UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE CHIMIE SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : ***SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE***

Spécialité : Immunologie et Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Kévin DIDIER, né le 31/08/1988

Le 5 juin 2025

Facteurs sériques, cellulaires et environnementaux impliqués dans l'excès de NETose dans différentes formes de sclérodermie systémique

Thèse dirigée par le Pr Amélie SERVETTAZ

JURY

M. Philippe N'GUYEN,	Professeur, ,	CHU de Reims,	**Président**
Mme Amélie SERVETTAZ,	Professeur,	CHU de Reims,	**Directeur de thèse**
Mme Sylvie CHOLLET-MARTIN,	Professeur,	CHU Bichat, APHP,	**Rapporteur**
M. David LAUNAY,	Professeur,	CHRU de Lille,	**Rapporteur**
M. Sylvain AUDIA,	Professeur,	CHU de Dijon,	**Examinateur**
M. Frédéric BATTEUX,	Professeur,	Institut Pasteur de Lille,	**Examinateur**
Mme Marie-Elise TRUCHETET,	Professeur,	CHU de Bordeaux,	**Examinateur**

REMERCIEMENTS

Au Pr Sylvain AUDIA, je vous remercie pour votre disponibilité et votre bienveillance lors de mes CSI. Votre écoute et votre expertise dans ce domaine nous ont permis d'avancer. Nos échanges, notamment vis-à-vis de vos projets, ont été très constructifs et nous ont permis d'ouvrir de nouveaux horizons. Je suis ravi que vous ayez accepté de juger mon travail final, et je serais ravi de travailler de nouveau avec vous.

Au Pr Frédéric BATTEUX, je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail. Votre point de vue expert quant au stress oxydatif dans la sclérodermie systémique vont nous permettre d'avancer dans ce projet, où finalement nous n'en sommes qu'aux débuts. Je suis ravi de pouvoir entendre votre point de vue sur ce projet.

Au Pr Sylvie CHOLLET-MARTIN, je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail. Votre expertise vis-à-vis de cette cellule passionnante qu'est le neutrophile, nous aidera à coup sûr à aborder la suite de ce travail. Je vous remercie sincèrement de votre disponibilité.

Au Pr Philippe N'GUYEN, je vous remercie pour votre suivi et votre bienveillance durant ces 5 longues années. Votre expertise et votre point de vue nous ont permis d'avancer dans ce projet avec un nouveau regard. Je suis ravi que vous ayez accepté de juger mon travail final, que vous avez pu suivre sur toute sa longueur. Et merci sincèrement de m'avoir consacré du temps alors qu'une nouvelle vie de retraité vous attendez.

Au Pr Amélie SERVETTAZ, merci beaucoup de m'avoir proposé ce travail passionnant et de m'avoir encadré durant toutes ces années. Merci d'avoir supporté mes sauts d'humeur et d'avoir toujours fait preuve de bienveillance à mon égard. Tu es une médecin et une cheffe exceptionnelle, je suis très fier de faire partie de ton équipe. Merci pour tout.

Au Pr Marie-Elise TRUCHETET, je vous remercie sincèrement de m'avoir faire part de votre expertise en nous faisant part de vos conseils au tout début de ce projet lors de mon premier CSI. Vos conseils nous ont permis d'avancer sereinement, et je suis ravi que vous ayez accepté de juger mon travail pour voir l'avancée du projet. J'avais également beaucoup apprécié échanger avec vous lors de mon travail de thèse de médecine, où vous m'aviez accueillie avec bienveillance. Je serais ravi de travailler de nouveau avec vous par la suite.

Au Pr David LAUNAY, je vous remercie de me faire l'honneur à nouveau de juger mon travail. Mon année passée dans votre service aura été une riche expérience et je m'efforce à appliquer au quotidien tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés. Je vous remercie sincèrement pour votre disponibilité et je suis ravi d'avoir l'occasion à nouveau de travailler avec vous.

Au Dr Pierre-André JARROT, je te remercie sincèrement d'avoir accepté de juger mon travail et de ta disponibilité. Nous nous sommes côtoyés lorsque j'étais tout petit durant l'internat et je suis ravi de pouvoir travailler de nouveau avec toi. J'espère que nous aurons l'occasion de collaborer à l'avenir de nouveau.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire IRMAIC, je vous remercie de m'avoir accueilli dans vos locaux, mais surtout dans votre équipe. Votre bonne humeur au quotidien et votre bienveillance m'ont permis de mener à bien ce projet. Merci également pour votre ouverture d'esprit quant à mes débuts dans ce monde obscure qu'était la recherche à l'époque. En particulier, merci à Céline MULLER pour m'avoir encadré à mes tous débuts et fait tenir ma première pipette. Merci au Dr Sébastien LE JAN pour ta disponibilité, ta bienveillance et ta bonne humeur à toute épreuve, c'est un réel plaisir de travailler avec toi et je suis ravi de poursuivre ce projet à tes côtés. Merci à tous. Pour une fois, je ne serai pas désolé …

A l'ensemble de l'équipe de médecine interne du CHU de Reims, je vous remercie pour votre aide pour mener à bien ce projet, de m'avoir permis de me dégager du temps et d'avoir gérer mes supers patients lors de mes absences. Un grand merci en particulier au Dr Isabelle QUATRESOUS et au Dr Hugo PINTO pour avoir accepté de suivre certains de mes patients durant une période pour me mettre de donner un bon coup de fouet dans ce projet (PS : les patients étaient ravis de vos bons soins). Un grand merci également à nos supers IDE pour leur engagement et leur bienveillance, avec le rajout de prises de sang surnuméraires, voire même non programmées, sans jamais broncher (ou presque) qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Et surtout, un grand merci au Dr Ailsa ROBBINS, ma co-galérienne, pour ton écoute, tes conseils et ta disponibilité qui m'ont permis d'aller au bout de ce projet. Je n'y serais clairement pas arrivé sans toi. Merci à tous.

A ma famille pour vos encouragements et votre soutien, merci de votre compréhension sur ces dernières années où le temps me manquait malheureusement. J'espère que nous pourrons rattraper le temps perdu. A mes grand-parents qui m'ont vu grandir et fait vivre de si bons moments, je sais que vous auriez été fiers de voir ce que je suis. Merci à tous.

A Elena, ma chérie, merci d'être là au quotidien et d'avoir toujours été là, malgré les difficultés. J'ai conscience que ce n'est pas toujours facile d'être avec moi, surtout lorsque je te propose encore des plans sans queue ni tête mais tu as toujours été là. Tu as su être à l'écoute quand j'en avais besoin et tu as su trouver les mots pour me réconforter. Je sais que je peux compter sur toi, et que je pourrai toujours compter sur toi. Je suis fière de toi. Je sais que je te dois tout et que je ne serais pas ce que je suis sans toi. Merci à toi, je t'aime.

A Margaux, ma 2ème chérie. Merci d'exister, tout simplement. Chaque jour tu me donnes la force d'aller plus loin. Tu es un vrai modèle pour moi. Merci pour tous ces moments joyeux que nous vivons ensemble qui me comblent de bonheur. Lorsque je suis avec toi, tout parait plus léger et tu en arrives à me faire oublier les problèmes du quotidien. Je suis fier de toi, je t'aime.

TABLE DES MATIERES

Remerciements 1

Abréviations 6

Introduction 9

1. La Sclérodermie Systémique 9

1.1. Epidémiologie et facteurs génétiques 9

1.2. Présentation clinique de la sclérodermie systémique 10

1.3. Auto-anticorps et sclérodermie systémique 14

1.4. Classifications et sous-classifications 16

1.5. Prise en charge thérapeutique 18

2. Physiopathologie de la Sclérodermie Systémique 21

2.1. Données sur la dysfonction fibroblastique 22

2.1.1. Anomalies au niveau des fibroblastes 22

2.1.2. Facteurs extérieurs influençant la dysfonction des fibroblastes 23

2.2. Données sur le dysfonctionnement endothélial 24

2.2.1. Anomalie de régulation du tonus vasculaire 24

2.2.2. Altération de la barrière physiologique endothéliale 25

2.2.3. Anomalies de l'homéostasie des cellules endothéliales 25

2.2.4. Facteurs extérieurs influençant la dysfonction endothéliale 26

2.3. Anomalies immunologiques 26

2.3.1. Anomalies de l'immunité humorale 27

2.3.2. Anomalies de l'immunité cellulaire 28

2.3.3. Anomalies de l'immunité innée 28

2.4. Rôle du stress oxydatif 31

2.4.1. Implication du stress oxydatif dans la dysfonction des fibroblastes 31

2.4.2. Implication du stress oxydatif dans la dysfonction endothéliale 32

2.4.3. Implication du stress oxydatif dans les anomalies immunitaires 32

3.NETose dans la Sclérordermie Systémique et d'autres Maladies Auto-Immunes et Vasculaires 34

3.1. Généralités sur le phénomène de NETose 34

3.1.1. Description du phénomène de NETose 34

3.1.2. Voies impliquées 37

3.1.3. Principe de NETose vitale ou suicide 40

3.1.4. Stimuli de la NETose 40
3.1.5. Régulation de la NETose 41
3.2. Effets des NETs dans différents contextes pathologiques 42
3.2.1. Phénomène de NETose dans le lupus systémique 42
3.2.2. Phénomène de NETose dans les vascularites à ANCA 44
3.2.3. Phénomène de NETose dans les myopathies inflammatoires 44
3.2.4. Phénomène de NETose dans la polyarthrite rhumatoïde 45

Objectifs de ce travail 47

Mise en évidence du phénomène de NETose au cours de la Sclérodermie Systémique et quantification 49
1. Mise au point méthodologique 49
2. La génération de NETs est associée aux Stades Précoces et aux Complications Vasculaires dans la Sclérodermie Systémique 52
2.1. Description de la population étudiée 52
2.2. Les neutrophiles de ScS sont prédisposés à générer plus de NETs que ceux des témoins 53
2.3. Les neutrophiles de ScS vasculaires ou d'évolution récente génèrent plus de NETs 53
2.4. Conclusion 54

Discussion et Evolution du projet sur la Netose 56

Compréhension des Mécanismes régissant le phénomène de NETose au cours de la Sclérodermie Systémique 57
1. Rationnel et mise en place du protocole 57
2. La génération de NETs implique la voie NADPH-oxydase Indépendante via les FRO Mitochondriaux et est exacerbé par l'Hypoxie dans la ScS 58
2.1. Description de la population étudiée 59
2.2. L'hypoxie accentue la génération de NETs chez les ScS à l'inverse des témoins 59
2.3. La NETose des neutrophiles sclérodermiques implique des FRO mitochondriaux, contrairement à la NETose de neutrophiles de sujets contrôles 60
2.4. Le phénomène de NETose est un processus Nox-indépendant dans la ScS 60
2.5. Conclusion 61
3. Article en cours d'écriture : NETosis implicates a Mitochondrial Reactive Oxygen Species production through a NADPH-oxidase Independent pathway and is exacerbated by Hypoxia in Systemic Sclerosis 62

Discussion et Perspectives 85

1. **Implication des NETs dans les différentes complications de la ScS 85**
2. **Impacts cellulaires et immunologiques des NETs dans la ScS 88**
3. **Mécanismes impliqués dans l'accumulation de NETs dans la ScS 90**
4. **Vers de nouvelles opportunités thérapeutiques dans la ScS 93**

Conclusion 94

Annexes 95

Références 96

Table des Figures

Figure 1. Prévalence de la sclérodermie au niveau international 9
Figure 2. Représentation de la prévalence des principales complications survenant dans la sclérodermie systémique selon l'auto-anticorps spécifiques via méta-analyse 12
Figure 3. Illustrations des différentes atteintes cutanées de la sclérodermie systémique 13
Figure 4. Représentation des associations entre anticorps spécifiques de la sclérodermie systémique et complications via méta-analyse 16
Figure 5. Prise en charge thérapeutique de la sclérodermie systémique selon le PNDS 19
Figure 6. Rôle possible des formes réactives de l'oxygène dans la physiopathologie de la ScS s'articulant autour de 3 axes: fibroblastes, cellules endothéliales et cellules de l'immunité 21
Figure 7. NETose induite par stimulation par du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 34
Figure 8. Représentation schématique des différents évènements intracellulaires du polynucléaire neutrophile aboutissant au phénomène de NETose 37
Figure 9. Voies d'activation impliquées dans le phénomène de NETose 39
Figure 10. Recueil des poly-nucléaires neutrophiles après centrifugation en contact avec gradient de densité 49
Figure 11. Description de la méthode de quantification des NETs. 51
Figure 12. Représentation schématique de la quantité de NETs générée par les neutrophiles de ScS selon la durée d'évolution de la maladie et du type de complication 55
Figure 13. Chambre d'incubation hypoxique (Bactron®) 58

ABRÉVIATIONS

α-SMA	alpha-smooth muscle actin
Ac	anticorps
ANCA	anticorps anti-cytoplasmes des polynucléaires neutrophiles
APRIL	a proliferation-inducing ligand
ARE	antagonistes des récepteurs de l'endothéline
BAFF	B cell activating factor of the TNF
BCR	B cell receptor
CB1	cannabinoid receptor 1
CB2	cannabinoid receptor 2
CCP	peptide-C-citrulliné
CDp	cellule dendritique plasmacytoïde
CE	cellules endothéliales
CRS	crise rénale sclérodermique
CTGF	connective tissue growth factor
dcScS	sclérodermie systémique cutanée diffuse
EndoMT	transition endothélio-mésenchymateuse
EFS	établissement français du sang
ERK	extracellular signal-regulated kinases
Fli1	friend leukemia integration 1
FRO	forme réactive de l'oxygène
GEPA	granulomatose éosiniphilique avec polyangéite
GPA	granulomatose avec polyangéite
GPCR	G-protein-coupled receptors
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène
HDMEC	cellule endothéliale microvasculaire dermique humaine
HIF-1α	hypoxia-inducible factor-1α
HOCl	acide hypochloreux
HMGB1	high mobility group box 1
HSP-70	heat shock protein 70
HTAP	hypertension artérielle pulmonaire
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IEC	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IFN	interféron
IFN-I	interféron de type I
IL	interleukine
IPDE5	inhibiteur de la phosphodiestérase de type 5
iPKC	inhibiteur de PKC
LB	lymphocyte B
lcScS	sclérodermie systémique cutanée limitée
LDG	low density granulocytes
LES	lupus érythémateux systémique
LPS	lipopolysaccharide
LT	lymphocytes T
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1

MMP12	matrix metalloproteinase 12
MPO	myélopéroxydase
NE	neutrophile elastase
NET	neutrophil extracellular traps
NO	monoxide d'azote
Nox	NADPH-oxydase
PAD4	peptidyl arginine deiminase 4
PAM	polyangéite microscopique
PBMC	cellule mononuclée du sang périphérique
PDGF	platelet derived growth factor
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PID	pneumopathie interstitielle diffuse
PKC	protéine kinase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PNDS	protocole national de diagnostic et de soins
NEUTROPHILES	polynucléaires neutrophiles
PR	polyarthrite rhumatoïde
PSGL-1	P-selectine glycoprotein ligand 1
PTP1B	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1
PTP4A1	protein tyrosine phosphatase 4A type 1
PTX3	pentraxin 3
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
RLIP76	Ral binding protein1
ScS	sclérodermie systémique
SYK	spleen tyrosine kinase
TIM-1	T cell Ig and mucin domain protein 1
TGF-β	transforming growth factor-β
TLR	toll like receptor
TNFα	tumor necrosis factor α
TK	tyrosine kinase
UD	ulcérations digitales
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VE	vascular endothelial
VEGF	vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

1. LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE

La sclérodermie systémique (ScS) est une connectivite rare se caractérisant par une fibrose de la peau et d'organes internes, une vasculopathie quasi systématique et de l'auto-immunité. Cependant, il existe une forte hétérogénéité de présentation clinico-biologique et également de morbi-mortalité d'un patient à un autre, faisant toute la complexité de la prise en charge de cette pathologie.

1.1. Epidémiologie et facteurs génétiques

La sclérodermie systémique (ScS) est une pathologie systémique rare dont la prévalence est estimée à 100 à 200 par million d'habitants et une incidence estimée entre 4 et 20 par million d'habitants par an, avec néanmoins une importante variabilité selon les continents et pays (1,2). Ainsi, la prévalence de la ScS est plus élevée au Canada et en Italie mais semble plus faible en République Dominicaine (**Figure 1**, (2)). Dans certaines régions du monde comme en Afrique, peu de données sont disponibles. Certaines populations semblent plus à risque. En effet la prévalence de la ScS est estimée à près de 500 pour 100000 habitants dans la population Amérindienne Choctaw (3). Par ailleurs, le phénotype clinico-biologique semble variabale selon les populations et sera discuté ultérieurement dans cette introduction (4,5).

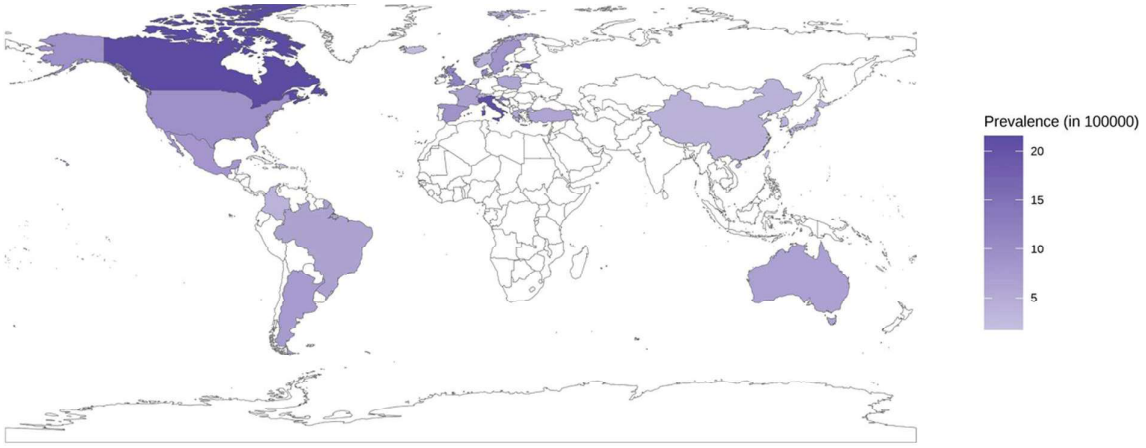


Figure 1. Prévalence de la sclérodermie au niveau international (d'après Tian et al. (2))

Ces différentes observations laissent sous-entendre une participation génétique à cette pathologie. En effet, plusieurs études ont mis en évidence certains polymorphismes de gènes codant pour la régulation de la fibrose ainsi que certains allèles HLA étaient associés à la ScS (6). Par ailleurs, il a également été mis en évidence une association entre la production de certains auto-anticorps et des polymorphismes de certains allèles HLA, notamment de *DRB1* et *DQB1* (7,8). Cependant, une faible concordance de survenue de la maladie entre jumeaux monozygote et dizygote suggère que d'autres facteurs soient impliqués (9).

Un polymorphisme nucléotidique fréquemment associé au développement de la ScS (> 10% des cas) affecte le gène codant pour la DNASE1L3 (rs35677470) et cause une mutation non synonyme R206C (10–12). Ce polymorphisme nucléotique est retrouvé majoritairement chez des patient ScS montrant une forme limitée de la pathologie et présentant une auto-réactivité dirigée contre le centromère (10–12). La mutation R206C causée par ce polymorphisme nucléotique semble réduire la sécrétion de la DNASE1L3 mais aussi altérer sa stabilité structurelle, ce qui au final réduit fortement son activité catalytique (10–14). En accord avec ces observations, il a été récemment montré que les patients ScS porteurs de ce polymorphisme présentent une diminution de l'activité circulante DNASE1L3, mesurée par la capacité à digérer l'ADN génomique associé aux microparticules (15). Cette diminution d'activité de la DNASE1L3 était accompagnée d'une réduction de la fragmentation des ADNs génomiques circulants et donc d'une accumulation des grands fragments d'ADN chez ces patients ScS (15).

1.2. Présentation clinique de la sclérodermie systémique

La ScS tire son nom d'une fibrose excessive au niveau cutanée mais d'extension variable d'un patient à un autre. La plupart des patients vont ainsi développer une fibrose notamment au niveau péribuccal avec la présence de plis radiés, pouvant potentiellement limiter l'ouverture buccale. Cette fibrose débute à l'extrémité des membres et peut s'étendre progressivement pour atteindre un pic aux alentours de trois ans d'évolution (16). Ainsi, on distingue les ScS dîtes diffuses (dcScS), représentant environ 35% des patients, des ScS limitées (lcScS) selon l'extension de la fibrose cutanée à leur acmé conformément à la classification de Leroy et Medsger (17,18). Les lcScS ont une fibrose cutanée ne s'étendant pas au-delà des genoux, des coudes et ne touchant pas le tronc. A l'inverse, les dcScS ont une fibrose cutanée touchant la partie proximale des membres et/ou le tronc, la tête étant considérée comme une extrémité. De par l'évolution de la pathologie, le phénotype cutané ne sera retenu qu'après trois

ans d'évolution dans le cas où il ne serait pas diffus d'emblée, devant le potentiel évolutif sur le plan cutané durant les trois premières années d'évolution. Par ailleurs, les patients dcSSc ont un risque de mortalité plus élevé (19). Il existe une 3ème forme cutanée appelée *sine scleroderma*, caractérisée par l'absence de fibrose cutanée. Cette forme de ScS, dont la prévalence est estimée entre 3 et 8% des ScS, est souvent diagnostiquée plus tardivement dans le cadre de l'exploration de complications viscérales (20,21).

En effet, en dehors de la fibrose cutanée, cette pathologie systémique se caractérise par le risque de développement de complications viscérales pouvant menacer le pronostic vital. A l'heure actuelle, les deux principales complications associées au décés sont la pneumopathie interstitielle diffuse (PID) et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), représentant respectivement 16,8% et 14,7% des causes de décès chez les patients ScS (22). La PID se caractérise par la présence de lésions fibrosantes pulmonaires, principalement au niveau des bases (23). Cette complication touche approximativement 35% des patients mais avec une importante hétérogénéité en terme de sévérité (24). L'HTAP, survenant dans environ 10% des cas, se définit par une défaillance cardiaque droite, pouvant évoluer vers une défaillance cardiaque globale, dont le diagnostic repose sur la réalisation d'un cathétérisme cardiaque droit (24,25). A côté de ces deux principales complications, les patients peuvent également souffrir d'autres complications sévères comme la crise rénale sclérodermique (CRS), devenue plus rare (environ 5% des patients) devant une meilleure compréhension de la pathologie, notamment permettant un recours aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion, mais au pronostic toujours sombre (22,24,26). Par ailleurs, d'autres complications invalidantes sur le plan fonctionnel peuvent survenir comme la survenue d'un rhumatisme inflammatoire ou encore de myosite dans respectivement 15 à 50% des patients et 5 à 35% des patients (**Figure 2**).

Plusieurs autres manifestations vont caractériser la ScS comme le phénomène de Raynaud, témoin d'une vasculopathie, quasi constant chez les patients et pouvant se compliquer d'ulcérations digitales (UD) (18). Ce phénomène de Raynaud est la plupart du temps le premier symptôme de cette maladie, présent souvent des années avant les autres signes (27). Les télangiectasies qui peuvent survenir dans cette pathologie, à la fois sur le plan cutané mais également viscéral et notamment digestif, reflètent la pathologie vasculaire. Par ailleurs, 15 à 40% des patients vont également souffrir de calcinose, correspondant à des dépôts calciques au niveau sous-cutané pouvant se fistuliser à la peau (**Figure 2**).

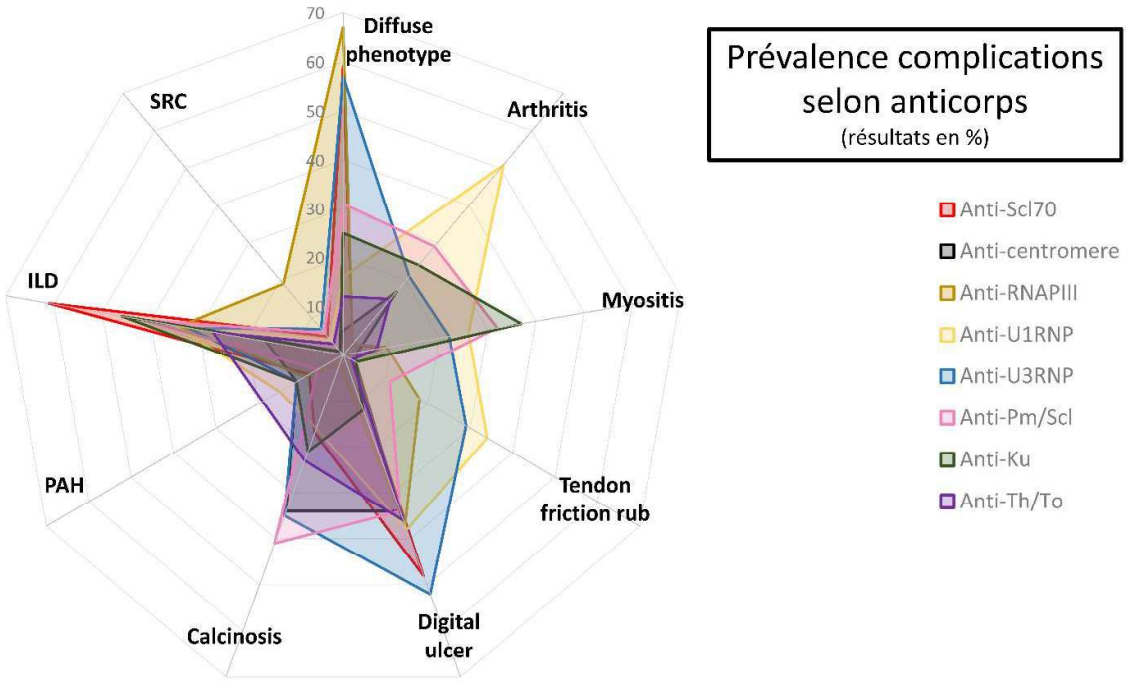


Figure 2. Représentation de la prévalence des principales complications survenant dans la sclérodermie systémique selon l'auto-anticorps spécifiques via méta-analyse. Les résultats sont exprimés pourcentage. Résultats non publiés.

