, Lu D, Wu Z, Duan H, Luo Y, et al. CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 24 janv 2012;109(4):1127-32.

351. Ma Y, Zhang H, Xiong C, Liu Z, Xu Q, Feng J, et al. CD146 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during TGF-β signaling-induced epithelial-mesenchymal transition. Cancer Letters. août 2018;430:201-14.

352. Sun Z, Ji N, Ma Q, Zhu R, Chen Z, Wang Z, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Asthma Airway Remodeling Is Regulated by the IL-33/CD146 Axis. Front Immunol. 2020;11:1598.

353. Otsuki S, Saito T, Taylor S, Li D, Moonen JR, Marciano DP, et al. Monocyte-released HERV-K dUTPase engages TLR4 and MCAM causing endothelial mesenchymal transition. JCI Insight. 9 août 2021;6(15):e146416.

354. Zhang ZY, Zhai C, Yang XY, Li HB, Wu LL, Li L. Knockdown of CD146 promotes endothelial-to-mesenchymal transition via Wnt/β-catenin pathway. Chadjichristos CE, éditeur. PLoS ONE. 24 août 2022;17(8):e0273542.

355. Mangahas CR, dela Cruz GV, Schneider RJ, Jamal S. Endothelin-1 upregulates MCAM in melanocytes. J Invest Dermatol. déc 2004;123(6):1135-9.

356. Aldrian S, Trautinger F, Fröhlich I, Berger W, Micksche M, Kindas-Mügge I. Overexpression of Hsp27 affects the metastatic phenotype of human melanoma cells in vitro. Cell Stress Chaper. 2002;7(2):177.

357. Liu XS, Genet MD, Haines JE, Mehanna EK, Wu S, Chen HIH, et al. ZBTB7A Suppresses Melanoma Metastasis by Transcriptionally Repressing MCAM. Molecular Cancer Research. 1 août 2015;13(8):1206-17.

358. Li G, Kalabis J, Xu X, Meier F, Oka M, Bogenrieder T, et al. Reciprocal regulation of MelCAM and AKT in human melanoma. Oncogene. 9 oct 2003;22(44):6891-9.

359. Mishra R, Thorat D, Soundararajan G, Pradhan SJ, Chakraborty G, Lohite K, et al. Semaphorin 3A upregulates FOXO 3a-dependent MelCAM expression leading to attenuation of breast tumor growth and angiogenesis. Oncogene. 19 mars 2015;34(12):1584-95.

360. Bardin N, George F, Mutin M, Brisson C, Horschowski N, Francés V, et al. S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. Tissue Antigens. nov 1996;48(5):531-9.

361. Tsuchiya S, Tsukamoto Y, Taira E, LaMarre J. Involvement of transforming growth factor-beta in the expression of gicerin, a cell adhesion molecule, in the regeneration of hepatocytes. Int J Mol Med. mars 2007;19(3):381-6.

362. Wang N, Fan Y, Ni P, Wang F, Gao X, Xue Q, et al. High glucose effect on the role of CD146 in human proximal tubular epithelial cells in vitro. J Nephrol. 2008;21(6):931-40.

363. Luo Y, Teng X, Zhang L, Chen J, Liu Z, Chen X, et al. CD146-HIF-1α hypoxic reprogramming drives vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension. Nat Commun. 7 août 2019;10(1):3551.

364. Wang P, Luo Y, Duan H, Xing S, Zhang J, Lu D, et al. MicroRNA 329 suppresses angiogenesis by targeting CD146. Mol Cell Biol. sept 2013;33(18):3689-99.

365. Wang HF, Chen H, Ma MW, Wang JA, Tang TT, Ni LS, et al. miR-573 regulates melanoma progression by targeting the melanoma cell adhesion molecule. Oncol Rep. juill 2013;30(1):520-6.

366. Flanagan K, Fitzgerald K, Baker J, Regnstrom K, Gardai S, Bard F, et al. Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. PLoS One. 2012;7(7):e40443.