Un panel de certaines manifestations cutanées est visible dans la **Figure 3**. Le tractus digestif est également régulièrement atteint, avec notamment un reflux gastro-œsophagien touchant la majorité des patients en lien avec une diminution de la motilité œsophagienne (28). Cette hypomotilité du tractus digestif peut aboutir à un tableau de pseudo-occlusion intestinale chronique source de douleurs abdominales mais pouvant également greffer le pronostic vital (29).

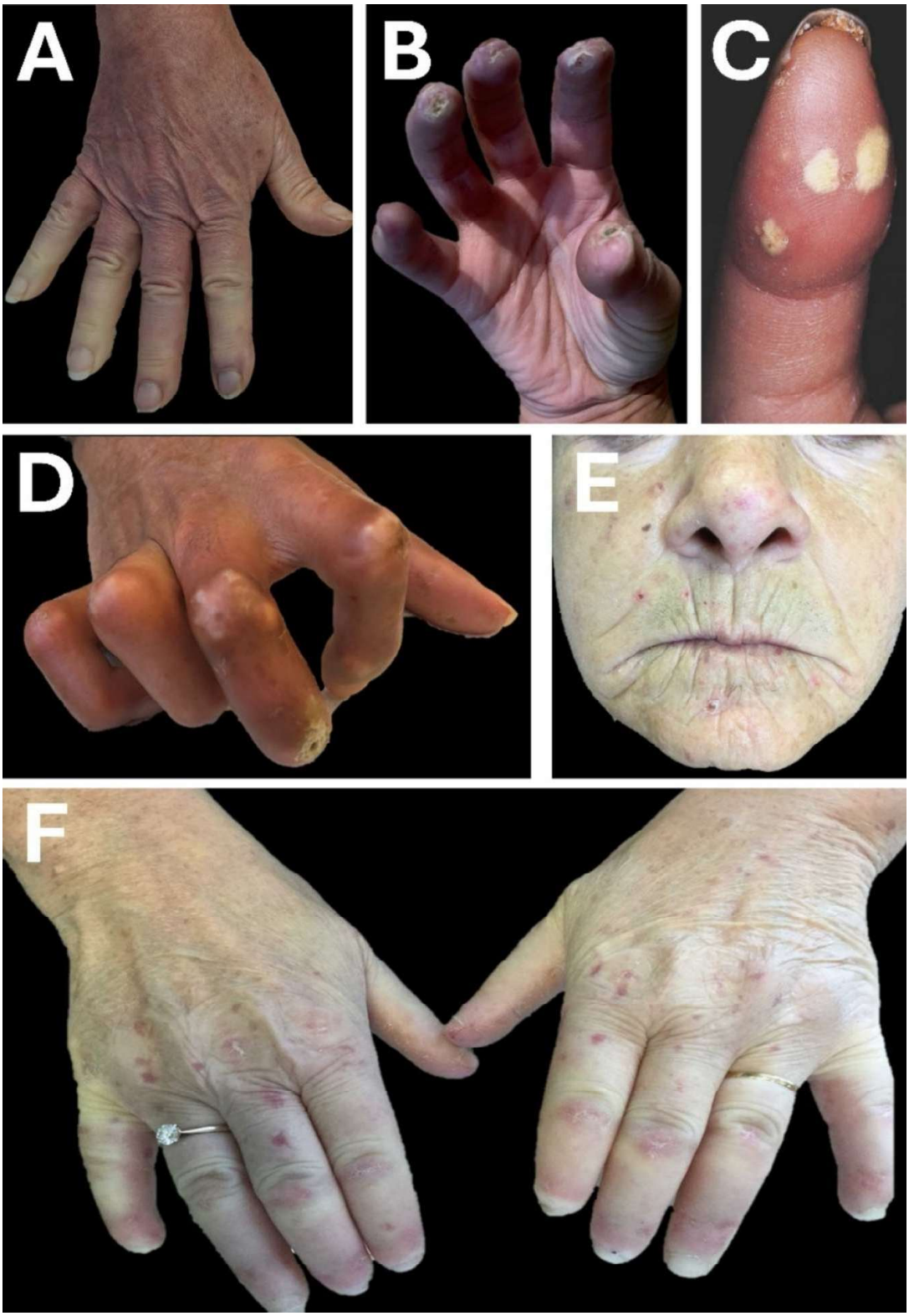


*Figure 3. Illustrations des différentes atteintes cutanées de la sclérodermie systémique (collection personnelle). (**A**). Phase syncopale du phénomène de Raynaud. (**B**). Ulcérations digitales ischémiques avec cicatrices pulpaires déprimées. (**C**). Calcinoses sous-cutanées. (**D**). Sclérodactylie avec scléro-atrophie. (**E**) Plis radiés péri-buccaux. (**F**). Télangiectasies et acro-ostéolyse.*

1.3. Auto-anticorps et sclérodermie systémique

Cette pathologie systémique s'accompagne d'auto-immunité dans la mesure, où il va être mis en évidence dans le sérum de plus de 95% des patients des anticorps anti-nucléaires (18,24). Neuf anticorps (Ac) spécifiques de cette pathologie pouvant être recherchés dans le cadre de la pratique clinique (30). Ces anticorps ont la particularité d'être mutuellement exclusifs, c'est-à-dire que pour un patient donné, un seul Ac sera mis en évidence dans son sérum, et d'être présent des années avant les premiers signes cliniques (24,31). Les trois principaux Ac sont les Ac anti-centromères représentant 27% des patients, les Ac anti-topoisomérase I (aussi appelés anti-Scl70) représentant 25% des patients et les Ac anti-ARN polymérase III représentant 9% des patients (**Tableau 1**). Les autres anticorps plus rarement observés sont les Ac anti-U1RNP (8%), les Ac anti-Pm/Scl (5%), les Ac anti-U3RNP ou anti-fibrillarine (3%), les Ac anti-Ku, anti-Th/To et anti-NOR90, représentant chacun 2% de la population sclérodermique globale (**Tableau 1**). Cependant, il existe une répartition très hétérogène de ces anticorps au niveau international et parfois même au sein d'un même pays, notamment avec des variations ethniques (**Tableau 1**). Par exemple, les Ac anti-U3RNP représentent au niveau global seulement 3% des Ac associés à la ScS, cependant ils sont mis en évidence chez 16% des patients d'origine Afro-Américaine ce qui en fait le 2ème Ac le plus fréquent dans cette population (32). Ces données suggèrent que des facteurs génétiques et/ou épigénétiques seraient impliqués dans cette hétérogénéité immunologiques (6).

Il a été montré que chacun de ces Ac était associé à un phénotype clinique et un pronostic particulier (24,31,33). Ainsi, les Ac anti-centromères sont associés aux lcScS ainsi qu'à l'HTAP dans certaines études mais ces données sont controversées, les Ac anti-topoisomérase I sont associés aux dcScS ainsi qu'aux PID, les Ac anti-ARN polymérase III quant à eux sont associés aux dcScS et aux CRS ce qui explique en partie leur sombre pronostic (24,33–36). Concernant les Ac plus rares, les Ac anti-U1RNP sont associés aux lcScS, aux PID, aux complications musculosquelettiques (arthrites et myosites) ainsi qu'à l'HTAP dans certaines cohortes (24,33,35) ; les Ac anti-Pm/Scl et anti-Ku sont associés aux myosites ainsi qu'aux PID (24,33,35,37,38) ; les Ac anti-U3RNP sont associés à l'HTAP ainsi qu'aux myosites, avec un pronostic sombre (24,33,34,39) ; les Ac anti-Th/To sont associés aux lcScS ainsi qu'à l'HTAP (24,33,35,40). Quant aux Ac anti-NOR90, peu de choses sont décrites à leur sujet si ce n'est qu'ils sont associés aux lcScS (24,41). A noter que des différences ethniques ont également été mises en évidence (4,5). Une synthèse de ces données via méta-analyse est proposée dans la **Figure 4**.

Tableau 1. Prévalence de chaque anticorps spécifique de la sclérodermie systémique au niveau international, par continent et par pays via méta-analyse

	Anti-Scl70		Anti-centromere		Anti-RNA polymerase III		Anti-U1RNP		Anti-U3RNP		Anti-Pm/Scl		Anti-Ku		Anti-Th/to		Anti-NOR90	
	n / n total (% [95% CI])	n study (I^2)	n / n total (% [95% CI])	n study (I^2)	n / n total (% [95% CI])	n study (I^2)	n / n total (% [95% CI])	n study (I^2)	n / n total (% [95% CI])	n study (I^2)	n / n total (% [95% CI])	n study (I^2)	n / n total (% [95% CI])	n study (I^2)	n / n total (% [95% CI])	n study (I^2)	n / n total (% [95% CI])	n study (I^2)
International	**9240/39953 (25 [23-27])**	**89 (95)**	**11559/39953 (27 [25-30])**	**89 (97)**	**3075/28118 (9 [8-11])**	**56 (94)**	**1231/17679 (8 [6-11])**	**34 (95)**	**521/16806 (3 [2-4])**	**37 (91)**	**613/13414 (5 [4-6])**	**32 (89)**	**136/7096 (2 [2-4])**	**20 (83)**	**257/12919 (2 [2-3])**	**30 (82)**	**65/3901 (2 [1-3])**	**20 (75)**
Africa	**101/654 (18 [10-29])**	**4 (88)**	**46/654 (7 [4-12])**	**4 (73)**	**-**	**-**	**12/272 (4 [3-8])**	**1 (-)**	**-**	**-**	**0/272 (0 [0-3])**	**1 (-)**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Egypt	18/50 (36 [24-50])	1 (-)	4/50 (8 [3-19])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morocco	23/272 (8 [6-12])	1 (-)	10/272 (4 [2-7])	1 (-)	-	-	12/272 (4 [3-8])	1 (-)	-	-	0/272 (0 [0-3])	1 (-)	-	-	-	-	-	-
South Africa	60/332 (18 [14-23])	2 (0)	32/332 (9 [5-17])	2 (64)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
North America	**2793/15418 (18 [16-20])**	**17 (91)**	**3637/15418 (22 [18-27])**	**17 (97)**	**1855/14073 (13 [10-16])**	**13 (96)**	**555/10038 (7 [5-11])**	**11 (96)**	**276/7871 (5 [3-8])**	**11 (96)**	**170/5312 (3 [2-5])**	**7 (83)**	**2/247 (1 [0-3])**	**1 (-)**	**134/6954 (2 [1-4])**	**8 (93)**	**-**	**-**
Canada	473/3264 (14 [12-17])	4 (81)	1038/3264 (33 [29-38])	4 (86)	415/2955 (14 [11-18])	3 (87)	59/963 (6 [5-8])	1 (-)	31/714 (4 [3-6])	1 (-)	106/2241 (5 [4-6])	2 (55)	-	-	10/714 (1 [1-3])	1 (-)	-	-
USA	2320/12154 (20 [17-22])	13 (90)	2599/12154 (19 [15-24])	13 (97)	1440/11118 (13 [9-17])	10 (97)	496/9075 (7 [5-12])	10 (96)	245/7157 (5 [2-9])	10 (96)	64/3071 (2 [1-4])	5 (72)	2/247 (1 [0-3])	1 (-)	124/6240 (2 [1-5])	7 (93)	-	-
South America	**454/2132 (23 [19-27])**	**8 (75)**	**589/2132 (31 [24-40])**	**8 (93)**	**114/851 (12 [5-26])**	**5 (93)**	**42/447 (9 [7-13])**	**3 (0)**	**46/709 (4 [1-15])**	**3 (89)**	**44/709 (6 [5-9])**	**3 (17)**	**26/467 (6 [2-16])**	**2 (86)**	**17/467 (2 [0-21])**	**2 (72)**	**6/328 (2 [1-4])**	**1 (-)**
Argentina	37/230 (16 [12-21])	1 (-)	117/230 (51 [44-57])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brazil	378/1763 (23 [19-29])	6 (76)	431/1763 (28 [22-35])	6 (83)	112/712 (17 [8-33])	4 (93)	27/308 (9 [6-13])	2 (0)	46/570 (6 [1-22])	2 (92)	32/570 (6 [4-8])	2 (0)	12/328 (4 [2-6])	1 (-)	17/328 (5 [3-8])	1 (-)	6/328 (2 [1-4])	1 (-)
Mexico	39/139 (28 [21-36])	1 (-)	41/139 (29 [23-38])	1 (-)	2/139 (1 [0-6])	1 (-)	15/139 (11 [7-17])	1 (-)	0/139 (0 [0-5])	1 (-)	12/139 (9 [5-15])	1 (-)	14/139 (10 [6-16])	1 (-)	0/139 (0 [0-5])	1 (-)	-	-
Asia	**1636/4184 (38 [30-47])**	**18 (96)**	**991/4184 (22 [18-27])**	**18 (91)**	**200/2897 (5 [4-8])**	**11 (83)**	**301/1740 (15 [9-23])**	**7 (94)**	**38/1180 (3 [2-5])**	**6 (11)**	**19/752 (3 [1-7])**	**5 (50)**	**30/659 (4 [2-8])**	**4 (48)**	**29/1180 (3 [2-4])**	**6 (0)**	**3/384 (1 [0-3])**	**3 (0)**
China	251/419 (60 [55-65])	1 (-)	56/419 (13 [10-17])	1 (-)	4/419 (1 [0-3])	1 (-)	56/419 (13 [10-17])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
India	88/190 (36 [14-67]	3 (92)	42/190 (22 [17-29])	3 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Iran	71/100 (71 [61-79])	1 (-)	7/100 (7 [3-14])	1 (-)	10/100 (10 [5-18])	1 (-)	7/100 (7 [3-14])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Japan	559/2003 (28 [26-30])	6 (9)	579/2003 (29 [22-37])	6 (92)	85/1150 (7 [6-10])	4 (39)	222/1153 (16 [7-30])	4 (96)	23/796 (3 [2-4])	3 (0)	0/275 (0 [0-3])	1 (-)	8/275 (3 [1-6])	1 (-)	21/796 (3 [2-4])	3 (0)	-	-
Korea	302/751 (40 [37-44])	1 (-)	175/751 (23 [20-26])	1 (-)	90/751 (12 [10-15])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malaysia	10/31 (32 [18-50])	1 (-)	3/31 (10 [2-26])	1 (-)	2/31 (6 [2-22])	1 (-)	-	-	3/31 (10 [2-26])	1 (-)	2/31 (6 [2-22])	1 (-)	2/31 (6 [2-22])	1 (-)	0/31 (0 [0-21])	1 (-)	0/31 (0 [0-21])	1 (-)
Singapore	21/68 (31 [20-43])	1 (-)	16/68 (24 [15-35])	1 (-)	3/68 (4 [1-13])	1 (-)	16/68 (24 [15-35])	1 (-)	1/68 (1 [0-8])	1 (-)	2/68 (3 [1-11])	1 (-)	1/68 (1 [0-10])	1 (-)	2/68 (3 [1-11])	1 (-)	1/68 (1 [0-10])	1 (-)
Thailand	231/285 (81 [76-85])	1 (-)	20/285 (7 [4-11])	1 (-)	4/285 (1 [1-4])	1 (-)	-	-	11/285 (4 [2-7])	1 (-)	14/285 (5 [3-8])	1 (-)	19/285 (7 [4-10])	1 (-)	6/285 (2 [1-5])	1 (-)	2/285 (1 [0-30])	1 (-)
Turkey	103/337 (32 [23-42])	3 (68)	93/337 (25 [14-41])	3 (84)	2/93 (2 [1-8])	1 (-)	-	-	-	-	1/93 (1 [0-7])	1 (-)	-	-	-	-	-	-
Europe	**3981/16013 (25 [23-28])**	**37 (92)**	**5758/16013 (33 [30-37])**	**37 (95)**	**748/9110 (8 [6-10])**	**23 (94)**	**312/5053 (7 [5-10])**	**11 (91)**	**147/5988 (2 [2-3])**	**14 (74)**	**282/5675 (6 [4-8])**	**13 (85)**	**56/5029 (2 [1-3])**	**10 (82)**	**44/3131 (2 [1-4])**	**10 (78)**	**36/2624 (2 [1-4])**	**8 (84)**
Belgium	95/365 (26 [22-31])	1 (-)	135/365 (37 [32-42])	1 (-)	26/365 (7 [5-10])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
France	636/2583 (26 [23-30])	6 (65)	1112/2583 (36 [25-48])	6 (96)	161/2379 (7 [6-9])	5 (47)	102/2184 (5 [3-8])	4 (72)	43/1732 (2 [2-3])	2 (0)	67/1865 (4 [3-6])	3 (30)	15/1732 (1 [0-4])	2 (69)	10/1141 (1 [0-2])	2 (0)	3/864 (0 [0-1])	1 (-)
Germany	669/2346 (29 [26-31])	2 (42)	850/2346 (36 [34-38])	2 (0)	33/863 (4 [3-5])	1 (-)	41/863 (5 [4-6])	1 (-)	12/863 (1 [1-2])	1 (-)	42/863 (5 [4-7])	1 (-)	10/863 (1 [1-2])	1 (-)	2/863 (0 [0-1])	1 (-)	6/863 (1 [0-2])	1 (-)
Greece	214/500 (44 [36-51])	3 (63)	92/500 (18 [11-29])	3 (84)	19/131 (15 [9-22])	1 (-)	19/254 (7 [5-11])	1 (-)	4/131 (3 [1-8])	1 (-)	4/131 (3 [1-8])	1 (-)	6/131 (5 [2-10])	1 (-)	0/131 (0 [0-6])	1 (-)	8/131 (6 [3-12])	1 (-)
Hungary	134/366 (37 [32-42])	1 (-)	48/366 (13 [10-17])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Iceland	4/18 (22 [9-46])	1 (-)	2/18 (11 [3-35])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Italia	941/3098 (28 [24-33])	8 (86)	1319/3098 (42 [37-48])	8 (89)	48/825 (6 [5-8])	5 (12)	9/106 (8 [4-16])	1 (-)	2/710 (0 [0-1])	4 (0)	33/404 (4 [1-18])	3 (80)	10/388 (2 [0-20])	2 (75)	17/604 (3 [2-5])	3 (17)	11/604 (1 [0-8])	3 (76)
Netherlands	266/1291 (20 [15-25])	3 (79)	415/1291 (33 [29-37]	3 (63)	21/407 (5 [3-8])	1 (-)	15/230 (7 [4-11])	1 (-)	22/637 (3 [2-5])	2 (0)	21/407 (5 [3-8])	1 (-)	-	-	5/230 (2 [1-5])	1 (-)	-	-
Norway	17/312 (5 [3-9])	1 (-)	153/312 (49 [44-55])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Poland	59/162 (36 [29-44])	2 (0)	34/162 (21 [15-28])	2 (0)	14/162 (9 [4-17])	2 (46)	-	-	8/162 (4 [1-26])	2 (75)	26/162 (16 [10-25])	2 (37)	6/162 (4 [1-13])	2 (46)	10/162 (6 [2-16])	2 (55)	8/162 (5 [2-12])	2 (30)
Portugal	5/19 (26 [11-50])	1 (-)	11/19 (58 [36-77])	1 (-)	2/19 (11 [3-34])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spain	487/2500 (19 [18-21])	3 (0)	1022/2500 (45 [38-53])	3 (90)	37/1506 (2 [2-3])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sweden	61/578 (11 [8-13])	2 (0)	147/578 (25 [14-40])	2 (92)	75/578 (11 [2-39])	2 (97)	59/276 (21 [17-27])	1 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
United Kingdom	393/1875 (21 [19-24])	3 (31)	418/1875 (24 [19-30])	3 (84)	312/1875 (15 [10-23])	3 (92)	67/1140 (6 [5-7])	2 (0)	56/1753 (2 [1-10])	2 (93)	89/1753 (5 [4-6])	2 (0)	9/1753 (0 [0-1])	2 (0)	-	-	-	-
Oceania	**275/1552 (17 [13-22])**	**5 (80)**	**538/1552 (36 [20-55])**	**5 (98)**	**158/1187 (13 [12-16])**	**4 (7)**	**9/129 (7 [4-13])**	**1 (-)**	**14/1058 (1 [1-2])**	**3 (0)**	**98/694 (9 [3-22])**	**3 (85)**	**22/694 (3 [2-5])**	**3 (0)**	**33/1187 (3 [2-5])**	**4 (57)**	**20/565 (4 [2-6])**	**2 (0)**
Australia	267/1492 (17 [13-23])	4 (84)	507/1492 (32 [16-55])	4 (98)	146/1127 (13 [11-15])	3 (0)	9/129 (7 [4-13])	1 (-)	12/998 (1 [1-2])	2 (0)	98/634 (12 [5-27])	2 (88)	20/634 (3 [2-5])	2 (14)	32/1127 (3 [2-6])	3 (70)	19/505 (4 [2-6])	1 (-)
New Zealand	8/60 (13 [7-24])	1 (-)	31/60 (52 [39-64])	1 (-)	12/60 (20 [12-32])	1 (-)	-	-	2/60 (3)	1 (-)	0/60 (1 [0-12])	1 (-)	2/60 (3 [1-12])	1 (-)	1/60 (2 [0-11])	1 (-)	1/60 (2 [0-11])	1 (-)

Résultats (non publiés) exprimés en pourcentage. CI = intervalle de confiance. I^2 = reflet de l'hétérogénéité des études.

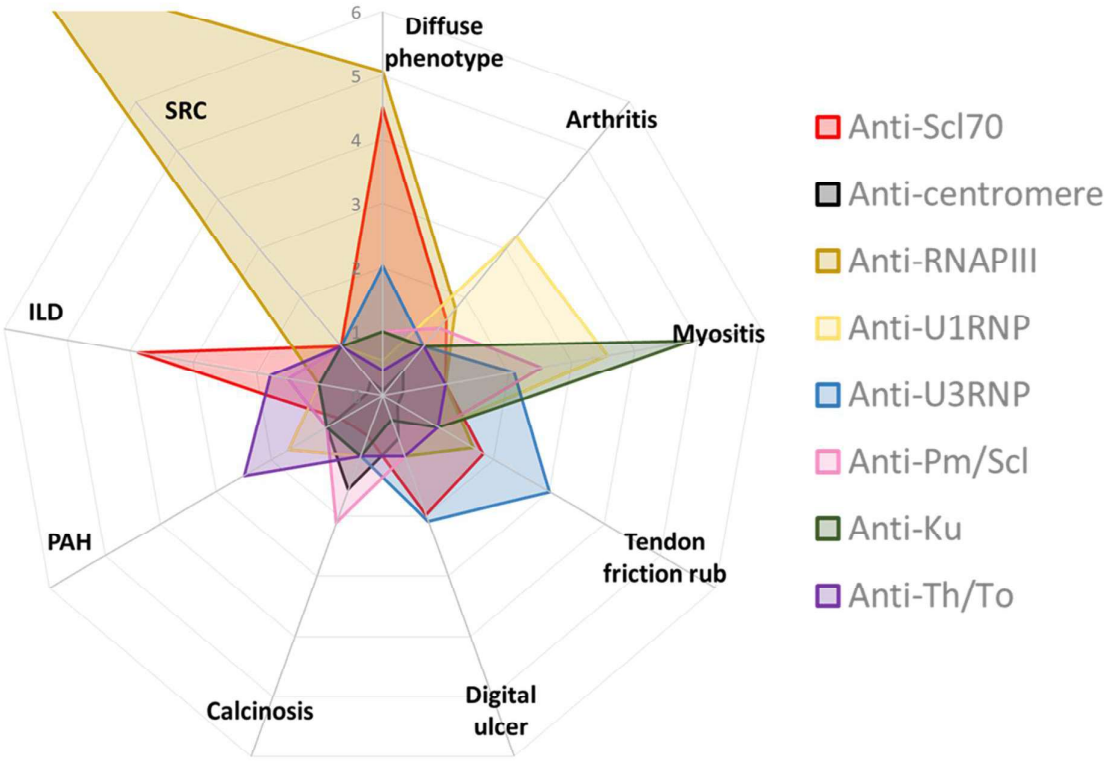


Figure 4. Représentation des associations entre anticorps spécifiques de la sclérodermie systémique et complications via méta-analyse. Les résultats sont exprimés en Odds Ratio (OR). Résultats non publiés.

1.4. Classifications et sous-classifications

Différentes classifications ont été proposées afin de distinguer les patients atteints de ScS d'autres populations de patients et d'inclure une population plus homogène dans les études. La première classification utilisée pour différencier des patients ayant une ScS d'autres patients date de 1980 et proposait des critères uniquement cliniques avec comme critère principal une sclérose cutanée proximale et comme critères mineurs, une sclérodactylie, la présence de cicatrices pulpaires et/ou la présence d'une fibrose pulmonaire bibasale (42). Malheureusement certains patients, notamment ceux avec une maladie récente (dits « early systemic sclerosis ») ou présentant certaines formes de sclérodermie limitée ne remplissaient pas suffisamment de critères rendant cette classification peu sensible (43).

En 1988, Leroy *et al*. proposent une sous-classification des patients atteints de ScS basée sur des critères cliniques mais également pour la première fois sur des critères immunologiques et capillaroscopiques (44). Leur classification distingue pour la première fois deux phénotypes

de patients selon l'extension de la fibrose cutanée en sachant que cette dernière débute toujours en distalité et peut s'étendre progressivement. Leroy *et al*. ont proposé de réviser leur classification en 2001 en incluant les « early systemic sclerosis » correspondant aux patients avec des atteintes microcirculatoires ainsi que la présence d'auto-anticorps mais sans sclérose cutanée suffisante (17).

Finalement, c'est en 2013 qu'est élaborée la classification actuelle, dite ACR-EULAR, élaborée sur panel d'experts, avec la prise en compte de critères cliniques, immunologiques et également de certaines complications fréquentes dans cette connectivite comme les PID ou l'HTAP (**Tableau 2**). L'ajout de ces critères a permis d'obtenir une bonne sensibilité et une bonne spécificité, 91 et 92% respectivement, par rapport à d'autres pathologies proches de la ScS (43).

Tableau 2. Classification ACR/EULAR de la sclérodermie systémique (43).

The ACR-EULAR Criteria for the classification of Systemic Sclerosis

1. These criteria are applicable to any patient considered for inclusion in a SSc study.

2. These criteria are not applicable to:

a) Patients having a SSc-like disorder better explaining their manifestations, such as: nephrogenic sclerosing fibrosis, generalized morphea, eosinophilic fasciitis, scleredema diabeticorum, scleromyxedema, erythromyalgia, porphyria, lichen sclerosis, graft versus host disease, and diabetic cheiropathy. b) Patients with `*Skin thickening sparing the fingers*',

Items	Sub-items	Weight / Score
Skin thickening of the fingers of both hands extending proximal to the metacarpophalangeal joints *(sufficient criterion)*		9
Skin thickening of the fingers^ *(only count the highest score)*	Puffy fingers Sclerodactyly of the fingers (distal to MCP but proximal to the PIPs)	2 4
Finger tip lesions^ *(only count the highest score)*	Digital Tip Ulcers Finger Tip Pitting Scars	2 3
Telangiectasia		2
Abnormal nailfold capillaries		2
Pulmonary arterial hypertension and/or Interstitial lung Disease* (*Maximum score is 2)	PAH ILD	2
Raynaud's phenomenon		3
Scleroderma related antibodies** (any of anti-centromere, anti-topoisomerasel	Anti-centromere Anti-topoisomerasel	3
[anti-Sd 70], anti-RNA polymerase III) (**Maximum score is 3)	Anti-RNA polymerase III	
	TOTAL SCORE^:	

Patients having a total score of 9 or more are being classified as having definite systemic sclerosis.

Depuis, il a été montré que cette classification en deux ou trois groupes étaient insuffisante puisque ne permettait pas de différencier correctement les patients en terme de sévérité et de pronostic (34,45).

1.5. Prise en charge thérapeutique

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif de cette pathologie (46). Le seul traitement ayant montré une efficacité est la transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques mais cette procédure n'est pas dénuée de risque et n'est proposée qu'aux patients ayant des complications assez sévères, mais ne contre-indiquant cependant pas la procédure (47). Plus récemment, la place des CAR-T Cells dans cette pathologie, et notamment

CD19+ a été soulevée (48). Ainsi, la prise en charge thérapeutique s'attache à prendre en charge chaque complication pour un patient donné et est donc à l'image de cette pathologie : très hétérogène, comme visible sur la **Figure 5** issue du Protocole National de Diagnostic et de Soins (49).

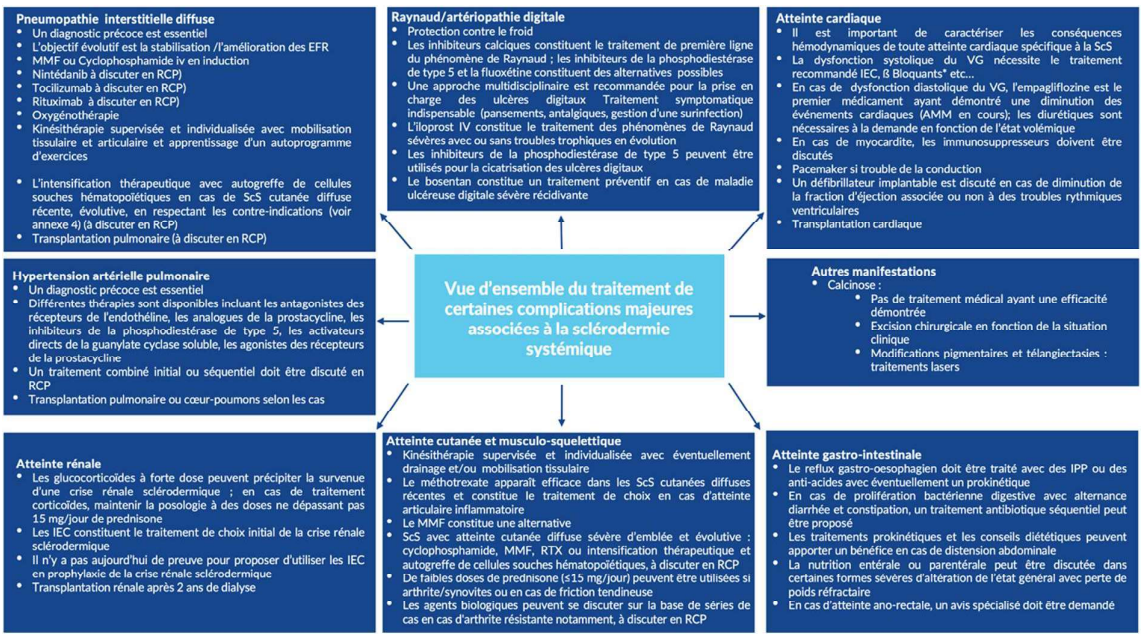


Figure 5. Prise en charge thérapeutique de la sclérodermie systémique selon le PNDS (49).

Concernant les deux principales complications potentiellement mortelles pouvant survenir dans cette pathologie, le recours aux immunosuppresseurs peut être indiqué dans le cas d'une fibrose cutanée et/ou pulmonaire rapidement évolutive. Historiquement, étaient utilisés préférentiellement le Cyclophosphamide ou bien le Mycophénolate Mofétil mais certaines données récentes suggèrent une place pour certaines biothérapies et notamment le Tocilizumab ou le Rituximab (49,50). Lorsque la ScS se complique d'une HTAP, l'immunosuppression n'a pas sa place et le traitement repose sur l'association de molécules vasodilatatrices ciblant l'endothéline 1, la phosphodiestérase de type 5, la guanylate cyclase, les prostacyclines et plus récemment la voie de l'activine avec le Sotatercept (46,49,51). La CRS quant à elle, qui représentait la principale cause de mortalité dans les années '70 a bénéficié de l'introduction d'inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) de l'angiotensine (26,52). Par ailleurs, il est recommandé de limiter l'utilisation de corticoïdes chez les patients ScS devant le risque de survenue de CRS et il n'est pas recommandé d'instaurer des IEC en prophylaxie de la SRC (53).

Les autres complications survenant dans la ScS sont traitées de façon symptomatique. Le phénomène de Raynaud est traité par inhibiteurs calciques et justifie l'introduction de prostacyclines en cas de sévérité et notamment de troubles trophiques (54,55). Les complications musculosquelettiques quant à elles sont traitées préférentiellement par faible de dose de corticoïdes avec Méthotrexate, avec un recours dans certains cas au Rituximab ou au Tocilizumab (49). L'atteinte digestive peut en fonction du type d'atteinte nécessiter l'instauration d'inhibiteurs de la pompe à proton (notamment en cas de PID), de prokinétiques, de cures séquentielles d'antibiothérapie en cas de pullulation microbienne et en cas de dénutrition une nutrition entérale ou parentérale (49,56). Les traitements immunosuppresseurs ou vasodilatateurs n'ont pas apporté de preuve d'efficacité dans ces atteintes digestives.

Malgré une meilleure compréhension et prise en charge de ces complications, la morbi-mortalité dans la ScS reste élevée, et il n'existe à l'heure actuelle pas de traitement fonctionnant sur tous les axes de cette pathologie, chaque complication étant traitée indépendamment des autres (22,46,49,57). Ainsi, une meilleure compréhension de la physiopathologie de la ScS reste indispensable afin de développer de nouveaux axes thérapeutiques.

2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE

La physiopathologie de la ScS, bien qu'incomplètement élucidée, se caractérise par une triade associant une dérégulation des fibroblastes aboutissant à une synthèse de collagène excessive, une dysfonction des cellules endothéliale (CE) aboutissant à une angiogenèse pathologique, et des anomalies du système immunitaire avec notamment de l'auto-immunité. Des anomalies d'autres composants, comme les plaquettes ont été mises en évidence et soulignent la compléxité de la pathogénie de la maladie. Le stress oxydatif, avec des formes réactives de l'oxygène (FRO), semble jouer un rôle majeur.

Des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux sont impliqués dans ces différentes dérégulations. Une vision synthétique et non exhaustive de la physiopathologie de la ScS est proposée en **Figure 6** (58).

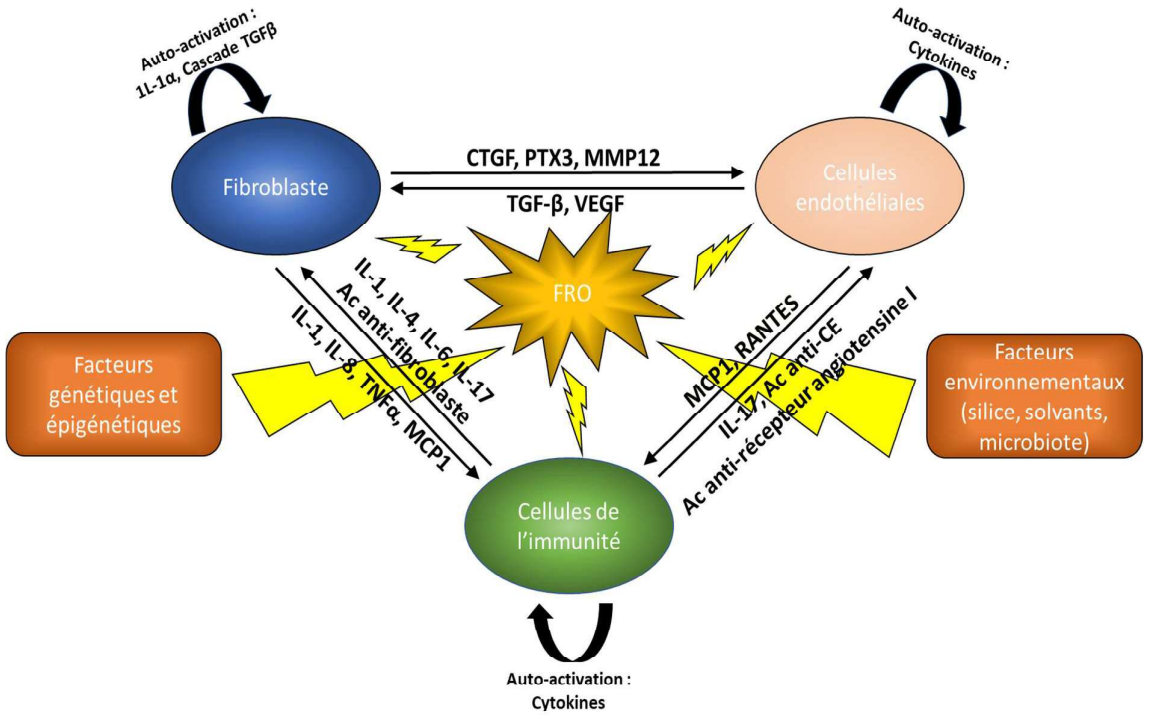


Figure 6. Rôle possible des formes réactives de l'oxygène dans la physiopathologie de la sclérodermie systémique s'articulant autour de 3 axes : fibroblastes, cellules endothéliales et cellules de l'immunité (58). Rôle central des formes réactives de l'oxygène (FRO) ciblant les 3 axes pathologiques. Ac = anticorps ; CE = cellule endothéliale ; CTGF = connective tissue growth factor ; FRO = forme réactive de l'oxygène ; IL = interleukine ; MCP1 = monocyte chemoattractant protein 1 ; MMP12 = matrix metalloproteinase 12 ; PTX3 = pentraxin 3 ; RANTES = regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted ; TGF-β = transforming growth factor-β ; TNF alpha = tumor necosis factor α ; VEGF = vascular endothelial growth factor.

2.1. Données sur la dysfonction fibroblastique

L'un des points clés au cours de la ScS est une fibrose excessive du derme et d'organes internes, pouvant impacter leur fonctionnement. Cette fibrose est liée à une dérégulation des fibroblastes et à un défaut de dégradation de la matrice extracellulaire aboutissant à une accumulation pathologique de collagène. Le dysfonctionnement des fibroblastes semble global, et non limité aux seules zones fibrosées (59).

2.1.1. Anomalies au niveau des fibroblastes

Il existe au sein des fibroblastes de ScS une dérégulation de la voie du *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) aboutissant à une synthèse excessive de collagène (60). Dans la ScS, le TGF-β est produit de façon excessive par les lymphocytes, les CE et les fibroblastes eux-mêmes (60). Par ailleurs, les fibroblastes de ces patients ont une expression accrue des récepteurs I et II du TGF-β au niveau de leur membrane et il existe également une accumulation nucléaire anormale de Smad 3 (protéine intracytoplasmique recrutée lors de la liaison du TGF-β à son récepteur et impliqué dans la régulation du procollagène) et ce, même en l'absence de stimulation par le TGF-β (61–63). De plus, il existe également un défaut de régulation de la cascade du TGF-β impliquant la cascade Smad, *protein tyrosine phosphatase 4A type 1* (PTP4A1) et Fli-1 (63–66). L'ensemble de cette dérégulation de la cascade du TGF-β aboutit à une synthèse accrue de procollagène et à la sécrétion de *connective tissue growth factor* (CTGF) qui n'est synthétisé par les fibroblastes qu'en présence de TGF-β (67,68). Ainsi, dans la ScS, le TGF-β semble jouer un rôle surtout dans l'induction de la fibrose plutôt que dans son maintien qui semble impliquer CTGF (69).

De plus, les fibroblastes de ScS acquièrent un phénotype particulier de myofibroblastes, reconnaissables à l'expression d'*alpha-smooth muscle actin* (α-SMA), capables de produire de grandes quantités de collagène (70). La transformation des fibroblastes en myofibroblastes pourrait être favorisée par le défaut d'expression du facteur de transcription Fli-1 et par certains auto-Ac dirigés contre le récepteur du *platelet derived growth factor* (PDGF), aboutissant à la formation de FRO (65,71,72). Ces FRO vont inhiber *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1B* (PTP1B, protéine régulatrice de la voie du PDGF) par oxydation et ainsi permettre une hyperphosphorylation du système *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) 1 et 2 entrainant un cercle vicieux d'hyperproduction de FRO ainsi qu'une synthèse accrue de collagène (73–75). De façon intéressante, la stimulation de fibroblastes par du sérum de patient ScS aboutit à la libération de débris protéiques oxydés reflétant le stress oxydatif environnant (76).

L'accumulation de collagène au niveau de la matrice extra-cellulaire est également favorisée par l'expression accrue d'ARN messager du gène PLOD2 qui entraîne une résistance à l'action des métalloprotéases (77). De plus, les fibroblastes des patients sclérodermiques ont une résistance à l'apoptose par un défaut du système Fas/Fas-ligand participant au maintien de la fibrose (78).

2.1.2. Facteurs extérieurs influençant la dysfonction des fibroblastes

D'autres cytokines que le TGF-β sont impliquées dans le dysfonctionnement des fibroblastes, et particulièrement l'interleukine-4 (IL-4). En effet, un excès d'IL-4 a été mis en évidence chez les patients ScS au niveau du sérum, de la peau fibrosée et dans le lavage broncho-alvéolaire de patients avec une PID comparé à des sujets contrôles (79–81). De plus, il a été démontré que l'IL-4 permet de stimuler la croissance des fibroblastes et augmente la synthèse de procollagène chez ces patients (82,83). Ainsi, le système immunitaire adaptatif influence les fibroblastes en modifiant l'environnement cytokinique, notamment l'IL-4 mais également via d'autres cytokines (84). Par ailleurs, il est également à l'origine de la production d'Ac anti-fibroblastes qui ont la capacité de stimuler les fibroblastes aboutissant à une synthèse accrue de chémokines pro-inflammatoires (85,86). Cliniquement, ces Ac sont associés à un phénotype particulier associant un phénotype cutané diffus et PID, indépendamment de la présence d'autres Ac, notamment d'Ac anti-topoisomérase I (87).

En sécrétant du TGF-β et du v*ascular endothelial growth factor* (VEGF), les CE participent également à une synthèse accrue de collagène par les fibroblastes (88,89). De plus, certaines CE ont la capacité d'acquérir des propriétés fibroblastiques sous l'action de TGF-β et d'endothéline-1, dans le cadre d'une transition endothélio-mésenchymateuse (90). La transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) se définit par le fait que certaines CE perdent certains marqueurs de CE vasculaires au profit de marqueurs endothéliaux, se différenciant en myofibroblastes (91). Ce processus a été mis en évidence à plusieurs reprises dans la peau fibrosé de patients ScS, et de façon plus importante que chez des sujets sains, suggérant que l'EndoMT participe en partie à la fibrose (90,92,93).

2.2. Données sur le dysfonctionnement endothélial

L'atteinte de l'endothélium est probablement très précoce et est un facteur majeur dans le développement de la ScS (94). Un dysfonctionnement et des anomalies de l'homéostasie des CE entraînent une altération de la barrière physiologique endothéliale et des anomalies de régulation du tonus vasculaire.

2.2.1. Anomalie de régulation du tonus vasculaire

Au cours de la ScS, on observe une anomalie de régulation du tonus vasculaire avec notamment des concentrations plasmatiques élevées d'endothéline 1. Ce peptide aux propriétés vasoconstrictrices, pourrait concourir au développement de phénomènes ischémiques distaux et à l'apparition d'une HTAP (95). La concentration plasmatique d'endothéline semble être corrélée à la sévérité de la micro-angiopathie, mais également à la sévérité de l'atteinte d'organe, principalement la fibrose pulmonaire, l'HTAP et la dysfonction rénale (96). En effet, outre son rôle dans la vasculopathie, l'endothéline serait capable de stimuler également les fibroblastes (97). Les effets produits dépendent du récepteur, mais aussi du tissu cible et de la concentration locale en endothéline 1. Il a été démontré qu'en bloquant la liaison de l'endothéline à son récepteur A, une vasodilatation était observée (98).

Dans la ScS, il existe une perturbation de la cascade rénine-angiotensine avec notamment une augmentation de la concentration sérique d'angiotensine II ayant un effet vasoconstricteur et une diminution de l'angiotensine [1-7] aux propriétés vasodilatatrices (99,100). La dérégulation de cette balance aboutit finalement à une vasoconstriction plus importante impliquée dans la CRS (101).

La vasoconstriction est également favorisée par une diminution de la NO synthase (puissant vasodilatateur) chez ces patients (102). De plus, il semble qu'un polymorphisme génétique aboutissant à une diminution de la disponibilité du NO puisse prédisposer à la ScS (103). Néanmoins, le rôle exact du NO reste controversé puisqu'un excès de cette molécule a été mis en évidence à la phase précoce de dcScS (104). En réalité, l'excès de NO semble aussi délétère que le déficit puisqu'il pourrait aboutir à la production de grandes quantités de radicaux libres oxygénés toxiques (105). De façon intéressante, la stimulation de CE par du sérum de patient ScS aboutit à la libération de débris protéiques oxydés reflétant le stress oxydatif généré par des molécules présentes dans le sérum de patients (76).

2.2.2. Altération de la barrière physiologique endothéliale

Au cours de la ScS, on observe une libération importante de molécules d'adhésion, et notamment d'E-Selectine, d'*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) et de *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) qui est corrélé à la sévérité des atteintes d'organe et de la microangiopathie (96,106–108). On observe également une libération de chimiokines (notamment *monocyte chemoattractant protein 1* [MCP-1] et *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* [RANTES]) dont les concentrations semblent corrélées à celles de l'endothéline-1, sous-entendant une corrélation entre vasculopathie et fibrose (109,110).

Dans la ScS, les concentrations sériques de microparticules endothéliales et non endothéliales sont également élevées (111). Ces microparticules proviennent des CE, des plaquettes et de cellules immunitaires et sont impliquées notamment dans l'inflammation et la prolifération cellulaire, reflétant la microangiopathie (111–113). Par ailleurs, les microparticules plaquettaires de patients ScS ont la capacité d'interagir et d'activer avec les polynucléaires neutrophiles (PNN) via *high mobility group box 1* (HMGB1) (114,115).

2.2.3. Anomalies de l'homéostasie des cellules endothéliales

Des anomalies de l'angiogenèse et de la vasculogenèse sont bien établies dans cette pathologie, en partie liées à une dérégulation du *vascular endothelial growth factor* (VEGF), facteur angiogénique impliqué dans la prolifération des CE, dont les concentrations élevées sont inversement corrélées à la densité capillaire ainsi qu'à la présence d'UD (116–118). Par ailleurs, un variant du VEGF, le VEGF(165)b, est particulièrement impliqué dans la prolifération anormale des CE dans la ScS (119,120). Parallèlement, les anomalies en lien avec le VEGF sont également renforcées par une élévation de divers facteurs anti-angiogéniques comme l'endostatine, la thrombospondine et le CXCL4 (121–124).

A la phase initiale de la maladie, on observe une diminution du nombre de cellules progénitrices endothéliales circulantes qui pourrait participer à la vasculopathie, renforcée par des modifications épigénétiques de ces cellules leur conférant un caractère inflammatoire et adhésif (125,126).

Par ailleurs, la pentraxine 3 (PTX3), une protéine jouant un rôle dans la néovascularisation, a été mise en évidence en excès chez les patients ScS et semble prédictif de la survenue d'UD et d'HTAP (127,128). On notera que la PTX3 est synthétisé par les

fibroblastes, renforçant l'idée d'une interconnexion entre fibrose et vasculopathie dans cette pathologie (129).

2.2.4. Facteurs extérieurs influençant la dysfonction endothéliale

Le système immunitaire est directement impliqué dans la dysfonction endothéliale. En effet, des Ac anti-CE ont été mis en évidence dans la ScS et sont associés à la survenue d'UD et d'HTAP (130). Leur rôle pathogène n'est cependant pas clairement établi mais ils permettraient la synthèse de molécules d'adhésion et pourraient induire l'apoptose des CE via le système Fas (131,132). D'autres Ac dirigés contre le récepteur de l'endothéline de type A et contre le récepteur de l'angiotensine de type 1 ont également été décrits (133,134). Leur rôle pathogène n'est pas clairement établi mais ces derniers sont associés chez l'homme au développement d'UD et d'HTAP, alors que leur administration chez la souris augmente la réactivité endothéliale vasculaire et induire une vasculopathie pulmonaire (133,135). Par ailleurs, il a également été mis en évidence que les exosomes (vésicules contenant de l'ADN, ARNs et protéines) provenant de neutrophiles de patients ScS avaient la capacité d'inhiber la prolifération et la migration de CE (136).

Comme décrit précédemment, la dysfonction endothéliale semble étroitement liée à la dysfonction fibroblastique, notamment par la synthèse de PTX3 et de CTGF (69,128). De plus, lorsque les CE de patients sont stimulées par du TGF-β et de l'endothéline-1, ces dernières perdent l'expression de marqueurs endothéliaux (notamment VE-cadhérine et CD31) et surexpriment des marqueurs fibrotiques comme l'α-SMA, confirmant l'induction d'une EndoMT (137). De façon intéressante, l'administration de TGF-β dans un modèle murin de sclérodermie a pour conséquence une dysfonction endothéliale aboutissant au développement d'une HTAP (138,139). Ces données en faveur d'une transition EndoMT ont été mises en évidence au niveau du derme de patients ScS. Ce phénomène était inhibé par l'adjonction d'antagonistes des récepteurs de l'endothéline (90,93).

2.3. Anomalies immunologiques

La ScS est habituellement classée parmi les pathologies auto-immunes systémiques dans la mesure où des auto-Ac anti-nucléaires sont détectés dans le sérum de plus de 95% des patients (18,24). Cependant, même si chaque Ac semble associé à un phénotype clinique propre,

le rôle pathogénique de la plupart de ces Ac n'est pas clairement établi même si de plus en plus de travaux suggèrent qu'ils contribuent à la pérennisation de la pathologie (30,140). En dehors de cette auto-immunité, il existe également des anomalies des différentes immunités qui participent activement à la ScS.

2.3.1. Anomalies de l'immunité humorale

Ainsi, la majorité des patients développent précocement (avant l'apparition des premiers symptômes cliniques) des auto-Ac qui s'accompagnent d'un phénotype clinique particulier (30,31). La production d'auto-anticorps semble être en lien avec des défauts de tolérance des lymphocytes B (LB), via les points de contrôle immunitaires, aboutissant à la production de LB auto-réactifs (141,142). La plupart de ces Ac n'ont pas de rôle pathogène clairement établis dans la physiopathologie de la ScS mais plusieurs travaux récents suggèrent néanmoins une participation de certains Ac à la physiopathogénie (140). En effet, il a été démontré que la concentration d'anti-topoisomérase I était corrélée à la liaison entre l'antigène TOPO-I à la membrane des fibroblastes et qu'ils avaient la capacité d'augmenter l'expression de marqueurs fibrosants par les fibroblastes (143,144). De plus, certains Ac ont la capacité d'interagir avec leur cibles comme les Ac anti-PDGFR, les anti-récepteur de l'endothéline-1, les anti-fibroblastes, les anti-CE ou encore les anti-récepteur de l'angiotensine, et d'influencer ainsi directement la prolifération et la différenciation des fibroblastes et des CE, promouvant ainsi l'excès de fibrose et la vasculopathie caractéristique de la ScS (131,132,134,145–147). De façon très intéressante, les modifications mises en évidence au niveau cellulaire semblent différentes selon le type d'anticorps (148).

D'autre part, il a été mis en évidence un infiltrat précoce de LB au niveau des organes atteints par la ScS (149,150). Il existe au cours de la ScS un défaut de l'homéostasie des LB. En effet, on observe une expression accrue de CD19 (stimulant le signal du *B cell receptor* [BCR]), en lien avec une sécrétion accrue de *B cell activating factor of the TNF* (BAFF) et une diminution de l'expression de CD22, impliqué dans la régulation négative de CD22 (151–154). Par ailleurs, les LB favorisent une réaction inflammatoire et fibrosante notamment en modulant l'environnement cytokinique via une augmentation d'IL-6 sécrétée par les LB effecteurs et une diminution de l'IL-10 par les LB régulateurs (155). Cette modification de l'environnement cytokinique est également renforcé par une interaction entre les LB et les lymphocytes T (LT), via *T cell Ig and mucin domain protein 1* (TIM-1) notamment (156).

Récemment, plusieurs patients ont été traités par CAR-T cells visant le CD19 avec une amélioration des scores d'activité de la pathologie, ainsi que du score de fibrose cutanée (score de Rodnan), suggérant une place importante des LB dans la physiopathologie de la ScS (48).

2.3.2. Anomalies de l'immunité cellulaire

Les LT semblent impliqués très précocement comme en témoigne l'infiltrat précoce de LT majoritairement CD4+ dans le derme des patients, dont l'importance est corrélée à la durée d'évolution ainsi qu'à la fibrose (157). Par ailleurs, les LT impactent directement les fibroblastes et CE. Ainsi, il a été mis en évidence qu'une sous-population de LT impliquée dans la prolifération de CE et la différenciation de précurseurs endothéliaux, appelée LT angiogénique ($CD3^+CD31^+CXCR4^+$), est directement corrélée à l'atteinte vasculaire dans la ScS (158,159). De plus, certains LT CD4+ sont capables d'induire l'apoptose de CE et de fibroblastes dans la ScS (160,161).