367. Ishikawa T, Wondimu Z, Oikawa Y, Gentilcore G, Kiessling R, Egyhazi Brage S, et al. Laminins 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via α6β1 integrin and MCAM (CD146). Matrix Biol. sept 2014;38:69-83.

368. Ruma IMW, Putranto EW, Kondo E, Murata H, Watanabe M, Huang P, et al. MCAM, as a novel receptor for S100A8/A9, mediates progression of malignant melanoma through prominent activation of NF-κB and ROS formation upon ligand binding. Clin Exp Metastasis. août 2016;33(6):609-27.

369. Chen J, Luo Y, Huang H, Wu S, Feng J, Zhang J, et al. CD146 is essential for PDGFRβ-induced pericyte recruitment. Protein Cell. août 2018;9(8):743-7.

370. Tung HH, Lee SL. Physical Binding of Endothelial MCAM and Neural Transmembrane Protease Matriptase-Novel Cell Adhesion in Neural Stem cell Vascular Niche. Sci Rep. 10 juill 2017;7(1):4946.

371. Stalin J, Harhouri K, Hubert L, Garrigue P, Nollet M, Essaadi A, et al. Soluble CD146 boosts therapeutic effect of endothelial progenitors through proteolytic processing of short CD146 isoform. Cardiovasc Res. 1 août 2016;111(3):240-51.

372. Li X, Wen J, Dong Y, Zhang Q, Guan J, Liu F, et al. Wnt5a promotes renal tubular inflammation in diabetic nephropathy by binding to CD146 through noncanonical Wnt signaling. Cell Death Dis. 18 janv 2021;12(1):92.

373. Liu D, Du L, Chen D, Ye Z, Duan H, Tu T, et al. Reduced CD146 expression promotes tumorigenesis and cancer stemness in colorectal cancer through activating Wnt/β-catenin signaling. Oncotarget. 28 juin 2016;7(26):40704-18.

374. Anfosso F, Bardin N, Francès V, Vivier E, Camoin-Jau L, Sampol J, et al. Activation of human endothelial cells via S-endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125(FAK). J Biol Chem. 9 oct 1998;273(41):26852-6.

375. Bu P, Gao L, Zhuang J, Feng J, Yang D, Yan X. Anti-CD146 monoclonal antibody AA98 inhibits angiogenesis via suppression of nuclear factor-kappaB activation. Mol Cancer Ther. nov 2006;5(11):2872-8.

376. Aumailley M. The laminin family. Cell Adh Migr. 2013;7(1):48-55.

377. Breuer J, Korpos E, Hannocks MJ, Schneider-Hohendorf T, Song J, Zondler L, et al. Blockade of MCAM/CD146 impedes CNS infiltration of T cells over the choroid plexus. J Neuroinflammation. 22 août 2018;15(1):236.

378. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. Int J Biochem Cell Biol. juill 2001;33(7):637-68.

379. Ghavami S, Chitayat S, Hashemi M, Eshraghi M, Chazin WJ, Halayko AJ, et al. S100A8/A9: a Janus-faced molecule in cancer therapy and tumorgenesis. Eur J Pharmacol. 25 déc 2009;625(1-3):73-83.

380. Tung HH, Lee SL. Neural transmembrane protease and endothelial Gs protein activation in cell contact-dependent signaling between neural stem/progenitor cells and brain endothelial cells. J Biol Chem. 29 juin 2012;287(27):22497-508.

381. Deleuran B, Abraham DJ. Possible implication of the effector CD4+ T-cell subpopulation TH17 in the pathogenesis of systemic scleroderma. Nat Clin Pract Rheumatol. déc 2007;3(12):682-3.

382. Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. J Immunol. 1 mai 2009;182(9):5855-64.