D'autre part, il existe une répartition anormale des différentes sous-populations de LT. En effet, on observe notamment une diminution de LT Th2 et régulateurs, aboutissant à une modification de l'environnement cytokinique (162). Certaines sous-populations de LT participent à l'excès de production d'IL-4 au niveau dermique mais également pulmonaire en cas de PID (80,81,163). Dans le même ordre d'idée, il a été mis en évidence une sécrétion plus élevée d'IL-17 chez les patients ScS, à tout moment de la maladie, au niveau du sang périphérique, ainsi qu'au niveau des lésions de fibrose cutanée et pulmonaire (164–167). Cette sécrétion accrue aboutit à une synthèse excessive de collagène par les fibroblastes mais également participe à la vasculopathie via l'inflammation de l'endothélium (84,168,169). Par ailleurs, une élévation de l'IL-31 a également été mise en évidence et cette dernière est impliquée dans le processus de fibrose et promeut une réaction Th2 (170). On observe également une diminution des LT régulateurs en lien avec une diminution d'expression d'IL-10 (171). Ces différentes polarisations aberrantes dans la ScS semblent favorisées par des altérations des cellules de l'immunité innée et notamment les cellules dendritiques (172).

2.3.3. Anomalies de l'immunité innée

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp) semblent jouer un rôle important dans la ScS, notamment à travers les voies *toll like receptor* (TLR) 8 et TLR9. En effet, l'inhibition fonctionnelles de ces CDp permet de prévenir la survenue de la fibrose dans un modèle murin de ScS, suggérant que ces cellules sont impliquées dans l'induction du processus de fibrose

(173). De façon intéressante, les patients atteints de ScS ont un nombre de CDp circulantes réduit, qui finalement infiltrent la peau des patients, aboutissant à une sécrétion d'agent chémoattractant CXCL4 (174). En réponse à cette sécrétion de CXCL4, il existe une production accrue d'interféron (IFN)-α à travers la polarisation de TLR7, TLR8 et TLR 9 (174–177). De façon intéressante, l'inactivation du chromosome X au niveau des loci TLR7 et TLR8 amène à une activité IFN de type I (IFN-I) chronique des CDp (177). De plus, la formation de complexes CXCL4-ADN est corrélée à l'IFN-I dans le sang et la peau de patients ScS (175). Dans le même ordre d'idée, CXCL4 protège l'ARN de la dégradation enzymatique en formant des complexes CXCL4-ARN mis en évidence dans le plasma des patients, et qui sont corrélés à la production d'IFN-I (178). Ces 2 derniers résultats suggèrent un rôle clé des CDp dans la production d'IFN-I à travers CXCL4. La production d'IFN-I correspond à la réponse finale de l'immunité innée à une agression. En pratique courante, il est difficile de mesurer directement les niveaux d'IFN-I dans les prélèvements sanguins humains. C'est pour cette raison qu'un process appelé signature IFN, basé sur l'expression transcriptomique de gène en lien avec l'IFN, a été développé. De façon intéressante, l'analyse en sang totale ou des cellules mononucléées circulantes des patients ScS a permis de mettre en évidence une signature IFN-I (179–183). De plus, cette signature IFN-I ou des dosages élevés d'IFN-α sont associés à un pronostic plus sombre, une atteinte vasculaire plus sévère et à la mise en évidence d'anticorps anti-topoisomérase I et anti-U1RNP (184–186). En lien direct avec ces observations, l'IFN-I participe à la vasculopathie via une inhibition de *friend leukemia integration* (Fli1) et de *vascular endothelial* (VE) cadherine (187). Dans le même ordre d'idée, un modèle murin base sur la délétion de Fli1 reproduit la vasculopathie existante dans la ScS, suggérant que l'IFN-I est bien impliqué dans la défaillance vasculaire de cette pathologie (188). De plus, plusieurs polymorphismes de gènes impliqués dans la régulation de l'IFN ont été identifiés comme associés au développement de la ScS (189). L'analyse de l'expression génique des biopsies cutanées de ScS révèle une surexpression de l'IFN-I, tout comme au niveau pulmonaire des patients atteints de PID, avec un risque de progression plus élevé (190–192).

Il a été mis en évidence que certains monocytes ($CD16^+$) étaient présents de façon plus abondante dans le sang des patients ScS et que ces derniers étaient associés à la sévérité de la fibrose cutanée et pulmonaire (193). De plus, les monocytes présents chez les patients ScS ont une capacité accrue d'adhésion via une diminution d'expression de CD52, ainsi qu'une diminution des capacités d'efferocytose, participant au processus de fibrose et d'auto-immunité par accumulation des corps apoptotiques (182,194,195). Par ailleurs, il existe dans la ScS un

infiltrat précoce de macrophages au niveau du derme et au niveau des poumons lors de PID (196–198). Ces macrophages activés expriment des marqueurs à la fois de type M1 et M2 et sont capables de sécrétés des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1α, l'IL-4, l'IL-6 et le TGF-β (199–204). Ainsi, il a été démontré que les macrophages avaient la capacité d'activer les fibroblastes et d'induire une différenciation en myofibroblaste lorsqu'à proximité, induisant ainsi le processus de fibrose (205).

A l'instar des macrophages, les mastocytes sont également connus pour leur sécrétion de TGF-β (206). Un infiltrat dermique de mastocytes a été mis en évidence chez les patients ScS, dont l'intensité varie selon la durée d'évolution (maximal au début de la pathologie) et la phase de la maladie (207,208). De façon intéressante, dans les biopsie cutanée de fibrose, les mastocytes sont au contact direct des fibroblastes activés, suggérant un lien étroit entre les deux cellules pouvant potentialiser la synthèse de collagène par les fibroblastes (209,210).

L'implication exacte des neutrophiles dans la ScS reste encore à préciser mais plusieurs travaux suggèrent qu'ils participent activement à cette pathologie. En effet, un excès de neutrophiles a été mis dans le lavage broncho-alvéolaire et le derme lésionnel de patients ScS (211–213). Par ailleurs, ces neutrophiles exhibent plusieurs anomalies impactant leur potentiel de migration et de phagocytose (214). D'autres parts, ces cellules immunitaires pourraient participer aux dysfonctions fibroblastiques et endothéliales caractéristiques de cette pathologie. En effet, dans un modèle murin de ScS, les neutrophiles permettent l'accumulation de macrophages M2 au niveau du derme, favorisant ainsi la dysfonction des fibroblastes et chez l'homme, ces macrophages recrutent des neutrophiles au niveau des poumons de patients avec PID en sécrétant de l'IL-8 (213,215). Les neutrophiles pourraient participer également directement à la dysfonction endothéliale via la sécrétion d'exosomes contenant de l'ADN et des protéines ainsi qu'en promouvant leur apoptose via la sécrétion d'IL-6 (136,216). Par ailleurs, des éléments en faveur d'une activation des neutrophiles ont été identifiés dans la ScS. En effet, il a été mis en évidence une concentration élevée dans le sérum des protéines S100A8 et S100A9 chez les patients ScS, notamment ceux se compliquant d'une PID (176,217). Ces protéines, également appelées calprotectine, représentent la majeure partie des protéines cytosoliques des neutrophiles et reflètent l'activité de ces derniers (218). Les neurophiles seraient activés par des peptides mitochondriaux ainsi que par des microparticules plaquettaires via HMGB1 dont l'élimination améliorerait la vasculopathie ainsi que la fibrose (114,115,219). Par ailleurs, les neutrophiles sont pourvoyeurs de stress oxydatif, lui-même impliqué dans la défaillance endothéliale et l'excès de fibrose dans la ScS (220,221).

2.4. Rôle du stress oxydatif

Le stress oxydatif joue très probablement un rôle central dans la ScS dans la mesure où il impacte les trois axes majeurs de cette pathologie à savoir la dysfonction des fibroblastes, des CE et du système immunitaire (222). Plusieurs études ont mis en évidence une élévation des marqueurs de stress oxydatif à plusieurs stades de la pathologie et ce, peu importe le type de ScS (223–227). De façon intéressante, des FRO reflétant le stress oxydatif ont été mises en évidence au niveau derme lésionnel mais également en peau saine des patients (228). Ces FRO présentes dans le derme lésionnel des patients, ainsi que d'autres marqueurs sériques reflétant le stress oxydatif, sont corrélés à la sévérité de la fibrose cutanée et également pulmonaire (76,225,226,228,229).

L'un des principaux modèles murins de ScS (appelé modèle HOCl pour acide hypochloreux) repose sur l'injection sous-cutanée d'agents oxydants (230). Ce modèle murin est capable de reproduire la fibrose cutanée et pulmonaire, la vasculopathie au niveau rénale mais également de l'auto-immunité avec la production d'auto-anticorps spécifique anti ADN topoisomérase 1.

2.4.1. Implication du stress oxydatif dans la dysfonction des fibroblastes

Le stress oxydatif est à l'origine d'une stabilisation par oxydation de PTP4A1, qui a pour conséquence une hyperactivation de la voie du TGF-β, ainsi qu'à une modification phénotypique des fibroblastes en faveur d'un profil inflammatoire et fibrosant (231–233). De plus, le stress oxydatif induit la libération d'adénosine triphosphate qui elle-même induit la production d'IL-6 et de collagène par les fibroblastes de patients (234). Par ailleurs, l'oxydation de l'ADN topoisomérase I (cible antigénique de certains auto-Ac dans la ScS) a la capacité d'induire une prolifération importante des fibroblastes, lorsque ces derniers sont exposés à cette molécule (230). Dans un modèle murin de ScS induit par la bléomycine, l'administration d'anti-oxydants diminue la synthèse accrue de collagène (235,236).

Dans la ScS humaine, il existe un défaut d'expression de Nrf2 ayant une activité anti-oxydante (237,238). De façon intéressante, l'utilisation de xanthohumol (ayant des propriétés anti-oxydantes) sur des fibroblastes de patients ScS permet d'atténuer la synthèse de collagène via un rétablissement de Nrf2 (239). Par ailleurs, les fibroblastes sont eux-mêmes à l'origine d'une sécrétion inappropriée de FRO par divers stimuli, ayant pour conséquence une hyperphosphorylation d'ERK 1 et 2 conduisant à une synthèse accrue de collagène (71,73,74).

La stimulation des fibroblastes par du sérum de patient aboutit à la libération de débris protéiques oxydés, traduisant le stress oxydatif (76).

2.4.2. Implication du stress oxydatif dans la dysfonction endothéliale

Le stress oxydatif semble jouer un rôle crucial dans le phénomène d'EndoMT qui lui-même participe au défaut d'angiogenèse (240). Dans un modèle murin de ScS $Tsk^{-/+}$, il a été démontré que le stress oxydatif était à l'origine d'une apoptose des CE et d'une EndoMT, avec une réversibilité à l'administration d'anti-oxydant (241). A l'instar de Nrf2, l'héméoxygénase-1 (une autre molécule anti-oxydante) est également sous-exprimée au niveau des fibroblastes de patients ScS et est à l'origine d'une angiogenèse anormale par un manque de formation de tubules, par défaut d'interaction entre fibroblaste et CE (242). Par ailleurs, l'impact vasculaire de la sous-expression de Nrf2 n'a pas été étudié dans la ScS mais il a été démontré qu'une activation de Nrf2 dans un autre cadre avait la capacité d'atténuer le remodelage vasculaire pulmonaire en inhibant le phénomène d'EndoMT (237,243).

Par ailleurs, le sérum de patients ScS mais également celui du modèle murin HOCl ala capacité d'induire la production d'H_2O_2 par les CE (230). De façon intéressante, les marqueurs de stress oxydatif circulants comme *heat shock protein 70* (Hsp-70), 8-isoprostane, 8-isoprostaglandin-F2α ou encore le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont associés aux modifications capillaroscopiques ainsi qu'aux complications vasculaires de la ScS comme l'atteinte vasculaire rénale, les UD ou l'hypertension pulmonaire (225–227,229). Par ailleurs, le 8-isoprostane semble jouer un rôle clé dans le défaut d'angiogenèse, notamment en activant le récepteur de thromboxane A2 inhibant ainsi l'effet du VEGF (244).

2.4.3. Implication du stress oxydatif dans les anomalies immunitaires

Dans la ScS, le système immunitaire est à l'origine de la production de plusieurs auto-Ac ayant pour conséquence une accentuation du stress oxydatif, soit par action agoniste, soit par inhibition de molécules régulatrices. En effet, il a été mis en évidence dans le sérum de patients ScS des Ac anti-peroxiredoxin I (enzyme anti-oxydante) dont les niveaux de détection sont corrélés au stress oxydatif ainsi qu'aux lésions vasculaires rénales et à la sévérité de l'atteinte pulmonaire (245). D'autres Ac dirigés contre la partie C-terminale de *Ral binding protein1* (RLIP76, une protéine catalysant le transport adénosine triphosphate dépendant du

glutathion) ont également été mis en évidence dans la ScS ayant pour effet d'induire l'apoptose de CE via la production de stress oxydatif (246). Les Ac anti-récepteurs du PDGF ayant une fonction agoniste quant à eux, ont la capacité d'induire du stress oxydatif via le système ERK ce qui participe à la synthèse de collagène via le processus d'EndoMT (72,74).

De façon intéressante, le type d'auto-Ac produit dans le modèle murin HOCl est différent selon l'agent oxydant utilisé avec la production d'Ac anti-topoisomérase I ou d'Ac anti-centromère, suggérant des mécanismes de production différent en fonction de la source oxydante (230). Inversement, l'utilisation d'agents anti-oxydants dans ces modèles murins de ScS a entre autre pour conséquence de limiter le développement d'auto-Ac, suggérant ainsi un rôle clé du stress oxydatif dans la rupture de tolérance de la ScS (237,247).

Par ailleurs, les cellules immunitaires sont également impactées par le stress oxydatif environnant. Sous l'effet du stress oxydatif, la voie *mitogen-activated protein kinases* (MAPK)/ERK des macrophages alvéolaires de patients ScS est activée, ayant pour conséquence d'activer une cascade pro-fibrosante, à l'origine du développement de PID (248). Le stress oxydatif a la capacité d'activer les neutrophiles via HMGB1 avec pour conséquence d'accroître la production de FRO (249). Par ailleurs, les neutrophiles sont connus pour être fortement pourvoyeurs de stress oxydatif, notamment dans la ScS (250). De façon intéressante, le stress oxydatif est à l'origine de la libération de grande quantité de S100A8/S100A9 par les neutrophiles, protéines signant l'activation des neutrophiles (176,217,218). Ainsi, l'activation des neutrophiles est dépendante du stress oxydatif et les neutrophiles activés sont capables d'induire à leur tour du stress oxydatif, formant ainsi une boucle d'auto-amplification s'articulant autour du stress oxydatif.

Les neutrophiles activés ont plusieurs mécanismes effecteurs à leur disposition : la phagocytose, la dégranulation et la formation de NETs (Neutrophil Extracellular Traps), un mécanisme décrit plus récemment (251). Ce phénomène appelé NETose est dépendant du stress oxydatif.

3. NETOSE DANS LA SCLERORDERMIE SYSTEMIQUE ET D'AUTRES MALADIES AUTO-IMMUNES ET VASCULAIRES

Brinkmann *et al.* décrivait en 2004 le phénomène de NETose mais d'autres équipes avaient déjà mis en évidence antérieurement un mécanisme de mort des neutrophiles différents de l'apoptose et de la nécrose après stimulation *in vitro* par du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) aboutissant à une décondensation de la chromatine, une dissolution de la membrane nucléaire et un relargage de chromatine recouverte de diverses protéines (252,253). Si ce processus a été décrit initialement dans le cadre de l'immunité anti-bactérienne il a depuis a été mis en évidence dans de nombreux contextes (254).

3.1. Généralités sur le phénomène de NETose

3.1.1. Description du phénomène de NETose

Les NETs sont composés de filaments d'ADN à chromatine décondensée provenant des neutrophiles à partir de pores d'environ 200nm, formant une sorte de toile d'araignée comme visible sur la **Figure 7** (252,255). Ces filaments sont recouverts de protéines nucléaires comme les histones, la neutrophile elastase (NE), la myélopéroxydase (MPO) ou encore des protéines cytosoliques comme des protéines de la famille S100 et notamment S100A8/A9 mais dont la composition varie selon le stimulant et le contexte pathologique (256–258).

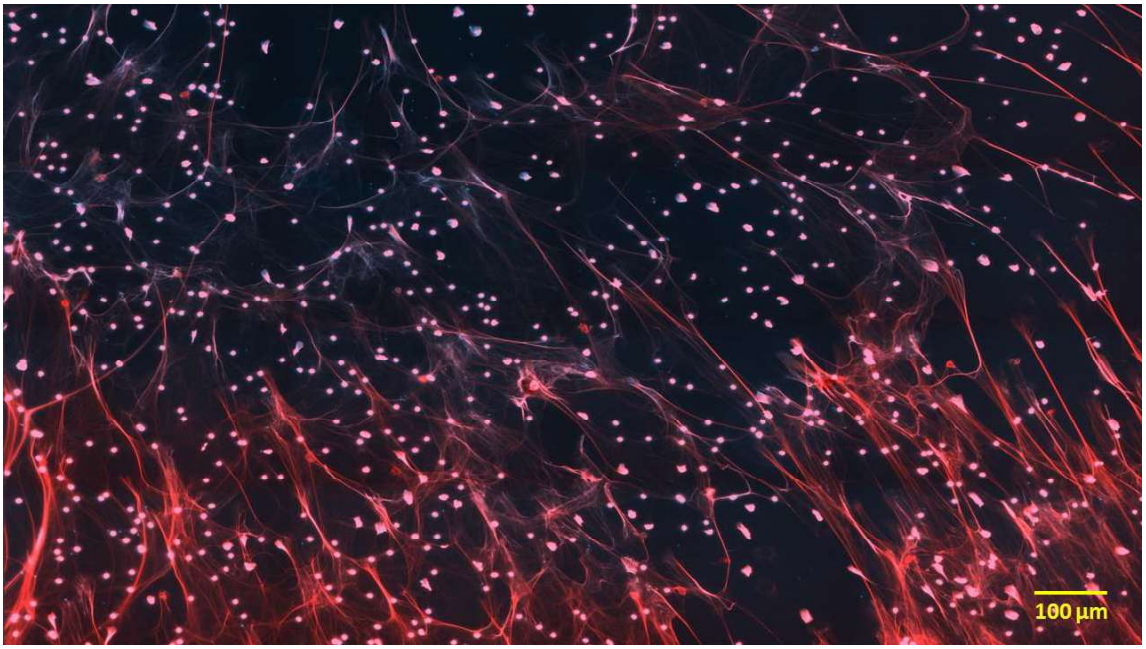


Figure 7. NETose induite par stimulation par du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Chaque point lumineux correspond à un noyau de polynucléaire neutrophile provenant d'un donneur sain et les filaments en provenant correspondent aux NETs. Image obtenue via la superposition de 4 par 4 images successives, au grossissement 20x, de 392,615 µm par 293,3375 µm chacune avec marquage de l'ADN via du Sytox Orange et du Hoechst 33342. Image issue de données personnelles.

La libération de NETs débute par l'activation de récepteurs de surface amenant à un changement intracellulaire de la concentration en calcium, l'activation de kinases et la production de FRO (259). Après stimulation, la concentration intra-cellulaire de calcium augmente (260–262). L'enzyme *peptidyl arginine deiminase 4* (PAD4) impliquée dans certaines formes de NETose requiert une concentration élevée en calcium pour être activée (263–265). Plusieurs voies kinases sont impliquées, telles que *protein kinase C* (PKC), MAPK/ERK ou encore SYK-PI3K-mTORC2 (pour *spleen tyrosine kinase*, *phosphoinositide 3-kinase* et *mTOR Complex 2*). Les voies impliquées dépendent du stimulus utilisé pour induire la NETose (266,267).

Après l'initiation du phénomène de NETose par divers stimuli, une décondensation de la chromatine se produit, faisant intervenir des modifications post-traductionnelles des histones (259). Ainsi, ces modifications des histones sont basées sur la citrullination via PAD4, des clivages via des sérine protéases ou encore l'acétylation des histones (262,268,269). La citrullination via PAD4 correspond à une modification post-traductionnelle des histones en convertissant une arginine en citrulline, aboutissant à une décondensation de la chromatine en diminuant les interactions électrostatiques entre les histones et l'ADN (259,270). Les neutrophiles provenant de souris déficientes en PAD4 ne sont pas capable d'induire la citrullination d'histone H3 et ne peuvent induire la NETose via différents stimuli (ce point est abordé ci-dessous). (264,271). Ainsi, la citrullination des histones via PAD4 semble indispensable au processus de NETose mais la décondensation de la chromatine fait également intervenir diverses protéases. En effet, la NE et la MPO ont la capacité de cliver les histones libérant ainsi l'ADN des histones (268). Une activité transitoire de la NE et de la cathepsine G est détectée dans le cytosol des neutrophiles 30 minutes après stimulation par le PMA, suggérant un relargage intra-cellulaire à partir des granules de neutrophiles, médié par la MPO (268,272). Plus récemment, l'acétylation des histones a été suggérée comme facilitant la décondensation de la chromatine (269).

Avant la libération d'ADN dans le cytosol, il existe un remodelage des lamines ainsi que la formation de trous dans l'enveloppe nucléaire avant sa rupture (273–277). Au cours de la NETose, on assiste à des discontinuités au sein du réseau de lamines à partir desquelles l'ADN décondensé va s'extruder (275–277). Ces remodelages du réseau de lamines seraient en lien avec des phosphorylations des lamines, notamment via PKC (277,278). La rupture de l'enveloppe nucléaire est favorisée par la Gasdermin D, une protéine à l'origine de pores

nucléaires, en formant des vésicules suite au clivage par diverses protéases selon le stimulant utilisé (273,279,280).

Une fois que la chromatine décondensée est libérée du noyau vers le cytosol, cette dernière se fraie un chemin à travers le cytosquelette via une réorganisation de ce dernier. En effet, il a été mis en évidence qu'avant la libération de NETs, il existait un désassemblement des fibres intermédiaires de Vimentine, des filaments d'actine et des microtubules (272,275,276,278). La désorganisation des fibres d'actine est l'un des processus les plus précoces de la NETose, survenant dans les premières minutes suite à la stimulation (275,276). Dans le même ordre d'idée, les neutrophiles en cours de NETose désassemblent leurs réseaux de microtubules et voient leur concentration de Vimentine diminuer (276,278). Par ailleurs, il semblerait que cette désorganisation du cytosquelette ait une régulation spatiale dans la mesure où les fibres de Vimentine se désassemblent de façon plus importante en périphérie (276). Après cette désorganisation du cytosquelette, le réticulum endoplasmique se met à vésiculer et ce, avant même que la rupture de la membrane nucléaire ait eu lieu (276). Par ailleurs, les mitochondries jouent un rôle important dans la NETose dans la mesure où elles représentent une source importante de FRO, impliqués notamment dans la NETose associée au calcium ionophore ou médiée pour les complexes immuns ribonucléoprotidiques (281,282). L'ADN mitochondrial peut d'ailleurs être rejeté en dehors de la cellule et même s'associer à de l'ADN nucléaire sur les NETs dans certains cas (282–284). De façon intéressante, cet ADN mitochondrial est également connu dans d'autres pathologies pour avoir la capacité d'induire une réponse inflammatoire via NLRP3 et l'induction d'IFN-I (285–287).

Avant la rupture de la membrane plasmatique pour libérer les NETs, il est observé une perméabilité accrue de cette dernière ainsi que la formation de pores faisant intervenir la Gasdermin D (276,279,280). Cependant, le mécanisme exact de la rupture de la membrane plasmatique demeure inconnu et le fait qu'elle survienne dans les minutes à heures suivant une augmentation croissante de sa perméabilité suggère qu'il ne s'agit pas simplement d'un éclatement du NEUTROPHILES (259,276). La principale hypothèse à l'heure actuelle est que l'augmentation de la pression engendrée par la décondensation de la chromatine finit par rompre la membrane plasmatique fragilisée par une augmentation de la perméabilité (275).

Le phénomène de NETose aboutit finalement à un relargage dans le milieu extra-cellulaire de filaments d'ADN recouverts de protéines présentes dans les granules de neutrophiles telles que la NE, la MPO, la cathepsine G ou encore des histones citrullinées

(252,268,272). Une représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans le processus de NETose est proposée par Thiam *et al*. (**Figure 8)** (259).

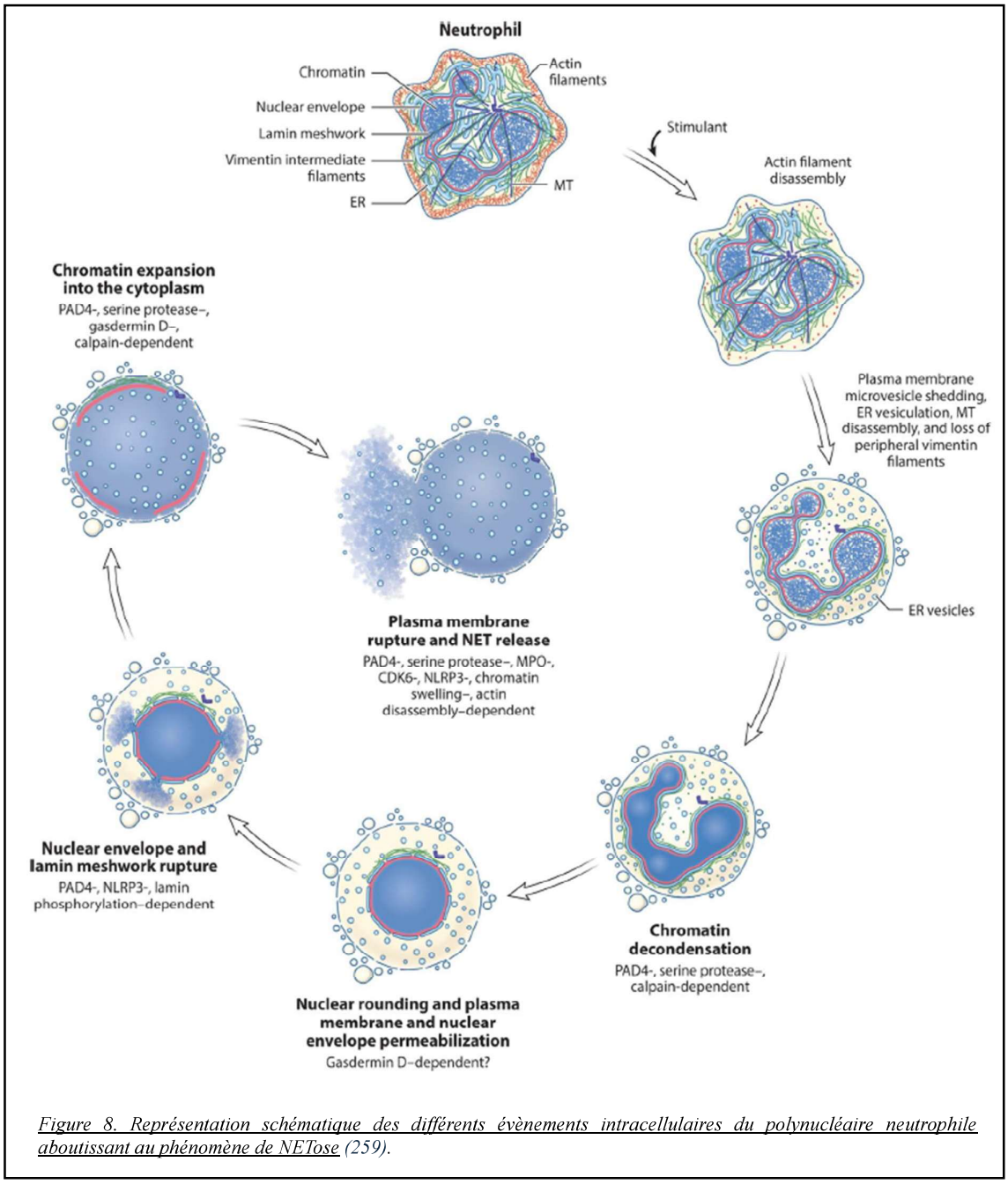


Figure 8. Représentation schématique des différents évènements intracellulaires du polynucléaire neutrophile aboutissant au phénomène de NETose (259).

3.1.2. Voies impliquées

Jusqu'à maintenant, on distingue deux principales voies d'activation du phénomène de NETose : une voie NADPH-oxydase (Nox)-dépendante, la plus étudiée, et une voie Nox-indépendante (288). Les principaux agonistes de la voie Nox-dépendante sont le

lipopolysaccharide (LPS) et le PMA (252,289). Une fois l'enzyme Nox activée, s'ensuit la génération de FRO impliqués dans la désintégration des membranes nucléaires et des granules azurophiles (268,273). Ceci aboutit à la libération de protéases telles que la NE ou la MPO, normalement contenues dans les granules azurophiles, allant interagir avec les histones et ainsi favoriser la décondensation de la chromatine (268). Le rôle de PAD4 dans ce processus Nox-dépendant reste sujet à contention. En effet, certaines équipes ont mis en évidence que sous l'effet du PMA, le phénomène de NETose pouvait survenir sans citrullination mais à l'inverse, d'autres équipes ont mis en évidence que l'utilisation d'inhibiteurs de PAD4 empêchait cette forme de NETose. De même, les neutrophiles provenant de souris déficiente en PAD4 n'étaient pas capable de produire des NETs en réponse à la stimulation par du PMA ou du LPS (264,281,290–292).

Le principal agoniste utilisé pour stimuler la voie Nox-indépendante est le calcium ionophore (293). Cette voie d'activation se caractérise par une hyper-citrullination des histones H3 ayant pour conséquence de favoriser la décondensation de la chromatine (262,291). De façon intéressante, la voie Nox-indépendante est fortement associée à la concentration intra-cellulaire en calcium dans la mesure où l'inactivation de SK3 (le plus commun des canaux calcium-potassium dans les neutrophiles) a pour conséquence d'inhiber le phénomène de NETose via cette voie (281). Par ailleurs, la production de FRO mitochondriaux fait intervenir la voie Nox-indépendante (281).

Selon la voie impliquée (Nox-dépendante ou -indépendante), différentes kinases sont impliquées mais certaines étant communes, suggérant un lien étroit entre ces deux voies d'activation (266,267,288). Une représentation schématique des deux principales voies d'activation est proposée par Ravindran *et al*. dans la **Figure 9** (288).

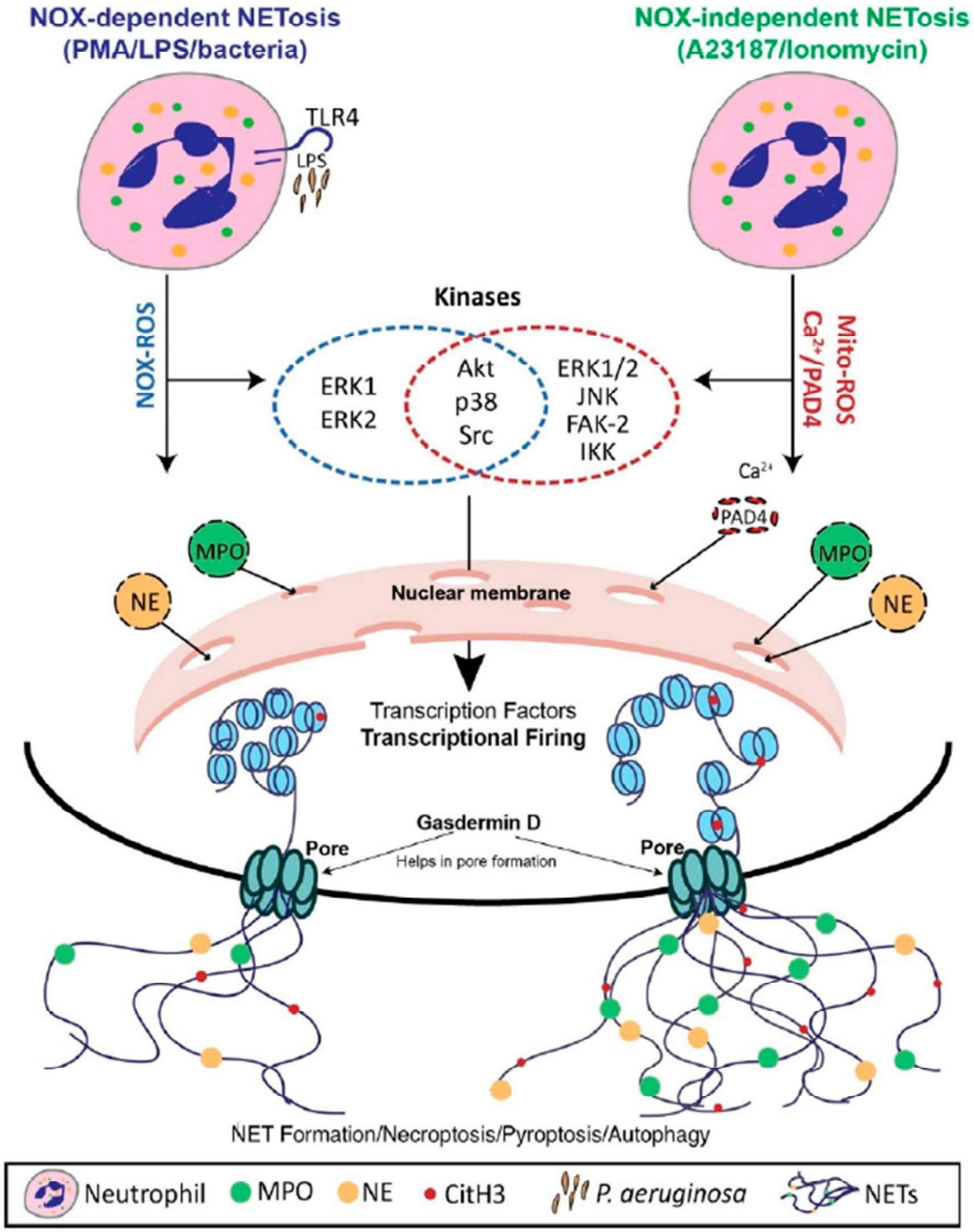


Figure 9. Voies d'activation impliquées dans le phénomène de NETose selon Ravindran et al. (288).

3.1.3. Principe de NETose vitale ou suicide

Le phénomène de NETose était initialement décrit comme un processus de mort cellulaire programmé distinct de l'apoptose et de la nécrose (252,253). En effet, la mort des neutrophiles survenait entre 2 et 4h après la stimulation (281,294–296). Cette « NETose suicide » était initialement considérée comme Nox-dépendante mais de plus récentes études ont démontré qu'il existait également une forme Nox-indépendante facilitée par l'influx de calcium et les FRO mitochondriaux (273,281,297).

Cependant, la libération de NETs peut également survenir sans aboutir à la lyse du neutrophiles et ce processus est appelé « NETose vitale » par opposition à la « NETose suicide » (298–300). Plusieurs formes de NETose vitales ont été décrites aboutissant à un relargage d'ADN mitochondrial ou à la formation de vésicules contenant de l'ADN nucléaire (298,301). Ce processus est plus rapide que la NETose suicide et survient dans les 5-60 minutes suivant la stimulation (299,301). Le mécanisme est différent selon la stimulation utilisée (composant C5a, le LPS ou encore TLR4 à la surface plaquettaire) (298,299,301). A la fin du processus, le neutrophile garde ses capacités de phagocytose et de chimiotactisme (302).

3.1.4. Stimuli de la NETose

Initialement, la NETose a été mise en évidence comme une participation à la réponse anti-infectieuse. De ce fait, le principal stimulus identifié initialement était le lipopolysaccharide, qui est par ailleurs toujours utilisé en tant que contrôle positif (252). Par la suite, il a été mis en évidence que la plupart des motifs protéiques membranaires des agents infectieux avaient la capacité d'induire la NETose, notamment via différent TLR (303). De plus, il est maintenant clairement admis qu'il existe une interaction entre les plaquettes et les NETs dans la réponse anti-infectieuse (289,304)

Les plaquettes représentent des acteurs extrinsèques majeurs du phénomène de NETose. En effet, les plaquettes ont la capacité d'induire la production de NETs via l'interaction entre P-selectine, surexprimée à la surface des plaquettes activées, et *P-selectine glycoprotein ligand 1* (PSGL-1) exprimée à la surface des neutrophiles (305). Parallèlement à P-selectine, les plaquettes peuvent également relarguer des facteurs tels que des chémokines, du facteur von Willebrand ou encore du thromboxane A2 qui permettent de recruter les neutrophiles et de favoriser la formation de NETs, (306,307). A leur tour, les protéines S100A8/A9 relarguées par les neutrophiles ont la capacité d'induire une activation des plaquettes via TLR4, aboutissant au relargage d'ADN mitochondrial oxydé par les plaquettes, fortement pourvoyeur de NETose,

formant ainsi une boucle d'auto-amplification (308). Par ailleurs, les plaquettes ont également la possibilité de relarguer ou de présenter HMGB1, induisant l'autophagie au sein des neutrophiles et promouvant ainsi la NETose en inhibant l'apoptose (309). La protéine HMGB1 induirait la NETose via la voie TLR4/MyD88 (310).

D'autre part, Il a été mis en évidence que les ligands des récepteurs du TNF, le fragment Fc des immunoglobulines, ainsi que les ligands de *G-protein-coupled receptors* (GPCR) avaient la capacité d'induire la NETose (260,311,312).

3.1.5. Régulation de la NETose

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la régulation du phénomène de NETose. Il a été mis en évidence que la production d'IL-10 régulait la formation de NETs en diminuant la production de FRO (313). Le phénomène de NETose est également modulé par des voies métaboliques, notamment celles régulant la voie NADPH. En effet, il a été mis en évidence qu'un déficit sévère en *glucose-6-phosphate déshydrogénase* favorisait les infections par l'absence de NETose (314). Dans le même ordre d'idée, il a été mis en évidence que la phosphofructokinase de type 1 (modulant la glycolyse dans les neutrophiles) déterminait le niveau d'activité de Nox et donc la formation de FRO, impactant directement la formation de NETs (315).

Par ailleurs, la clairance des NETs est principalement dépendante des macrophages et des désoxyribonucléases (DNases) extracellulaires (316). Les macrophages phagocytent les NETs via un processus actif facilité par la DNase I et l'opsonisation des NETs (316). Cette dégradation des NETs par les macrophages semble par ailleurs différente selon la polarisation de ces derniers et notamment être plus importante pour les macrophages pro-inflammatoires (317). Les DNASEs régulent strictement la disponibilité et la qualité des ADNs endogènes afin de contrôler leur potentiel immunostimulant. Ces DNASEs sont classées selon leur localisation intracellulaire ou extracellulaire (318). La famille des DNASE 1 extracellulaires comprend 4 enzymes : la DNASE1 et les DNASE1 like 1,2 et 3 (DNASE1L1, DNASE1L2 et DNASE1L3). Ces nucléases présentent un haut degré d'homologie (~51%). La DNASE1L3 avec la DNASE1 sont responsables de la totalité de l'activité endonucléase détectée dans le sérum (319). Certains travaux ont suggéré rôle de la DNASE 1 dans le lupus mais ceci n'a pas été confirmé dans d'autres. Dans le cadre du sepsis, des études ont mis en évidence que la DNASE1 pourrait aider à diminuer l'inflammation liée à la formation de NETs. L'utilisation d'une DNASE1

recombinante a démontré une amélioration de la survie de souris en choc septique (320). La DNASE1L3, est capable de digérer les ADNs « nus » et libérés par les NETs mais moins efficacement que la DNASE1 (319,321,322). Les souris Dnase1l3 KO développent les caractéristiques principales du LES, incluant des taux élevés d'anticorps anti-ADN et anti-nucléosome ainsi qu'une pathologie rénale (glomérulonéphrite) mineure (323). Chez l'Homme, les études pionnières de Al-Mayouf et al., ont conduit à l'identification d'individus ayant une mutation nulle homozygote récessive autosomique dans le gène DNASE1L3, présentant un lupus érythémateux systémique (LES) sévère pédiatrique (324). Hartl et al. ont aussi montré que plus de 50% des patients lupiques, ne présentant pas d'altération génétique de la DNASE1L3 ont une activité réduite de cette dernière (325). La diminution de l'activité de la DNASE1L3 a été détectée chez les patients ayant une atteinte rénale sévère (glomérulonéphrite) et résulte de la présence d'auto-anticorps dirigés contre la DNASE1L3 bloquant sa fonction (325). Comme dit précédemment, certains patients atteints de ScS présentent une mutation sur le gène codant pour la DNASE1L3 qui semble réduire la sécrétion de la DNASE1L3 mais aussi altérer sa stabilité structurelle, ce qui au final réduit son activité catalytique (10–14). En accord avec ces observations, il a été récemment montré que les patients ScS porteurs de ce polymorphisme présentent une diminution de l'activité circulante DNASE1L3, mesurée par la capacité à digérer l'ADN génomique associé aux microparticules (15). Cette diminution d'activité de la DNASE1L3 était accompagnée d'une réduction de la fragmentation des ADNs génomiques circulants et donc d'une accumulation des grands fragments d'ADN chez ces patients ScS (15). Le lien avec la NETose et globalement la physiopathogénie de la ScS n'est cependant pas connu.

3.2. Effets des NETs dans différents contextes pathologiques

Initialement, le phénomène de NETose fut mis en évidence dans un contexte infectieux, en réponse à une large variété de stimuli et son rôle était anti-infectieux (326). Cependant, ces dernières années ce processus a également été mis en évidence dans pathologies auto-immunes et inflammatoires dans lesquelles il joue un rôle clé. Nous détaillons ici quelques contextes pathologiques.

3.2.1. Phénomène de NETose dans le lupus systémique

Le LES est une connectivite rare caractérisée par une présentation clinique très hétérogène allant d'une atteinte cutanéo-articulaire jusqu'à des atteintes rénale ou neurologique

sévères, pouvant menacer le pronostic vital (327). Cette pathologie est associée à la présence d'anticorps aux cibles nucléaires chez la quasi-totalité des patients ainsi que des anomalies du complément (327). De plus, il existe une association classique entre LES et le syndrome des anti-phospholipides (SAPL) se manifestant par des thromboses dans près de 20 à 30% (328).

Les neutrophiles de LES présentent plusieurs anomalies avec notamment un défaut d'apoptose et ainsi qu'un métabolisme oxydatif anormal (282,329,330). De plus, il a été mis en évidence qu'une sous population de neutrophiles appelée *low density granulocytes* (LDG) était présente de façon plus importante chez les patients lupiques et était associée à l'activité de la maladie (331,332). De façon intéressante, les neutrophiles de LES et en particulier les LDG ont une capacité accrue à produire des NETs, dont le contenu est important en molécules immunostimulantes ainsi qu'en auto-antigènes (282,333–335). L'excès de NETs présent dans la population lupique semble être en lien avec à la fois un excès de production mais également un défaut d'élimination. En effet, il a été mis en évidence à la fois un défaut quantitatif de DNase 1 ainsi qu'un défaut fonctionnel de cette dernière en lien avec la présence d'anticorps à la surface des NETs, empêchant ainsi le clivage par la DNase (321).

Il existe des arguments forts plaidant en faveur d'une participation des NETs aux anomalies existantes dans le LES. En effet, des NETs ont été mis en évidence au niveau de la peau lésée et également au niveau des reins (335,336). Il existe une surexpression des gènes associés à la NETose au niveau lésionnel (337). De plus, la NETose semble impliquée dans la vasculopathie du LES, notamment via *hypoxia-inducible factor-1α* (HIF-1α), ainsi qu'en favorisant l'EndoMT (336,338). Enfin, les NETs participent à la rupture de tolérance caractéristique de cette pathologie (335). Le niveau de NETose circulant est associé à l'activité du LES ainsi qu'aux atteintes d'organe (339–341).

Le SAPL est également associé au phénomène de NETose. Les anticorps IgG de patients SAPL ont la capacité d'induire la production de NETs et également d'inhiber leur dégradation (342–344). Ces NETs sont retrouvés dans la circulation mais également au niveau des lésions thrombotiques, avec une surexpression des gènes associés à la NETose (337,343,345). Les Ac associés au SAPL ont également la capacité de se lier aux NETs mais l'impact de cette liaison reste encore à démontrer (346).

3.2.2. Phénomène de NETose dans les vascularites à ANCA

Les vascularites associées aux anticorps anti-cytoplasmes des neutrophiles (ANCA) représentent un groupe de vascularites touchant les petits vaisseaux associées à la production d'auto-Ac, à l'origine de manifestations systémiques et d'atteintes potentiellement graves à type de mononévrite, d'hémorragie intra-alvéolaire ou encore de glomérulonéphrite rapidement progressive (347). On distingue ainsi trois entités selon la présentation clinique, les lésions histologiques ainsi que la spécificité antigénique des Ac mis en évidence : la granulomatose avec polyangéite (GPA), la polyangéite microscopique (PAM) et la granulomatose éosinophilique avec polyangéite (GEPA). Les Ac mis en évidence dans ces pathologies sont les Ac anti-protéinase 3 (PR3) et les anti-MPO, ces derniers ont la particularité d'être décrits comme pathogènes (348).

Les vascularites à ANCA furent les premières pathologies auto-immunes dans lesquelles le phénomène de NETose a été montré comme possiblement pathogène. En effet, il a été démontré que la stimulation des neutrophiles par des ANCA avait pour conséquence la production de NETs arborant les auto-antigènes PR3 et MPO (349). De façon intéressante, le phénomène de NETose est directement impliqué dans la production d'ANCA dans la mesure où l'utilisation d'inhibiteur de PAD4 permet d'inhiber la production de NETs mais également la formation d'anti-MPO (350). De plus, il a été démontré que ces ANCA avaient la capacité d'induire et de promouvoir le phénomène de NETose (351,352). Ce phénomène est lié à une production accrue de NETs, notamment via un nombre plus important de LDG, mais également à un défaut de dégradation à l'instar du LES (351,353–357). De façon intéressante, le taux de NETs circulants dans les vascularites à ANCA est corrélé à l'activité de la vascularite. Enfin, des dépôts de NETs ont été mis en évidence dans les organes lésés (349,353,357–363).

3.2.3. Phénomène de NETose dans les myopathies inflammatoires

Les myopathies inflammatoires (ou myosites) représentent un groupe très hétérogène de pathologies auto-immunes, caractérisées par une atteinte musculaire ainsi que des atteintes d'organes à type de PID ou cardiaque notamment (364). On distingue ainsi selon l'anticorps mis en évidence ainsi que les données histologiques, quatre entités distinctes : les dermatomyosites, les anti-synthétases, les myopathies nécrosantes et les myosites à inclusion (364). Ces pathologies présentent plusieurs similitudes avec la ScS, et particulièrement le syndrome des anti-synthétases.

Les patients ayant une myopathie inflammatoire active ont un nombre accru de neutrophiles LDG, particulièrement les patients ayant des Ac anti-MDA5 (365–367). Une production accrue de NETs a été mise en évidence dans la circulation mais également au niveau musculaire, en partie en lien avec cet excès de LDG à l'instar du LES et des vascularites à ANCA (365,366,368). Par ailleurs, l'augmentation de LDG et de NETs est corrélée à la survenue de PID, d'ulcérations cutanées et de calcinoses, et inversement corrélée à la densité capillaire à la capillaroscopie (366,368,369). Cet excédent de NETs mesuré est en lien avec un excès de production mais également un défaut de dégradation par diminution de DNase 1, particulièrement chez les patients ayant des Ac anti-Jo1 (370). De façon intéressante, cet excès de NETs semble être Nox-dépendant mais sans faire intervenir PAD4 (367). Sur le plan des conséquence, les NETs pourraient participer directement à l'atteinte musculaire en diminuant la viabilité des myotubes via les histones citrullinées (366) et au développement de PID en promouvant la prolifération des fibroblastes pulmonaires et leur différenciation en myofibroblastes via la voie TLR9-miR-7-Smad2 (371).

3.2.4. Phénomène de NETose dans la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la connectivite la plus fréquente avec une prévalence estimée entre 0,5 et 1% de la population adulte (372). Cette pathologie auto-immune se caractérise par une expression essentiellement articulaire avec des arthrites potentiellement délabrantes (372). Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et également immunologique (372). Dans la PR, plusieurs auto-Ac ont été mis en évidence dont les principaux sont le facteur rhumatoïde et des anticorps anti peptides cycliques citrullinés (anti-CCP), qui ont la capacité de former des complexes immuns à l'intérieur même des articulations favorisant ainsi l'agrégation de cellules immunitaires (373).

On observe au cours de la PR plusieurs anomalies aboutissant à une augmentation de production de NETs avec notamment une augmentation de la production de FRO, une expression accrue de NE et MPO ainsi qu'une translocation nucléaire de PAD4 aboutissant à une citrullination d'histones H3 (374). Ainsi, il existe chez les patients atteints de PR une NETose circulante excessive ainsi qu'une infiltration de neutrophiles en cours de NETose et des NETs au niveau articulaire (375–377). De façon intéressante, le phénomène de NETose est corrélé au niveau d'anti-CCP et de facteur rhumatoïde (375,377). De plus, ces Ac ont la capacité d'induire des NETs au contenu protéique bien spécifique avec notamment l'externalisation d'auto-antigènes citrullinés (375,378). Ce processus est impliqué dans la rupture de tolérance

et participe à la formation d'Ac anti-CCP (379–381). Le liquide synovial de patients a la capacité d'induire des NETs, qui eux-mêmes participent au recrutement de cellules inflammatoires, ainsi qu'à la dégradation synoviale notamment via la NE (380–383). De plus, l'internalisation des NETs par les macrophages induit la sécrétion de cytokines inflammatoires par ces derniers via NF-κB, formant ainsi une boucle d'auto-amplification inflammatoire au niveau local (384).

Récemment, plusieurs études ont évalué le monitoring de la NETose dans la réponse thérapeutique avec néanmoins des résultats controversés (385,386). Forts de ces résultats impliquant la NETose comme un processus clé dans la PR, plusieurs traitements visant la NETose dans la PR sont en cours de développement dont un est en cours d'évaluation chez l'homme (387–389).

OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

Plusieurs arguments indirects suggèrent une possible dérégulation de la NETose dans la ScS, et son implication dans la physiopathogénie.

En effet, la ScS est une pathologie où le stress oxydatif joue un rôle central en impactant directement les trois axes majeurs de cette maladie, avec par ailleurs une susceptibilité des patients à développer un environnement oxydatif (par modification épigénétique ou susceptibilité génétique). Ce dernier participe à une prolifération excessive et à une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, participant ainsi à l'excès de fibrose au niveau de la peau mais également d'organes internes. Il est impliqué dans la dysfonction endothéliale précoce qui a comme conséquence une néoangiogenèse imparfaite, et une vasculopathie présente chez la quasi-totalité des patients comme en témoigne le phénomène de Raynaud très précoce. Et enfin, le stress oxydatif pourrait être directement impliqué dans la dérégulation du système immunitaire innée et adaptatif dans la ScS.

En effet, les neutrophiles sont fortement pourvoyeurs de stress oxydatif, et sont eux-mêmes activés par le stress oxydatif, formant ainsi une boucle d'auto-amplification du phénomène. Par ailleurs, plusieurs anomalies intrinsèques aux neutrophiles des patients ScS ont été mises en évidence. Ces derniers ont un état d'activation basale supérieur à ceux de sujets sains, comme en témoigne les concentration élevées des protéines S100 mises en évidence chez ces patients. Tous ces éléments nous amènent à penser que le phénomène de NETose, qui n'est autre qu'une forme d'activation des neutrophiles fortement dépendante du stress oxydatif, pourrait être impliqué dans différentes anomalies caractéristiques de cette pathologie.

Dans différentes pathologies auto-immunes comme le LES et les vascularites à ANCA, des anomalies dans la régulation du phénomène de NETose ont été récemment démontrées. Les NETs semblent même directement impliqués dans certaines lésions tissulaires dans ces pathologies, notamment dans les glomérulopathies au cours du lupus et des vascularites à ANCA. De plus, par l'exposition de cibles nucléaires dans le milieu extra-cellulaire, le phénomène de NETose participe également directement à la rupture de tolérance observés dans les pathologies auto-immunes ou accompagnées d'autoimmunité.

Ainsi, nous émettons l'hypothèse que le phénomène de NETose pourrait être dérégulé chez certains patients atteints de ScS et participer à la physiopathogénie de certaines complications. Dans ce travail, nous avions comme objectif de mettre en évidence le phénomène de NETose dans la sclérodermie systémique. Si ce dernier est quantitativement

important, nous avions ensuite comme objectif d'identifier les facteurs pouvant influencer ce phénomène et sa dérégulation.

MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE DE NETOSE AU COURS DE LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE ET QUANTIFICATION

1. MISE AU POINT METHODOLOGIQUE

La première partie du travail de thèse a été la mise en place d'un protocole de génération de NETs au sein du laboratoire, basée sur la technique décrite par Brinkmann *et al*. et une quantification des NETs générés dans la mesure où il n'existait pas à l'époque de méthode standardisée de quantification des NETs (390–392). Plusieurs méthodes sont utilisées pour recueillir les neutrophiles et analyser leurs différentes activations potentielles. La plus courante est l'utilisation de gradient de densité comme illustré dans la Figure 10, qui a pour avantage d'être peu coûteuse et facilement réalisable, mais qui a comme principaux désavantages d'activer à minima les neutrophiles et de recueillir également potentiellement d'autres cellules que les neutrophiles. De plus, il n'est pas possible de recueillir via cette méthode les LDG, fortement pourvoyeurs de NETose, car présent avec les PBMC de par leur faible densité. Une autre technique consiste à l'utilisation de billes immuno-magnétiques permettant une sélection positive ou négative des cellules d'intérêt, avec pour principal avantage de sélectionner avec une spécificité proche de 100% uniquement des neutrophiles et de ne pas les activer (393). Nous avons opté pour l'utilisation de gradient de densité, cette technique étant celle recommandée par Brinkmann et al. pour l'étude du phénomène de NETose (390).

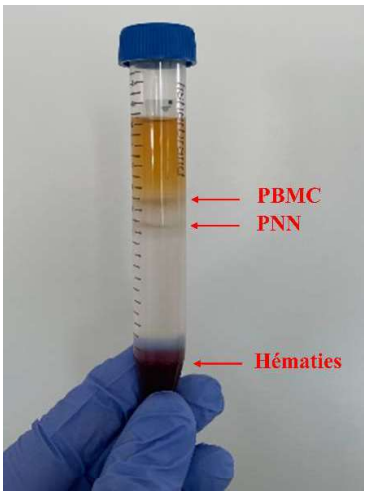


Figure 10. Recueil des poly-nucléaires neutrophiles après centrifugation en contact avec gradient de densité. Le sang des patients et des témoins étaient déposés sur un gradient de densité 1.113 ± 0.001. Après centrifugation étaient obtenus deux anneaux : le premier contenant les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et le deuxième les neutrophiles..

Devant l'absence de méthode standardisée pour quantifier les NETs, nous avons élaboré en collaboration avec notre plateforme d'imagerie (PICT) une macro utilisée dans le logiciel Image J. Nous en détaillons ici brièvement le principe :

- Dans un premier temps, la saisie de 16 images consécutives (4 horizontales et 4 verticales) au grossissement 20x avec un marquage Sytox orange (intercalant de l'ADN imperméable) et Hoechst 33342/DAPI (marquage de l'ADN perméable), permet la création d'une seule image grand champ.
- Cette image est, dans un premier temps, floutée de façon à accentuer les bords des NETs et à augmenter le contraste, puis inversée de façon à obtenir une image en noir et blanc au niveau de l'espace libre entre les bords des NETs (mode « skeleton »).
- Les NETs sont ensuite quantifiés en soustrayant le signal émis par le Hoechst 33342/DAPI du signal émis par le Sytox Orange pour ne pas prendre en compte les noyaux dans la quantification.
- A la fin, une dernière vérification visuelle est réalisée en superposant l'image initiale à celle avec le contour des NETs.
- Ce processus permet ainsi une mesure du nombre total de noyaux de neutrophiles, du nombre total de NETs et de l'aire totale de NETs sur la zone analysée avec également la possibilité d'obtenir l'aire de chaque NETs (**Figure 11)**.

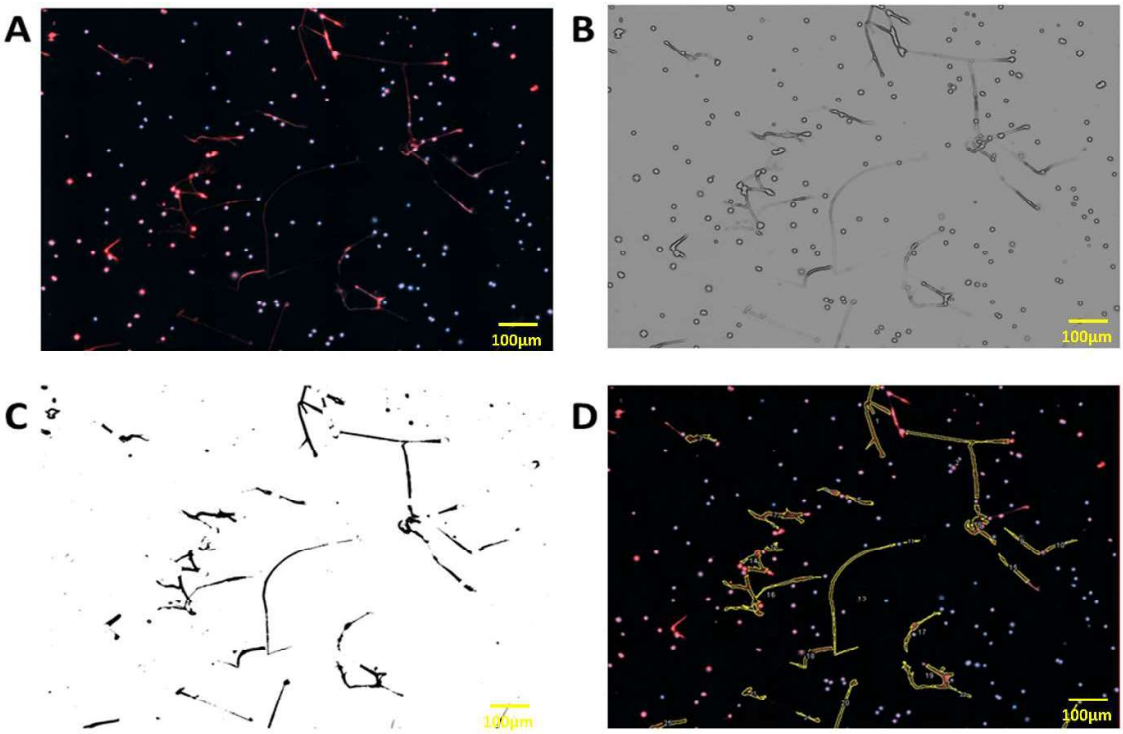


Figure 11. Description de la méthode de quantification des NETs. (**A**) *Image initiale regroupant 16 images consécutives au grossissement 20x avec marquage Sytox Orange et Hoechst 33342/DAPI.* (**B**) *Image floutée de façon à augmenter le contraste au niveau des bords des NETs.* (**C**) *Inversion de l'image avec une suppression du signal émis par le Hoechst 33342/DAPI pour exclure les noyaux de la quantification.* (**D**) *Ajout des NETs mis en évidence à l'image initiale pour une vérification visuelle.*

Cette méthode a pour principal avantage d'être reproductible et non biaisée par le regard humain, et permet d'obtenir des résultats à la fois sur le nombre, mais également sur l'aire des NETs. Elle a pour principale contrainte d'être chronophage et nécessite de visualiser les images dans les 48h, car le signal émis par les NETs diminue ce qui altère la quantification de ces derniers.

La principale difficulté rencontrée dans cette approche fonctionnelle est liée au fait que l'étude du phénomène de NETose par la méthode proposée par Brinkmann *et al.*, permettant de visualiser spécifiquement les NETs, nécessite des échantillons frais. En effet, la congélation altère les capacités d'activation des neutrophiles. Ainsi, nous avons décidé de ne travailler qu'avec des échantillons de sang frais, avec un recueil simultané pour les patients et les témoins de neutrophiles et de sérum afin de travailler en condition de stimulation autologue. L'isolation des neutrophiles avec l'utilisation d'un gradient de densité (**Figure 10**) a limité le recueil de

cellules dans certains cas, puisque chez certains patients (jamais chez les témoins), l'anneau contenant les neutrophiles est fusionné avec les hématies.

2. La generation de NETs est associee aux Stades Precoces et aux Complications Vasculaires dans la Sclerodermie Systemique

Neutrophil Extracellular Traps Generation Relates with Early Stage and Vascular Complications in Systemic Sclerosis.

Kevin Didier, Delphine Giusti, Sebastien Le Jan, Christine Terryn, Celine Muller, Bach Nga Pham, Richard Le Naour, Frank D. Antonicelli and Amelie Servettaz.

J Clin Med. 2020;9(7):2136.

Ce travail, pionnier dans l'étude de la NETose dans la ScS, avait pour objectif principal de comparer la quantité de NETs générés *in vitro* à partir de neutrophiles de sujets atteints de ScS avec différents phénotypes par rapport à des neutrophiles de sujets contrôles. Contrairement à d'autres études, nous souhaitions spécifiquement quantifier les NETs, raison pour laquelle nous avons choisi l'approche fonctionnelle de référence décrite précédemment. De plus, nous souhaitions nous approcher le plus possible des conditions réelles in vivo, et avons choisi comme stimulation le sérum autologue des patients, et non des agonistes chimiques de NETose.

Le résumé de ce travail est proposé ci-dessous.

2.1. Description de la population étudiée

Dans ce travail, nous avons inclus 34 patients ScS (8 dcSCS et 26 lcScS) suivis au CHU de Reims dans les services de Médecine interne ou de Dermatologie, et répondant aux critères ACR/EULAR avec une durée moyenne de suivi de 8,6ans (± 6), et 26 sujets présumés sains (contrôles) via l'Etablissement Français du Sang (EFS). Neuf patients avaient une PID (trois dcScS), huit avaient des UD actives (trois dcScS), trois avaient une HTAP (trois lcScS), et deux avaient eu une CRS dans le passé (deux dcScS).

Concernant les données immunologiques, huit patients avaient des anticorps anti-topoisomérase I (trois dcScS), 17 patients avaient des anti-centromère (17 lcScS), deux patients avaient des anti-ARN-polymérase III (deux dcScS), une patiente avait des anti-U1RNP (une lcScS), deux patientes avaient des anti-U3RNP (deux dcScS), un patient avait des anti-NOR90 (un dcScS), et trois patients avaient des anticorps antinucléaires sans spécificité antigénique mise en évidence.

2.2. Les neutrophiles de ScS sont prédisposés à générer plus de NETs que ceux des témoins

Nous avons montré dans un premier temps que les neutrophiles de patients atteints de ScS stimulés par du sérum autologue généraient plus de NETs, que ceux des témoins. Les neutrophiles de SSc produisaient un nombre plus important de NETs et des NETs avec une plus grande surface que les neutrophiles de sujets contrôles également stimulés par du sérum autologue.

Nous avons également mis en évidence que les neutrophiles de ScS étaient prédisposés à générer de façon plus importante des NETs. En effet, les neutrophiles de sujets ScS généraient plus de NETs que ceux des témoins, lorsqu'ils étaient stimulés avec du sérum de sujet réputé sain. Les neutrophiles de sujets présumés sains généraient plus de NETs lorsqu'ils étaient stimulés par du sérum de ScS, comparativement à une stimulation par du sérum de sujet sain. Ainsi, ces résultats suggèrent que la quantité de NETs générée dans la ScS est déterminée à la fois par (ou des) anomalies intrinsèques au neutrophiles, ainsi que par des composants sériques.

2.3. Les neutrophiles de ScS vasculaires ou d'évolution récente génèrent plus de NETs

Devant l'importante hétérogénéité observée quant à la génération de NETs dans la population ScS, nous avons ensuite analysé les facteurs phénotypiques qui pourraient être associés à une plus grande production de NETs (phénotype cutané [dcScS et lcScS], type d'auto-anticorps détecté, durée d'évolution de la maladie [calculée à partir du premier symptôme hors phénomène de Raynaud], et type de complication). Concernant les complications liées à la ScS, les patients étaient définis comme ayant une ou plusieurs complications vasculaires (HTAP et/ou UD et/ou CRS), ou une ou plusieurs complications fibrosantes (PID et/ou phénotype dcScS), ou les deux (groupe mixte associant au moins une

complication vasculaire et une complication fibrosante), ou bien aucune des complications précédentes.

Nous n'avons pas observé de différence dans la quantité de NETs produits (en nombre ou en aire) selon le phénotype cutané ni selon le type d'auto-anticorps mis en évidence dans le sérum des patients.

En revanche, les neutrophiles de patients atteints de complications vasculaires généraient significativement plus de NETs que les témoins, mais également plus que ceux des autres patients ScS. De façon intéressante, il existait également une corrélation négative importante entre la quantité de NETs produits et la durée d'évolution de la maladie pour les patients avec des complications fibrosantes. Ainsi plus l'analyse des neutrophiles était réalisée précocement dans l'évolution de la ScS et plus il y avait de NETs mis en évidence. Cependant, cette corrélation n'était pas mise en évidence chez les patients atteints de complications vasculaires. Chez ces patients, le niveau de NETs produit par les neutrophiles était constamment élevé, y compris chez les patients évoluant depuis plus de 10 ans. Ces différences pourraient être expliquées par l'évolution des complications (aggravation initiale puis améliorations des complications fibrosantes, persistantes des complications vasculaires).

2.4. Conclusion

Dans ce premier travail, avec une approche fonctionnelle quantitative mise au point au laboratoire nous avons mis en évidence que les neutrophiles de ScS génèrent plus de NETs que ceux de sujets réputés sains, et particulièrement ceux atteints de complications vasculaires. Il s'agit du premier travail publié sur la NETose dans la sclérodermie. Nous montrons que ce phénomène est temps-dépendant, plus important au début de la maladie chez les patients avec une forme diffuse de la maladie et ceux avec une PID. Les neutrophiles des patients avec complications vasculaires permanentes, produisent de grandes quantités de NETs quelle que soit la durée d'évolution de la maladie. Une représentation schématique de l'évolution du phénomène de NETose dans la ScS au cours du temps est proposée **Figure 12**.

Sur le plan mécanistique, nous avons mis en évidence qu'à la fois les neutrophiles et le sérum des sujets ScS sont déterminants dans l'excès de NETose constaté dans la ScS sans aller plus loin dans ce premier travail.

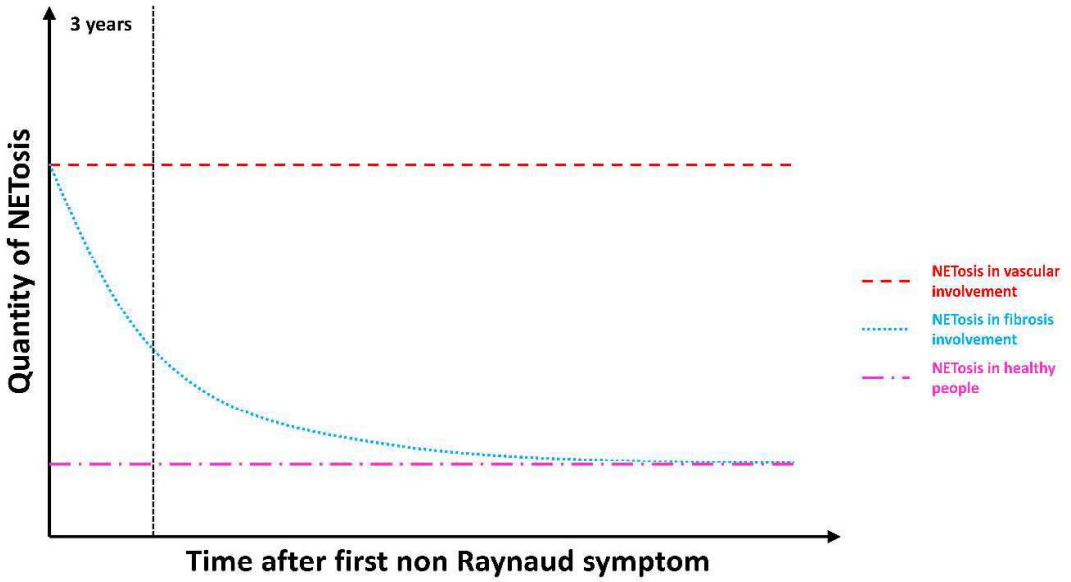


Figure 12. Représentation schématique de la quantité de NETs générée par les neutrophiles de ScS selon la durée d'évolution de la maladie et du type de complication. La ligne rouge correspond aux patients ScS avec complications vasculaires (HTAP, UD ou CRS). La ligne bleue correspond aux patients aux complications fibrosantes (PID ou dcScS), ou ceux sans complication. La ligne rose correspond aux sujets sains.

Journal of
Clinical Medicine

MDPI

Article

Neutrophil Extracellular Traps Generation Relates with Early Stage and Vascular Complications in Systemic Sclerosis

Kevin Didier [1,2,*], Delphine Giusti [1,3], Sebastien Le Jan [1], Christine Terryn [4], Celine Muller [1], Bach Nga Pham [1,3], Richard Le Naour [1], Frank D. Antonicelli [1] and Amelie Servettaz [1,2]

1 EA7509 IRMAIC, University of Reims-Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France; dgiusti@chu-reims.fr (D.G.); sebastien.le-jan@univ-reims.fr (S.L.J.); celine.muller@chu-reims.fr (C.M.); bnpham@chu-reims.fr (B.N.P.); richard.le-naour@univ-reims.fr (R.L.N.); frank.antonicelli@univ-reims.fr (F.D.A.); aservettaz@chu-reims.fr (A.S.)
2 Department of Internal Medicine, Infectious Diseases, and Clinical Immunology, Reims Teaching Hospitals, Robert Debré Hospital, 51100 Reims, France
3 Laboratory of Immunology, Reims University Hospital, University of Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France
4 PICT Platform, University of Reims Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France; christine.terryn@univ-reims.fr
* Correspondence: kdidier@chu-reims.fr; Tel.: +33-3267-873-02

Received: 6 June 2020; Accepted: 5 July 2020; Published: 7 July 2020



Abstract: Systemic sclerosis (SSc) is a systemic disease characterized by a great clinical and immunological heterogeneity whose pathophysiology is still being unraveled. Recently, innate immunity has been proposed to participate to the pathogenesis of SSc. In this study, we investigated the release of neutrophil extracellular traps (NETs) according to patient phenotype. Polymorphonuclear neutrophils (PMN) from 34 SSc patients and 26 healthy controls were stimulated by serum from SSc or healthy subject. NETs were visualized using epifluorescence microscope after DNA, myeloperoxidase, and Histone H3 tagging. Area of NETs were quantified using an original macro running in ImageJ® software. PMN from SSc patients were significantly more prone to releasing NETs than control PMN after autologous stimulation. PMN from patients with severe vascular complications (pulmonary arterial hypertension, digital ulcers) produced more NETs than PMN from other SSc patients and their aberrant NET production appeared to be sustained over time. In patients with pulmonary interstitial disease or extensive cutaneous fibrosis, NET production was high at an early stage of the disease before progressively decreasing. Both serum factors and PMN activation status were involved in the enhanced production of NETs in SSc. Consequently, neutrophils and especially NETosis represent new physiopathological and therapeutic fields in SSc.

Keywords: systemic sclerosis; scleroderma; PMN; NETosis; neutrophil extracellular traps; NET

1. Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a rare connective tissue disease characterized by skin and organ fibrosis, vasculopathy, and autoimmunity. There are two clinical subsets of SSc according to the extent of skin fibrosis: limited SSc (lSSc) or diffuse SSc (dSSc) [1]. Besides skin disorders, 20 to 40% of SSc patients develop interstitial lung disease (ILD) that may lead to respiratory insufficiency and death [2,3]. Ischemic digital ulcers, pulmonary arterial hypertension (PAH), and renal microangiopathy (called scleroderma renal crisis) are vascular ravages also observed in some SSc patients. Ischemic digital ulcers represent a chronic and disabling condition, with frequent relapses, whereas scleroderma

renal crisis and PAH are life-threatening complications. PAH represents the second cause of death in this setting [2,4]. Survival is heterogeneous in SSc, depending on internal organ involvement [5]. Actually, there is no curative treatment and few drugs have demonstrated efficiency in organ involvement [6,7]. A better comprehension of physiopathology of SSc could improve the medical care of each patient.

The exact pathogenesis of SSc remains unclear, but several defects in the control of TGF-β pathways have been evidenced that may lead to excessive collagen synthesis by fibroblasts and myofibroblasts [8]. Endothelial cells are also altered, leading to early angiogenesis and vasculogenesis abnormalities [8]. Nearly 95% of SSc patients display autoimmunity [3]. Numerous specific autoantibodies (AAb) have been identified in patient sera, among them anti-topoisomerase I AAb (or anti-Scl70 AAb), anti-centromere AAb, and anti-RNA polymerase III AAb [9]. Each autoantibody is mutually exclusive and associated with a specific phenotype [9]. The implication of adaptative immunity is now clearly established, but innate immunity has not been well studied up to now [8,10].

The occurrence of oxidative stress is linked to the pathogenesis of SSc, and polymorphonuclear neutrophils (PMN) are known to generate important quantities of reactive oxygen species (ROS) in the course of this disease [11]. During PMN activation, depending on oxidative stress, cells release DNA filaments covered by histones, enzymes, and other antimicrobial proteins. These filaments, called neutrophil extracellular traps (NETs) are involved in defense against bacteria and their formation leads in most of cases to the death of PMN [12]. This release of NETs, also called NETosis, has also been highlighted in autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), bullous pemphigoid, and antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis [13–16]. In these diseases, NETosis seems to be an integral part of pathogenesis, either by promoting tolerance breakdown by facilitating autoantigens exposure, or by directly participating in organ damage with, notably, endothelial dysfunction [17,18]. Recently, it was highlighted that platelet-derived microparticles interacted with PMN, promoting autophagy and the generation of NET byproducts in SSc patients [19].

In this study, we wondered whether NETosis occurring during SSc could be differently modulated according to the phenotype of SSc, reflecting the heterogeneous clinical expression of this disease.

2. Patients and Methods

2.1. Study Population

Thirty-four patients with SSc were recruited in the Internal Medicine Department at the University Hospital of Reims, France, between January 2018 and February 2020. The study was approved by the ethics committee for the protection of human beings involved in biomedical research (2016/49-ID RCB: 2016-A01517-44). Informed consent to participate was obtained from each patient and control subject included in the study for blood collection and the use of their de-identified medical record data. Patients fulfilled the following criteria for inclusion: age > 18 years, and a diagnosis of SSc according to American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) criteria [1]. Disease subtype was classified based on LeRoy and Medsger criteria: diffuse cutaneous SSc (dSSc) and limited cutaneous SSc (lSSc). Age- and sex-matched controls (n = 26) were recruited from the French blood Institute.

2.2. Data Collection

All variables were entered into a standardized questionnaire fulfilled by the clinician at the time of inclusion. In all patients, the complete medical history was retrospectively reviewed. Physical examination variables, laboratory, and imaging exams were collected for all patients. Disease duration was defined at the time between the first non-Raynaud's phenomenon symptom and inclusion. Rodnan skin scores were systematically evaluated by the same physician at inclusion. Interstitial lung disease (ILD) was defined as ground-glass opacities and/or interstitial reticular pattern with or without traction bronchiectasis and/or honeycomb cysts on high resolution computed tomography. PAH was

diagnosed based on right-heart catheterization if mean pulmonary arterial pressure was ≥25 mmHg and pulmonary capillary wedge pressure was ≤15 mmHg in a patient with either no ILD or ILD with forced vital capacity predicted ≥70% and extent of ILD on HRCT ≤20%. Scleroderma renal crisis was defined as the abrupt onset of severe hypertension and/or decline in renal function, with proteinuria without an alternate etiology.

2.3. Antinuclear Antibody Detection

The presence of antinuclear antibodies (ANA) was evaluated by indirect immunofluorescence on HEp-2000 cells-coated slides (Eurobio Ingen, Les Ulis, France) with a positivity threshold set at a titer of 1:100. ANA specificities were then determined by performing both a multiplex fluorescent microsphere immunodetection (FIDIS Connective Profile MX117™, Theradiag®, Croissy-Beaubourg, France) and an immunodot assay (Euroline Systemic Sclerosis [Nucleoli] Profile [IgG]; Euroimmun, Luebeck, Germany), allowing separate detection of anti-DNA topoisomerase I, anti-centromere AAb, anti–RNA polymerase III, anti-fibrillarin, anti-NOR90, anti Th/To, anti-PM-Scl, anti-Ku, anti-PDGFR, and anti-Ro-52 antibodies.

2.4. Polymorphonuclear Neutrophils (PMN) Isolation and Stimulation

To isolate PMN, heparinized blood was layered on an association of dextran and diatrizoate gradient with a density of 1.113 ± 0.001 (Granulosep: Eurobio, Les Ulis, France) following the manufacturer's instructions. Cells were then distributed in a 24 well plate (2.10^5 cells/well) on coverslips coated with L-lysine (*Acros Organics, Belgium*). PMN were then stimulated with serum from SSc patients or from controls (final dilution of 10%) for 4 h at 37 °C and 5% CO_2 in a final volume of 500 µL. Each condition was performed in duplicate. At the end of incubation, cells were washed and fixed by paraformaldehyde 4% (VWR, Darmstadt, Germany) as described by Brinkmann [20].

2.5. Visualization and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Sytox Orange nucleic acid stain (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) was used to stain extracellular DNA filaments and Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) for intra and extracellular DNA labelling, with a dilution of 1/5000 for both in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) for 15 min. To better characterize NETs, we also performed a double immunostaining with a rabbit polyclonal Ab to Histone H3 (1:100 overnight. Abcam, Cambridge, UK) revealed by a secondary chicken anti-rabbit Ab Alexa Fluor 594 (1:200, one hour, Invitrogen, Carlsbad, USA) and a mouse monoclonal Ab to human myeloperoxydase coupled to a fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorochrome (1:100 for one hour, Abcam, Cambridge, UK).

NETs were visualized using an inverted epifluorescence microscope (AxioObserver Z1: Zeiss, Germany; camera Cool Snap HQ2: Roper Scientific, Les Ulis, France) with the software Metamorph (Molecular devices, version 7.7.10, San Jose, CA, USA) at a magnification of 20× with an excitation/emission of 547/570 nm for Sytox Orange and 350/461 nm for Hoechst 33342. On each slide, 16 successive images (on the slide center) of 398 µm by 297 µm were taken for a total area about 2 mm^2 by coverslips.