383. Lai R, Xian D, Xiong X, Yang L, Song J, Zhong J. Proanthocyanidins: novel treatment for psoriasis that reduces oxidative stress and modulates Th17 and Treg cells. Redox Report. 1 janv 2018;23(1):130-5.

384. Lin W, Shen P, Song Y, Huang Y, Tu S. Reactive Oxygen Species in Autoimmune Cells: Function, Differentiation, and Metabolism. Front Immunol. 25 févr 2021;12:635021.

385. Mellemkjaer L, Pfeiffer RM, Engels EA, Gridley G, Wheeler W, Hemminki K, et al. Autoimmune disease in individuals and close family members and susceptibility to non-Hodgkin's lymphoma. Arthritis Rheum. mars 2008;58(3):657-66.

386. Rosenthal AK, McLaughlin JK, Gridley G, Nyrén O. Incidence of cancer among patients with systemic sclerosis. Cancer. 1 sept 1995;76(5):910-4.

387. Zeineddine N, Khoury LE, Mosak J. Systemic Sclerosis and Malignancy: A Review of Current Data. J Clin Med Res. sept 2016;8(9):625-32.

388. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. Curr Opin Rheumatol. nov 2003;15(6):778-84.

389. Abdulle AE, Diercks GFH, Feelisch M, Mulder DJ, van Goor H. The Role of Oxidative Stress in the Development of Systemic Sclerosis Related Vasculopathy. Front Physiol. 2018;9:1177.

390. Jouve N, Bachelier R, Despoix N, Blin MG, Matinzadeh MK, Poitevin S, et al. CD146 mediates VEGF-induced melanoma cell extravasation through FAK activation. Int J Cancer. 1 juill 2015;137(1):50-60.

391. Asano Y. Recent advances in animal models of systemic sclerosis. The Journal of Dermatology. janv 2016;43(1):19-28.

392. De Pieri A, Korman BD, Jüngel A, Wuertz-Kozak K. Engineering Advanced In Vitro Models of Systemic Sclerosis for Drug Discovery and Development. Advanced Biology. avr 2021;5(4):2000168.

393. Mehta H, Goulet PO, Nguyen V, Pérez G, Koenig M, Senécal JL, et al. Topoisomerase I peptide-loaded dendritic cells induce autoantibody response as well as skin and lung fibrosis. Autoimmunity. déc 2016;49(8):503-13.

394. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. Arthritis Rheum. nov 2011;63(11):3575-85.

395. Jin R, Gao Q, Yin C, Zou M, Lu K, Liu W, et al. The CD146-HIF-1α axis regulates epithelial cell migration and alveolar maturation in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. Lab Invest. août 2022;102(8):794-804.

396. Castro G, Liu X, Ngo K, De Leon-Tabaldo A, Zhao S, Luna-Roman R, et al. RORγt and RORα signature genes in human Th17 cells. PLoS One. 2017;12(8):e0181868.

397. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. Cytokine. nov 2013;64(2):477-85.

398. Bălănescu P, Bălănescu E, Bălănescu A. IL-17 and Th17 cells in systemic sclerosis: a comprehensive review. Rom J Intern Med. 1 déc 2017;55(4):198-204.

399. Petersen ER, Ammitzbøll C, Søndergaard HB, Oturai AB, Sørensen PS, Nilsson AC, et al. Expression of melanoma cell adhesion molecule-1 (MCAM-1) in natalizumab-treated multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 15 déc 2019;337:577085.

400. Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin J. Th17 cells in immunity and autoimmunity. Clin Dev Immunol. 2013;2013:986789.

401. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, et al. Targeting of αv integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. Nat Med. déc 2013;19(12):1617-24.

402. Ilie M, Long E, Hofman V, Selva E, Bonnetaud C, Boyer J, et al. Clinical value of circulating endothelial cells and of soluble CD146 levels in patients undergoing surgery for non-small cell lung cancer. Br J Cancer. 4 mars 2014;110(5):1236-43.