The quantification of NETs was done using a home-made macro running in ImageJ software (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, USA) that counted the number of nucleus stained by Hoechst 33342 and NETs were analyzed using the signal of Sytox Orange. The image was blurred to accentuate edges and to enhance contrast. Then, the image was inverted to obtain an image in black and white. NETs (number and area) were quantified by subtracting the Hoechst 33342 signal of the Sytox Orange signal to remove nucleus in the quantification. This method allowed counting of the total number of PMN nuclei, and DNA filaments and the total area of NETs in the selected zone. Results were analyzed according to the mean number of NETs by 100 PMN and to mean area of NETs by PMN. The method of quantification is described in Figure A1. We decided to investigate the NETosis phenomenon using the area of NETs as proposed by Rebernick et al. [21].

2.6. Statistical Analysis

GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was used for statistical analyses. The variables were not normally distributed, as assessed by the d'Agostino and Pearson omnibus normality test and Shapiro–Wilk normality test, and comparisons between two groups were performed using the Mann–Whitney test. Correlation tests were performed by the Spearman test. To test if disease duration and clinical phenotype were independently associated with the level of NET release, a general linear model was used with the following parameters: disease duration (less than three years versus more than three years) and clinical phenotype (no complication, vascular complications, fibrotic complications, mixed complications). p values lower than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Subject Characteristics

The biological and clinical characteristics of the study population are presented in Table 1. As expected, significant differences in Modified Rodnan Score, internal organ involvement, and AAb detection were observed between SSc patients and the controls. No significant difference was observed between the two groups regarding gender and age. Among the SSc patients (n = 34), 26 had lSSc, whereas eight presented with dSSc.

Table 1. Main features of systemic sclerosis (SSc) patients and controls.

Main Features	SSc Patients			Controls
	Whole SSc Population	Diffuse SSc	Limited SSc	
Number of individuals	34	8	26	26
Age (mean, years)	59.5 (±10.9)	55.3 (±11.7)	60.8 (±10.6)	60.5 (±11.2)
Women (%)	29 (85.3)	5 (62.5)	24 (92.3)	19 (73.1)
Disease's duration (years)	8.6 (±6)	5 (± 3.5)	9.8 (± 6.7)	-
Modified Rodnan score	11.8 (±8.7)	25.4 (± 6.2)	7.6 (± 6)	-
Internal organ involvement				-
Interstitial lung disease	9 (26.5)	3 (37.5)	6 (23.1)	-
Ischemic digital ulcers	8 (23.5)	3 (37.5)	5 (19.2)	-
Pulmonary arterial hypertension	3 (8.8)	0 (0)	3 (11.5)	-
Scleroderma renal crisis	2 (5.9)	2 (25)	0 (0)	-
Auto-antibody				-
Anti-topoisomerase I	8 (23.5)	3 (37.5)	5 (19.2)	-
Anti-centromere	17 (50)	0 (0)	17 (65.4)	-
Anti-RNA polymerase III	2 (5.9)	2 (25)	0 (0)	-
Anti-U1RNP	1 (2.9)	0 (0)	1 (3.9)	-
Anti-U3RNP	2 (5.9)	2 (25)	0 (0)	-
Anti-NOR90	1 (2.9)	1 (12.5)	0 (0)	-
Undetermined	3 (8.8)	0 (0)	3 (11.5)	-
Treatment at the time of blood collection				-
Immunosuppressive drug (including corticosteroids)	2 (5.9)	2 (25)	0 (0)	-
Vasodilator drug	8 (23.5)	1 (12.5)	7 (26.9)	-

Internal organ involvement was classified as either fibrotic complication (diffuse cutaneous phenotype, and/or ILD) or vascular complication (PAH, and/or scleroderma renal crisis, and/or ischemic digital ulcers), as described in Table 2. Five patients presented both vascular and fibrotic complications. No significant difference was observed concerning follow-up duration between these two SSc groups.

Table 2. Classification of SSc patients according to the type of complications.

Characteristics	SSc Patients without Complication	SSc Patients with Fibrotic Complications	SSc Patients with Vascular Complications	SSc Patients with both Fibrotic and Vascular Complications
Number of patients	12	9	8	5
Mean of disease duration, year (SD)	8 (±4)	13.6 (±15.6)	7.3 (±7.6)	3.8 (4.2)
Diffuse cutaneous involvement (%)	-	3 (33.3)	-	5 (100)
Interstitial lung disease (%)	-	8 (88.9)	-	1 (20)
Ischemic digital ulcer(s) (%)	-	-	5 (62.5)	3 (60)
Pulmonary arterial hypertension (%)	-	-	3 (37.5)	0 (0)
Scleroderma renal crisis (%)	-	-	0 (0)	2 (40)

3.2. PMN from Systemic Sclerosis (SSc) Patients Generate More NETs Than Those from Controls

Ex vivo NET formation was first investigated by stimulating fresh isolated PMN from patients and controls with sera in autologous conditions. Fluorescence microscopy analysis of stimulated PMN using the DNA-intercaling dyes Sytox Orange and Hoechst 33342 showed that the median area of NETs released by SSc PMN after autologous stimulation was significantly higher than the median area of NETs released by PMN from the controls (8.7 [5.4–14.7] μm^2/cell versus 1.8 [0–3.5] μm^2/cell respectively, $p < 0.0001$, Figure 1).

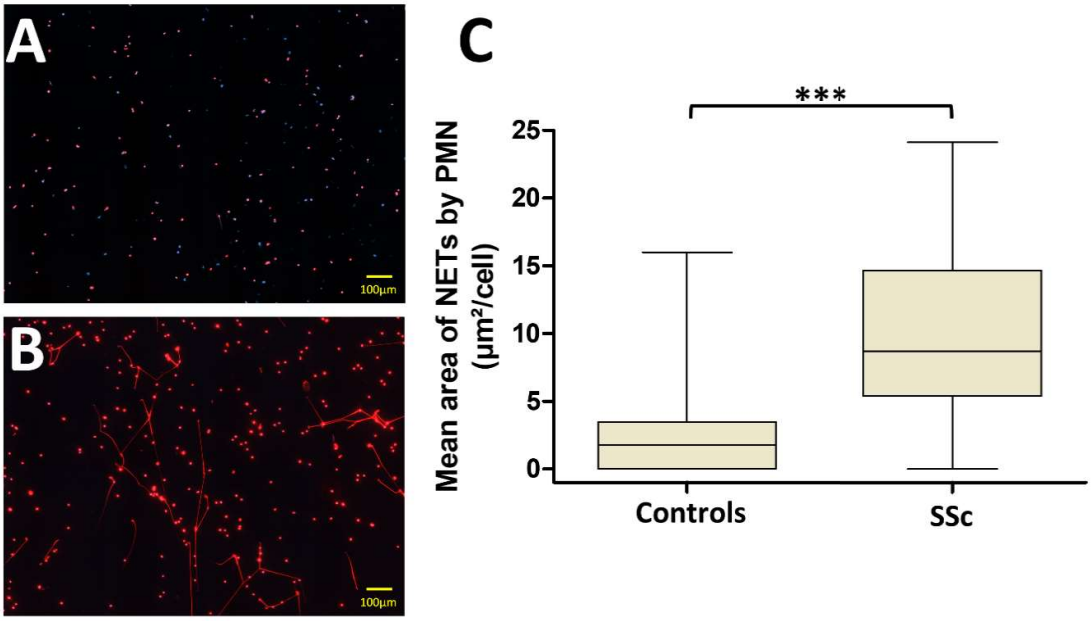


Figure 1. Polymorphonuclear neutrophils (PMN) from systemic sclerosis (SSc) patients generated more neutrophil extracellular traps (NETs) than those from the controls. PMN from SSc patients and controls were stimulated in autologous conditions. (**A**) The most representative pictures (Sytox Orange and Hoechst 33342, 16 consecutives pictures with X20 magnification) of PMN from one control. (**B**) The most representative pictures of PMN from one SSc patient. (**C**) The median areas of NETs were statistically higher in SSc patients than in the controls (n = 34 for the SSc group and n = 26 for the control group). All stimulations were performed in duplicate. The mean area of NETs released by PMN is represented by a "box and whiskers" plot for each condition tested. Boxes show the 25–75th percentiles, lines show the median value, and whiskers show the range of the mean area of NETs released by PMN. *** $p < 0.001$.

3.3. Involvement of Both PMN Activation Status and Serum Factors in the Level of NET Production Is Not Dependent on AAb Specificity in SSc

To further explore the respective contribution of PMN and serum in the excessive NET generation observed in the SSc population, we stimulated PMN from SSc and controls with sera from reciprocal population (Figure 2). PMN from SSc patients generated more NETs than those from the controls when stimulated either with sera from SSc patients (median area of NETs 8.7 [5.4–14.7] μm^2/cell versus 2.6 [1–5.4] μm^2/cell, respectively, $p < 0.0001$) or with sera from the controls (median area of NETs 3.5 [1.4–8.2] μm^2/cell versus 1.8 [0–3.5] μm^2/cell, respectively, $p = 0.0090$). Moreover, sera from SSc patients induced more NET formation than those from the controls after incubation with the controls' PMN (median area of NETs 2.6 [1–5.4] μm^2/cell versus 1.8 [0–3.5] μm^2/cell, respectively, $p = 0.0316$). Similarly, sera from SSc patients induced more NET formation by SSc PMN than the control sera ($p = 0.0004$).

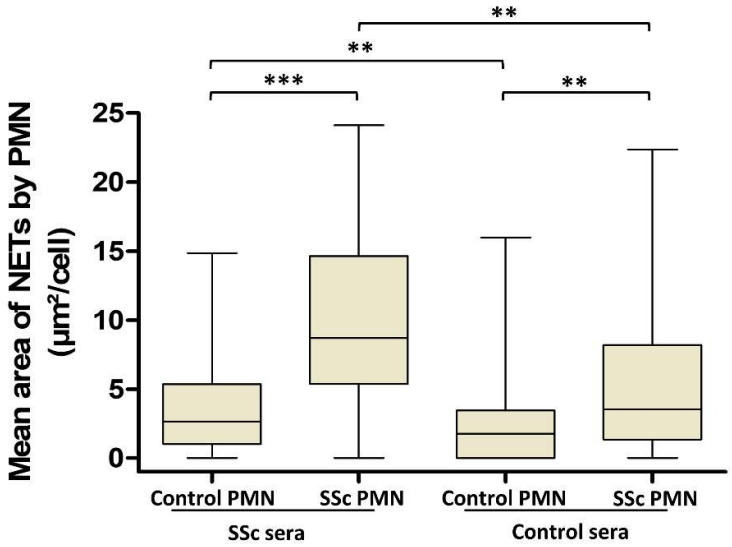


Figure 2. Polymorphonuclear neutrophils (PMN) and serum are both involved in SSc NETosis. To analyze the respective role of cells and sera in NETosis, PMN from SSc patients were stimulated with autologous sera (n = 34) or with sera from the controls (n = 52), and PMN from controls were stimulated with autologous sera (n = 26) or with sera from SSc patients (n = 151). All stimulations were performed in duplicate. The mean area of NETs released by PMN is represented by a "box and whiskers" plot for each condition tested. Boxes show the 25–75th percentiles, lines show the median value, and whiskers show the range of the mean area of NETs released by PMN. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

Given the observed effect of SSc sera on NET generation, we next investigated the potential differences in NET generation according to the specificity of AAb in SSc sera. We showed that the NET area was not significantly different regardless of the AAb detected in sera in autologous conditions of stimulation (Figure 3).

3.4. NETosis Is Higher in SSc Patients with Vascular Complications But Is Not Dependent on SSc Cutaneous Phenotype

We next quantified the NET production by SSc PMN according to the disease-related complications in autologous conditions of stimulation. Patients were classified as having either no complication, vascular, fibrotic, or mixed complications (defined by the presence of at least one vascular and one fibrotic complication, Figure 4A). In SSc patients without complication, PMN still generated more NETs than the PMN from the controls (median area of NETs of 7.9 [3.8–12.6] μm^2/cell versus 1.8 [0–3.5] μm^2/cell, respectively, $p = 0.0012$). With a median area of 15 [11.5–22.5] μm^2/cell, PMN from patients

with vascular complications released significantly more NETs than those from SSc patients without any complication (median area of 7.9 [3.8–12.6] μm^2/cell, $p = 0.0078$) or SSc patients displaying fibrotic complications (median area of 7.2 [2.4–11.2] μm^2/cell, $p = 0.0079$) or SSc patients with mixed complications (median area of 7 [5.6–12] μm^2/cell, $p = 0.0186$). In contrast, no significant difference was highlighted between patients without complications and patients with fibrotic or mixed complications.

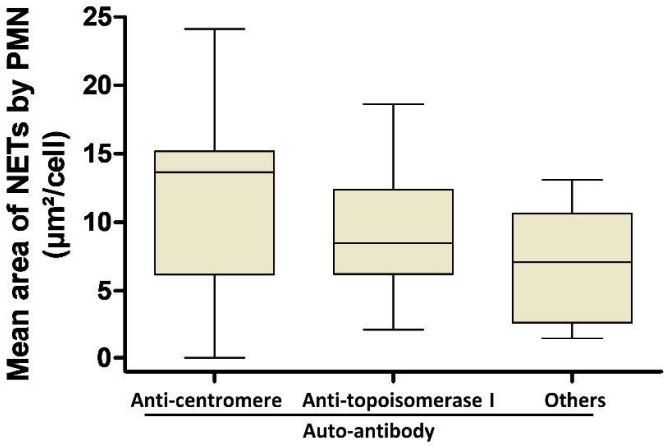


Figure 3. NETosis phenomenon occurring in SSc cannot be explained by the specificity of autoantibody. PMN from SSc patients were stimulated in autologous conditions. Patients were grouped according to the AAb specificity (anti-centromere AAb (n = 17), anti-topoisomerase I AAb (n = 8) or other AAb (n = 9)). All stimulations were performed in duplicate. The mean area of NETs released by PMN is represented by a "box and whiskers" plot for each condition tested. Boxes show the 25–75th percentiles, lines show the median value, and whiskers show the range of the mean area of NETs released by PMN.

We further investigated NETosis according to the cutaneous phenotypes dSSc and lSSc and did not observe any significant difference between these disease subtypes in autologous conditions of stimulation ($p = 0.2156$, Figure 4B). Furthermore, no correlation was highlighted between NET area and the modified Rodnan skin score, which reflects the spreading of skin fibrosis (Spearman r = 0.1799, $p = 0.3085$).

3.5. NETosis Is an Early Process Occurring in SSc That Lasts in SSc Patients with Vascular Complications

A rapid spread of cutaneous and lung fibrosis is classically observed during the first three years of the disease. Consequently, we analyzed NET production according to disease duration. A stimulation of SSc PMN with autologous sera allowed us to demonstrate that NETosis was inversely correlated with the duration of the disease, suggesting that NETosis may occur preferentially early in the disease course (Spearman r = −0.3521, $p = 0.0412$, Figure 5A).

Due to an important heterogeneity highlighted and the impact of the type of complications, we further investigated NET area according to disease duration and the type of complications in autologous conditions of stimulation. As shown in Figure 5B,C, NETosis was inversely correlated with the duration of the disease in patients without complication (Spearman r = −0.5711, $p = 0.0524$) or displaying fibrotic complications (Spearman r = −0.7563, $p = 0.0214$). In contrast, no correlation was highlighted in patients displaying vascular complications (Spearman r = 0.4097, $p = 0.3135$, Figure 5D). The regression model showed a significant interaction between disease duration and clinical phenotype for NET generation ($p = 0.036$ for interaction), confirming that time (disease duration) effect was different according to the phenotype of the disease on NETosis in SSc.

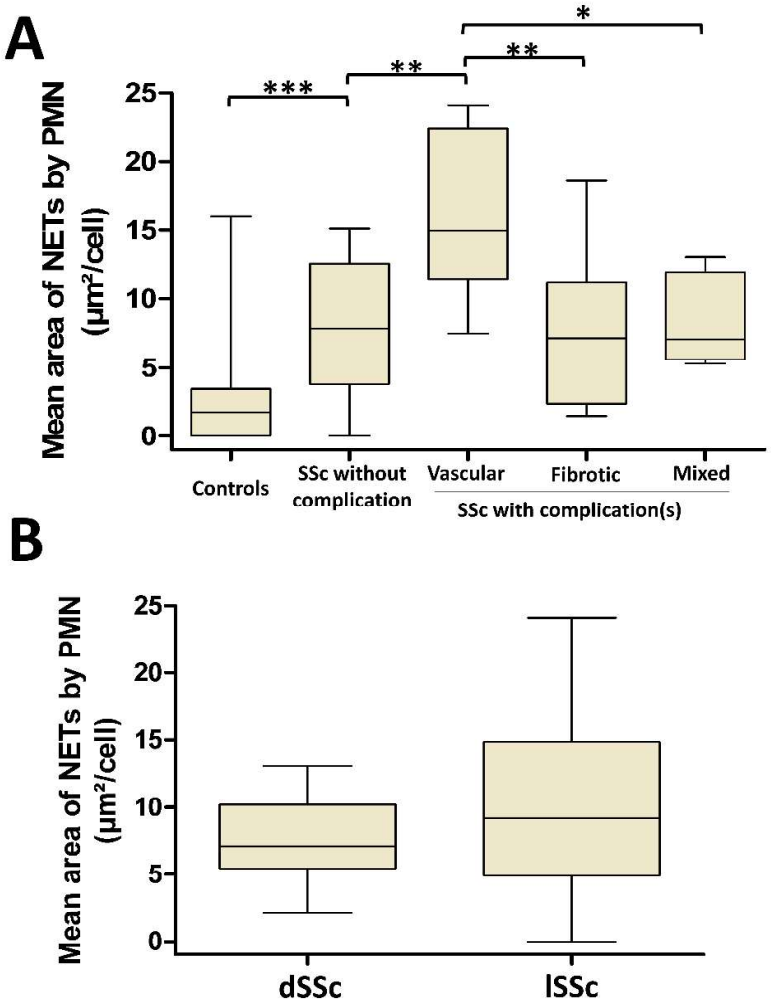


Figure 4. NETosis is increased in SSc patients with vascular complications and is not dependent on the extension of skin fibrosis. (**A**) PMN from SSc patients and controls were stimulated in autologous conditions. Patients were grouped according to their type of complications (vascular, fibrotic, or mixed complications) or the absence of complications. Pulmonary arterial hypertension, digital ulcers, and scleroderma renal crisis were considered as vascular complications, diffuse phenotype and interstitial lung disease were considered as fibrotic complications, and mixed complications were defined as the association of at least one vascular and one fibrotic complication. All conditions (n = 26 for controls, n = 12 for patients without complication, n = 8 for SSc with vascular complications, n = 9 for SSc with fibrotic complications, and n = 5 for SSc with mixed complications) were performed in duplicate. (**B**) Patients were grouped according to their skin phenotype (diffuse SSc (dSSc) or limited SSc (lSSc)) and PMN were stimulated in autologous conditions. All conditions (n = 8 for dSSc, and n = 26 for lSSc) were performed in duplicate. The mean area of NETs released by PMN is represented by a "box and whiskers" plot for each condition tested. Boxes show the 25–75th percentiles, lines show the median value, and whiskers show the range of the mean area of NETs released by PMN. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

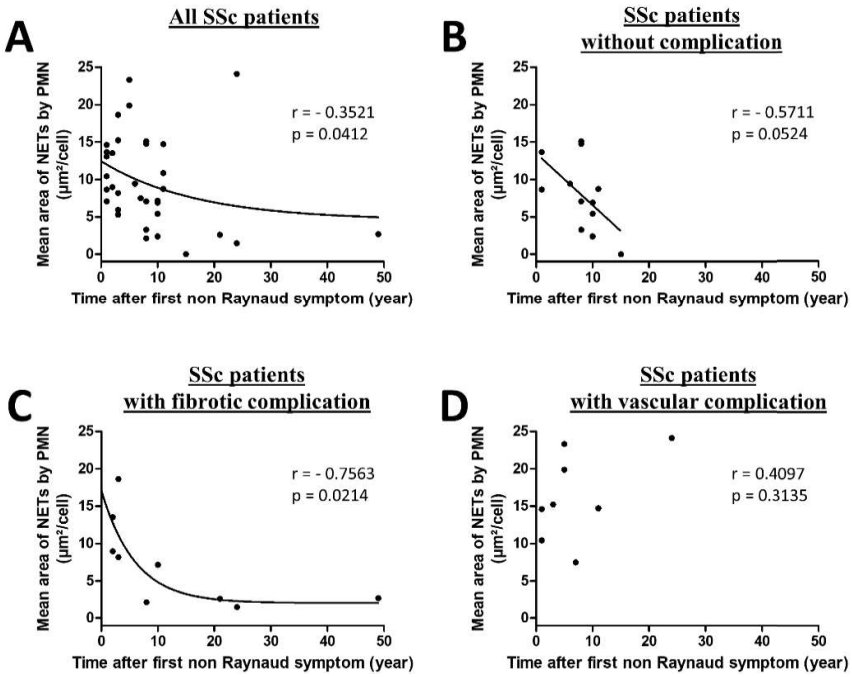


Figure 5. NETosis phenomenon is an early process occurring in SSc patients that persists in patients with vascular complications. (**A**) PMN from patients were stimulated with autologous sera to assess the correlation between mean area of NETs by PMN and time after the first non-Raynaud's phenomenon symptom. All stimulations (n = 34) were performed in duplicate. (**B–D**) Due to a link between the type of complication and quantity of NETosis, results were analyzed according to the type of complication. In each case, PMN from patients was stimulated with autologous sera to assess the correlation between mean area of NETs by PMN and time after the first non-Raynaud's phenomenon symptom (**B**) without complication (n = 12), (**C**) fibrotic complications (n = 9), and (**D**) vascular complications (n = 8). Each dot represents the mean area of NETs by PMN of two similar experiments. The regression curves concerning all patients (**A**) and patients with fibrotic complications (**C**) were obtained using a one phase exponential decay nonlinear regression with the following equations respectively: $Y = (12.45–4.519) \times \exp(-0.05926X) + 4.519$; $Y = (17.06–2.028) \times \exp(-0.1677X) + 2.028$. The regression curve concerning patients without complication (B) was obtained using a linear regression with the following equation: $Y = (13.50 \pm 2.824) + (-0.6936 \pm 0.3190)X$.

4. Discussion

SSc is an autoimmune systemic disease characterized by dysfunctions of endothelial cells, fibroblasts, and immune cells, leading to heterogeneous organ damage that jeopardizes patient survival. The importance of free radicals and ROS in the pathophysiology of SSc, led us to study NETosis in this disease [11]. We here report an excessive NET formation by PMN from SSc patients. Interestingly, aberrant NET generation appears to be closely linked with disease duration and the type of SSc-related complication. Indeed, in patients with recent fibrosis, the high NET formation observed at an early stage of the disease progressively decreased, whereas it remained elevated throughout the entire course of the illness in patients with severe and chronic vascular complications.

Excessive NETosis has already been reported in different noninfectious disorders including autoimmune diseases [22]. In SLE, enhanced spontaneous NETosis was shown, and impaired degradation of NETs was related to an increased risk of developing lupus nephritis [23,24]. Increased NET formation has also been observed in the peripheral blood and synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA) and in kidneys and small arterioles of patients with antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis [15,25,26]. Moreover, MPO–DNA complexes and citrullinated

H4-histones were previously found in the plasma of SSc patients, suggesting an inappropriate NETosis in this disease [19]. In this study, the authors observed that MPO-DNA complexes were significantly more concentrated in the plasma of patients with an early and active scleroderma pattern compared with those with a late scleroderma pattern in capillaroscopy. In addition, DNA filaments were recently observed in skin biopsies from SSc patients [27]. These possible NET structures were shown to be decorated with CXCL4 and these CXCL4-DNA complexes could participate in immune activation and notably to type-I interferon production in patients with early active SSc. Overall, these two previous works indirectly suggested a role of NETs in some subsets of SSc.

There are many clinical patterns of SSc according to the extent of skin fibrosis, the kind of internal organ involvement, and the type of AAb developed by patients. We here observed that PMN from all SSc patients including those without any organ damage were prone to generate more NETs than PMN from the controls. In addition, in patients with long-lasting vascular damage, the dysregulated NET generation was higher than in other SSc patients and was maintained over time. In contrast, PMN and sera from SSc patients with only fibrotic complications or without any complication appeared less prone to generating NETs.

NET contribution to endothelial dysfunction has been previously reported in other diseases involving vessels. Indeed, in SLE patients, enhanced capacity of PMN to form NETs favored extensive endothelial cell killing and circulating NET level was correlated with arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome [23,28,29]. A growing body of evidence also supports a crucial role of PMN and NETs in the development of plaque formation and atherosclerosis [30]. In relation to SSc physiopathology, we can hypothesize that repeated binding of NETs to activated endothelium may induce local production of ROS, inducing endothelial dysfunction, endothelium-dependent vasorelaxation impairment, and endothelial cell apoptosis, all well-documented events early occurring in the pathogenesis of SSc. Noteworthy, the persistent production of NETs highlighted in the group of patients with severe vascular complications could perpetuate vascular remodeling, leading to recurring digital ulcers and incurable PAH [2,4].

These original results may suggest a more prominent role of NETs in endothelial damages than in fibroblast dysfunction. Nevertheless, this conclusion may be hurried. In fact, we observed that PMN from most patients with an early disease (less than three years) were prone to releasing high amounts of NETs including those from patients with only fibrotic complications. Both cutaneous and lung fibrosis develop within the first years of the disease, before stabilizing. Cutaneous fibrosis may even decline after three years [31]. Figure 6 proposes a schematic representation of the relative importance of NET generation we could imagine, according to our data in SSc pathogenesis.

NETosis may be constantly upregulated in patients with severe long-lasting vascular complications whereas the amount of NET production may be particularly aberrant at an early stage of the disease before progressively decreasing along time in patients with a predominant fibrotic pattern. Patients with a mixed phenotype displayed intermediate NET production, but only five were studied, of whom two with renal crisis that had recovered with renin-angiotensin pathway blockade and no other long-lasting vascular complications. We assume that NET generation may play a role in different steps of SSc pathogenesis and that distinct mechanisms may induce and regulate NETosis according to the clinical pattern.

The cascade of events leading to uncontrolled NETosis in SSc remains to be clearly determined. In the present study, we demonstrated that both serum factors and PMN activation status were involved in the enhanced production of NETs in vitro. In serum, the presence of NETosis inducers including AAb, immune complexes, multiple danger-associated molecular patterns (DAMP), and cytokines have been described in various inflammatory diseases. The type of AAb did not seem to influence the level of NET formation in SSc, however we cannot rule out a role of AAbs in SSc-related NETosis since immune complexes were described as NETosis inducers in RA [25]. In addition, ribonucleoprotein-containing immune complexes, which are frequently detected in SSc sera, were shown to induce NETosis in SLE patients and consequently represent interesting serum candidates for SSc NETosis mediators [32].

Conversely, NETs represent a well described source of tolerance break in SLE, RA, and ANCA-associated vasculitis [28,33,34]. Further experiments including sera containing distinct types of AAbs from patients with distinct autoimmune diseases (for example, SSc, RA, and SLE) are needed to further assess the link between autoimmunity and NETosis in SSc. DAMP-expressing microparticles released from activated platelets seem to activate PMN and may also favor NETosis in SSc sera [19]. Regarding SSc PMN, we here found a primed status of these cells leading to an excess of NETosis, as previously highlighted for ROS generation [35]. Several abnormalities among PMN pathways could support aberrant priming that favors NETosis in SSc patients. Indeed, activated ERK, p38, and JNK were present at much higher levels in SSc PMN than in the controls cells, and interestingly, ERK is known to be involved in NET production [36,37]. In addition, IL-8, a crucial cytokine for PMN priming and NETosis, has been found to be increased in SSc sera [12,38]. Regarding treatment able to break uncontrolled NETosis, our study does not allow for any conclusion regarding immunosuppressive or vasodilator drugs, since few patients received such drugs. Identifying NETosis mediators remains the next essential step to further assess therapeutic molecules interfering with NET release and possible toxicity in SSc.

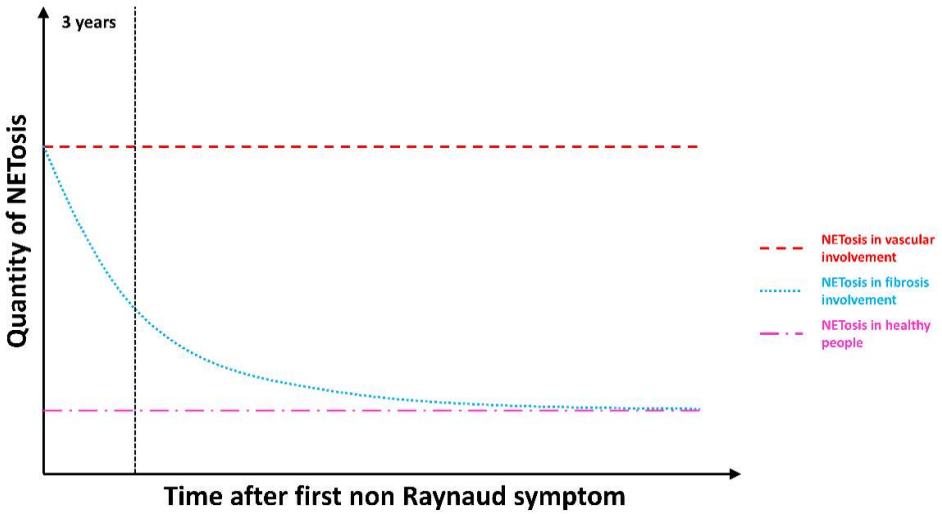


Figure 6. Schematic representation of the quantity of NETs generated by SSc PMN in vitro according to disease duration and the type of complication. The red line represents mean NETosis amount generated by PMN from patients with chronic vascular complications. The blue line represents mean NETosis production by PMN from patients with a predominant fibrotic pattern and no vascular severe complication. The pink line represents mean NETosis production by PMN from healthy subjects.

5. Conclusions

In conclusion, we demonstrate for the first time excessive and uncontrolled NETosis in SSc PMN, especially at an early stage of the disease during fibrosis progression and in patients with chronic severe vascular complications. Identifying specific NETs mediators according to clinical phenotype is needed to further clarify the role of NETs in the pathogenesis of SSc and its severe complications. If NETosis is confirmed to play a role in some steps of SSc pathogenesis, targeting neutrophils and especially NETosis may open a new therapeutic field in this disease.

Author Contributions: Conceptualization, K.D., R.L.N., F.D.A., B.N.P., and A.S.; Methodology, K.D., D.G., S.L.J., C.M., R.L.N., F.D.A., and A.S.; Software, C.T., K.D., and D.G.; Validation, K.D., R.L.N., F.D.A., and A.S.; Formal analysis, K.D., D.G., S.L.J., R.L.N., F.D.A., and A.S.; Investigation, K.D., D.G., S.L.J.,C.M., R.L.N., F.D.A., and A.S.; Resources, K.D. and A.S.; Data curation, K.D., F.D.A., R.L.N., and B.N.P.; Writing—original draft preparation, writing—review and editing, K.D., D.G., S.L.J., R.L.N., F.D.A., B.N.P., and A.S.; Supervision, F.D.A., R.L.N., and B.N.P.; Project administration, F.D.A. and R.L.N.; Funding acquisition, R.L.N. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors wish to acknowledge Maxime Hentzien for his support in statistical analysis.

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

Appendix A

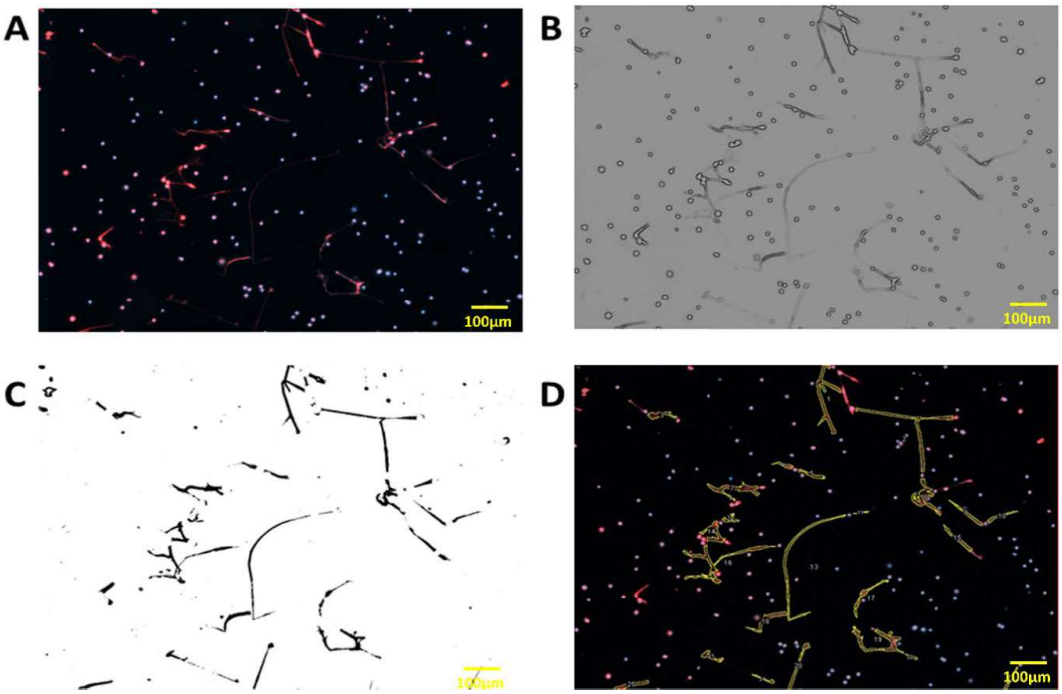


Figure A1. NETs quantification method. This method allowed for counting the total number of neutrophil nuclei, the number of DNA filaments, and the total area of NETs in the selected zone using software in ImageJ. Briefly, images obtained by fusion of Sytox Orange and Hoechst 33342 images (**A**) were blurred to enhance contrast at the edges of the NETs (**B**). Images were then inverted to suppress the Hoechst 33342 signal to exclude all nuclei (**C**). NETs highlighted were then added to the primary image for a last visual checking (**D**). Results are given in the mean number of NETs by 100 PMN and in the mean area of NETs by PMN.

References

1. van den Hoogen, F.; Khanna, D.; Fransen, J.; Johnson, S.R.; Baron, M.; Tyndall, A.; Matucci-Cerinic, M.; Naden, R.P.; Medsger, T.A., Jr.; Carreira, P.E.; et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthr. Rheum.* **2013**, *65*, 2737–2747. [CrossRef] [PubMed]
2. Elhai, M.; Meune, C.; Boubaya, M.; Avouac, J.; Hachulla, E.; Balbir-Gurman, A.; Riemekasten, G.; Airò, P.; Joven, B.; Vettori, S.; et al. Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *76*, 1897–1905. [CrossRef] [PubMed]
3. Walker, U.A.; Tyndall, A.; Czirják, L.; Denton, C.; Farge-Bancel, D.; Kowal-Bielecka, O.; Müller-Ladner, U.; Bocelli-Tyndall, C.; Matucci-Cerinic, M. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: A report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann. Rheum. Dis.* **2007**, *66*, 754–763. [CrossRef] [PubMed]
4. 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.* **2010**, *14*, 1241–1254. [CrossRef]
5. Kuwana, M.; Kaburaki, J.; Okano, Y.; Tojo, T.; Homma, M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthr. Rheum.* **1994**, *37*, 75–83. [CrossRef] [PubMed]

6. Pellar, R.E.; Pope, J.E. Evidence-based management of systemic sclerosis: Navigating recommendations and guidelines. *Semin. Arthr. Rheum.* **2017**, *46*, 767–774. [CrossRef]
7. Sullivan, K.M.; Goldmuntz, E.A.; Keyes-Elstein, L.; McSweeney, P.A.; Pinckney, A.; Welch, B.; Maureen, D.; Mayes, M.D.; Nash, R.A.; Crofford, L.J.; et al. Myeloablative autologous stem-cell transplantation for severe scleroderma. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 35–47. [CrossRef]
8. Didier, K.; Robbins, A.; Antonicelli, F.; Pham, B.N.; Giusti, D.; Servettaz, A. Updates in systemic sclerosis pathogenesis: Toward new therapeutic opportunities. *La Rev. De Med. Interne* **2019**, *40*, 654–663. [CrossRef]
9. Didier, K.; Bolko, L.; Giusti, D.; Toquet, S.; Robbins, A.; Antonicelli, F.; Servettaz, A. Autoantibodies associated with connective tissue diseases: What meaning for clinicians? *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 541. [CrossRef]
10. Varga, J.; Trojanowska, M.; Kuwana, M. Pathogenesis of systemic sclerosis: Recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2017**, *2*, 137–152. [CrossRef]
11. Vona, R.; Giovannetti, A.; Gambardella, L.; Malorni, W.; Pietraforte, D.; Straface, E. Oxidative stress in the pathogenesis of systemic scleroderma: An overview. *J. Cell Mol. Med.* **2018**, *22*, 3308–3314. [CrossRef] [PubMed]
12. Brinkmann, V.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* **2012**, *198*, 773–783. [CrossRef]
13. Leffler, J.; Gullstrand, B.; Jönsen, A.; Nilsson, J.-Å; Martin, M.; Blom, A.M.; Bengtsson, A.A. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr. Res. Ther.* **2013**, *15*, R84. [CrossRef] [PubMed]
14. Pérez-Sánchez, C.; Ruiz-Limón, P.; Aguirre, M.A.; Jiménez-Gómez, Y.; Arias-de la Rosa, I.; Ábalos-Aguilera, M.C.; Rodriguez-Arizaa, A.; Castro-Villegasab, M.C.; Ortega-Castroab, R.; Segui, P. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J Autoimmun.* **2017**, *82*, 31–40. [CrossRef] [PubMed]
15. Kessenbrock, K.; Krumbholz, M.; Schönermarck, U.; Back, W.; Gross, W.L.; Werb, Z.; Gröne, H.-J.; Brinkmann, V.; Jenne, D.E. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 623–625. [CrossRef]
16. Giusti, D.; Bini, E.; Terryn, C.; Didier, K.; Jan, S.L.; Gatouillat, G.; Durlach, A.; Nesmond, S.; Muller, C.; Bernard, P.; et al. NET formation in bullous pemphigoid patients with relapse is modulated by IL-17 and IL-23 interplay. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 701. [CrossRef]
17. van der Linden, M.; van den Hoogen, L.L.; Westerlaken, G.H.A.; Fritsch-Stork, R.D.E.; van Roon, J.A.G.; Radstake, T.R.D.J.; Meyaard, L. Neutrophil extracellular trap release is associated with antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and anti-phospholipid syndrome. *Rheumatology* **2018**, *57*, 1228–1234. [CrossRef]
18. Söderberg, D.; Kurz, T.; Motamedi, A.; Hellmark, T.; Eriksson, P.; Segelmark, M. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. *Rheumatology* **2015**, *54*, 2085–2094. [CrossRef]
19. Maugeri, N.; Capobianco, A.; Rovere-Querini, P.; Ramirez, G.A.; Tombetti, E.; Valle, P.D.; Monno, A.; D'Alberti, V.; Gasparri, A.M.; Franchini, S.; et al. Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, eaao3089. [CrossRef]
20. Brinkmann, V.; Laube, B.; Abu Abed, U.; Goosmann, C.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: How to generate and visualize them. *J. Vis. Exp.* **2010**, *36*, e1724. [CrossRef]
21. Rebernick, R.; Fahmy, L.; Glover, C.; Bawadekar, M.; Shim, D.; Holmes, C.L.; Rademacher, N.; Potluri, H.; Bartels, C.M.; Shelef, M.A. DNA Area and NETosis Analysis (DANA): A high-throughput method to quantify neutrophil extracellular traps in fluorescent microscope images. *Biol. Proced. Online* **2018**, *20*, 7. [CrossRef] [PubMed]
22. Lee, K.H.; Kronbichler, A.; Park, D.D.-Y.; Park, Y.; Moon, H.; Kim, H.; Hyug, J.; Young, C.; Choid, S.; Shimd, S.; et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* **2017**, *16*, 1160–1173. [CrossRef] [PubMed]
23. Villanueva, E.; Yalavarthi, S.; Berthier, C.C.; Hodgin, J.B.; Khandpur, R.; Lin, A.M.; Rubin, C.J.; Zhao, W.; Olsen, S.H.; Klinker, M.; et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 538–552. [CrossRef]
24. Hakkim, A.; Fürnrohr, B.G.; Amann, K.; Laube, B.; Abed, U.A.; Brinkmann, V.; Herrmann, M.; Voll, R.E.; Zychlinsky, A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9813–9818. [CrossRef]

25. Khandpur, R.; Carmona-Rivera, C.; Vivekanandan-Giri, A.; Gizinski, A.; Yalavarthi, S.; Knight, J.S.; Friday, S.; Li, S.; Patel, R.M.; Subramanian, V.; et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 178ra40. [CrossRef]
26. Takeuchi, H.; Kawasaki, T.; Shigematsu, K.; Kawamura, K.; Oka, N. Neutrophil extracellular traps in neuropathy with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated microscopic polyangiitis. *Clin. Rheumatol.* **2017**, *36*, 913–917. [CrossRef]
27. Lande, R.; Lee, E.Y.; Palazzo, R.; Marinari, B.; Pietraforte, I.; Santos, G.S.; Mattenberger, Y.; Spadaro, F.; Stefanantoni, K.; Iannace, N.; et al. CXCL4 assembles DNA into liquid crystalline complexes to amplify TLR9-mediated interferon-α production in systemic sclerosis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1731. [CrossRef]
28. Carmona-Rivera, C.; Zhao, W.; Yalavarthi, S.; Kaplan, M.J. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 1417–1424. [CrossRef]
29. Yalavarthi, S.; Gould, T.J.; Rao, A.N.; Mazza, L.F.; Morris, A.E.; Núñez-Álvarez, C.; Hernández-Ramírez, D.; Bockenstedt, P.L.; Liaw, P.C.; Cabral, A.R.; et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: A newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthr. Rheumatol.* **2015**, *67*, 2990–3003. [CrossRef]
30. Mozzini, C.; Garbin, U.; Fratta, P.A.M.; Cominacini, L. An exploratory look at NETosis in atherosclerosis. *Intern. Emerg. Med.* **2017**, *12*, 13–22. [CrossRef]
31. Shand, L.; Lunt, M.; Nihtyanova, S.; Hoseini, M.; Silman, A.; Black, C.M.; Denton, C.P. Relationship between change in skin score and disease outcome in diffuse cutaneous systemic sclerosis: Application of a latent linear trajectory model. *Arthr. Rheum.* **2007**, *56*, 2422–2431. [CrossRef] [PubMed]
32. Lood, C.; Blanco, L.P.; Purmalek, M.M.; Carmona-Rivera, C.; de Ravin, S.S.; Smith, C.K.; Malech, H.L.; Ledbetter, J.A.; Elkon, K.B.; Kaplan, M.J. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 146–153. [CrossRef] [PubMed]
33. Panda, R.; Krieger, T.; Hopf, L.; Renné, T.; Haag, F.; Röber, N.; Conrad, K.; Csernok, E.; Fuchs, T.A. Neutrophil extracellular traps contain selected antigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 439. [CrossRef] [PubMed]
34. Pratesi, F.; Dioni, I.; Tommasi, C.; Alcaro, M.C.; Paolini, I.; Barbetti, F.; Boscaro, F.; Panza, F.; Puxeddu, I.; Rovero, P.; et al. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 1414–1422. [CrossRef] [PubMed]
35. Barnes, T.C.; Anderson, M.E.; Edwards, S.W.; Moots, R.J. Neutrophil-derived reactive oxygen species in SSc. *Rheumatology* **2012**, *51*, 1166–1169. [CrossRef]
36. Tourkina, E.; Richard, M.; Oates, J.; Hofbauer, A.; Bonner, M.; Gööz, P.; Visconti, R.; Zhang, J.; Znoyko, S.; Hatfield, C.M.; et al. Caveolin-1 regulates leucocyte behaviour in fibrotic lung disease. *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69*, 1220–1226. [CrossRef]
37. Hakkim, A.; Fuchs, T.A.; Martinez, N.E.; Hess, S.; Prinz, H.; Zychlinsky, A.; Waldmann, H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 75–77. [CrossRef]
38. Gourh, P.; Arnett, F.C.; Assassi, S.; Tan, F.K.; Huang, M.; Diekman, L.; Mayes, M.D.; Reveille, J.D.; Agarwal, S.K. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: Associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthr. Res. Ther.* **2009**, *11*, R147. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

DISCUSSION ET EVOLUTION DU PROJET SUR LA NETOSE

Après la publication de l'article, deux autres équipes ont exploré le phénomène de NETose dans la ScS, en utilisant une quantification basée sur des dosages ELISA de complexes ADN/MPO (115,394). Ces deux équipes ont mis en évidence avec cette méthode des résultats similaires aux nôtres, à savoir que le phénomène de NETose était plus important quantitativement chez les patients ayant des complications vasculaires, ainsi que ceux ayant une durée d'évolution de la maladie plus courte (115,394).

De façon intéressante, Kortam *et al.*, ont mis en évidence que les niveaux de NETose étaient corrélés de manière significative à VCAM-1 et E-selectine, marqueurs de défaillance vasculaire, renforçant ainsi l'hypothèse d'un lien possible entre le phénomène de NETose et la vasculopathie de la ScS (96,107,394). Par ailleurs, la génération de NETs était plus importante chez les patients avec des UD actives par rapport à des patients avec des UD guéries (394). De plus, des travaux suggèrent que le phénomène de NETose pourrait être impliqué dans le processus d'EndoMT (395). Ainsi, les quelques travaux réalisés jusqu'à maintenant suggèrent un lien entre l'excès de NETose, la dysfonction endothéliale et l'ischémie tissulaire dans la SSc.

Manfredi *et al*., ont démontré que les plaquettes de sujets ScS avaient la capacité d'activer les neutrophiles de ScS en promouvant le phénomène de NETose via la libération de microparticules plaquettaires exprimant HMGB1 (114,115). De façon intéressante, le blocage de l'axe HMGB1-RAGE (le récepteur d'HMGB1) avait pour conséquence d'inhiber la génération de NETs, suggérant ainsi un rôle clé d'HMGB1 dans l'induction de la NETose dans la ScS (114). L'administration de ces microparticules HMGB1+ à des souris immunodéficientes *NOD scid gamma* induisait un recrutement des neutrophiles de ces souris au niveau du parenchyme pulmonaire par voie sanguine, leur activation et une production de NETs (115). Sur le plan mécanistique, nous avons mis en évidence qu'à la fois les neutrophiles et le sérum des sujets ScS étaient déterminant dans l'excès de NETose constatée dans la ScS sans aller plus loin dans ce premier travail.

La deuxième partie du projet visait à mieux comprendre les facteurs impliqués dans l'excès de NETose mis en évidence dans la ScS. Dans la mesure où nous avions démontré précédemment que le neutrophiles de patients ScS atteints de complications vasculaires à risque ischémique étaient prédisposés à générer plus de NETs, nous décidions de focaliser nos efforts sur les anomalies intrinsèques des neutrophiles potentiellement impliquées et émettions l'hypothèse qu'un environnement hypoxique pouvait être un des facteurs favorisant la NETose.

COMPREHENSION DES MECANISMES REGISSANT LE PHENOMENE DE NETOSE AU COURS DE LA SCLERODERMIE SYSTEMIQUE

1. RATIONNEL ET MISE EN PLACE DU PROTOCOLE

Comme dit précédemment, les neutrophiles activés ont une capacité accrue à générer des NETs (394,395). L'activation des neutrophiles, tout comme le phénomène de NETose, sont très dépendants du stress oxydatif, avec la possibilité pour les neutrophiles de générer d'importantes quantité de FRO, formant ainsi une boucle d'auto-amplification du phénomène d'activation des neutrophiles (221,259). Ainsi, nous pouvons supposer que les mécanismes régissant l'activation des neutrophiles et le phénomène de NETose pourraient être en lien avec la régulation de l'environnement oxydatif.

La régulation du stress oxydatif environnant dans la population générale fait intervenir plusieurs acteurs différents, et parmi eux les mitochondries et l'hypoxie joue un rôle majeur (396). L'hypoxie est directement impliquée dans le développement d'HTAP idiopathique à travers notamment la génération de stress oxydatif, et est capable d'induire la génération de NETs en impliquant les voies HIF-1α et HMGB1 (397–399). On rappellera que HMGB1 a récemment été décrite comme associée à la NETose dans la ScS via les microparticules plaquettaires (115). De façon intéressante, une hypoxie cellulaire et tissulaire est fréquente lors de certaines complications de la ScS (400). En effet, en raison de complications viscérales (phénomène de Raynaud sévère et répété, ischémie critique avec reperfusion en lien avec les UD, HTAP et PID), les organes et les cellules de patients ScS sont soumis à une hypoxie transitoire ou chronique, pouvant induire des changements phénotypiques au niveau cellulaire (401,402). En réponse à l'hypoxie, les fibroblastes et les CE se mettent à produire du VEGF, créant une angiogenèse anarchique, aggravant ainsi le micro-environnement hypoxique (402). Il a été montré qu'il existait chez les patients ScS plusieurs anomalies régulées par l'hypoxie, notamment un polymorphisme d'HIF-1α et une surexpression du facteur de transcription NKX2-5 impliqué dans le développement cardiaque, qui sont associées à l'HTAP dans la ScS (403,404). De plus, une analyse transcriptomique réalisée chez les patients ScS a permis d'identifier plusieurs gènes activés via une inhibition de la voie Nox-dépendante par l'hypoxie, aboutissant à un excès de stress oxydatif dans la ScS, suggérant ainsi un rôle clé de l'hypoxie dans cette pathologie (405).

Nous avons émis l'hypothèse que l'hypoxie pourrait participer à la génération de NETs dans la ScS. Pour répondre à cette question, nous avons stimulés les neutrophiles de patients ScS et de contrôles de façon autologue, simultanément en condition normoxique (37°C et 21% d'O_2) et hypoxique (37°C et 1% d'O_2) via l'utilisation d'un incubateur hypoxique (**Figure 13**).



Figure 13. Chambre d'incubation hypoxique (Bactron®). Incubateur permettant de travailler en condition d'hypoxie avec une température de 37°C et un taux d'O_2 de 1% (contre 21% en normoxie).

2. LA GENERATION DE NETS IMPLIQUE LA VOIE NADPH-OXYDASE INDEPENDANTE VIA LES FRO MITOCHONDRIAUX ET EST EXACERBE PAR L'HYPOXIE DANS LA SCS

Article en préparation :

NETosis implicates a mitochondrial reactive oxygen species production through a NADPH-oxidase independant pathway and is exacerbated by hypoxia

in systemic sclerosis

Didier K, Serhal N, Salez G, Petitjean A, Terryn C, Peyret H, Dubuisson F, Djerada Z, Giusti D, Le Jan S, Servettaz A.

Ce travail a été financé par une bourse du groupe de recherche francophone sur la Sclérodermie Systémique. Le résumé de ce travail est proposé ci-dessous.

2.1. Description de la population étudiée

Dans ce travail, nous avons inclus 30 patients ScS (9 dcSCS et 21 lcScS) suivis au CHU de Reims dans les services de Médecine interne ou de Dermatologie, et répondant aux critères ACR/EULAR avec une durée médiane de suivi de 4ans (1 – 25), et 16 sujets présumés sains via l'EFS.

Concernant les complications viscérales, six patients avaient une PID (deux dcScS), neuf avaient des UD actives (trois dcScS), dix avaient une HTAP (deux dcScS), et un avait une histoire de CRS sans activité au moment du prélèvement (un dcScS).

Concernant les données immunologiques, huit patients avaient des anticorps anti-topoisomérase I (quatre dcScS), 14 patients avaient des anti-centromère (1 dcScS), une patiente avait des anti-ARN-polymérase III (une dcScS), deux patientes avaient des anti-U1RNP (deux lcScS), un patient avait des anti-NOR90 (un dcScS), et quatre patients n'avaient pas de spécificité antigénique mise en évidence.

2.2. L'hypoxie accentue la génération de NETs chez les ScS à l'inverse des témoins

Soumis à l'hypoxie, les neutrophiles de sujets sains généraient moins de NETs que lorsqu'ils étaient en normoxie, en accord avec la littérature. En revanche, les neutrophiles de ScS généraient significativement plus de NETs en hypoxie plutôt qu'en normoxie.

Les neutrophiles de patients atteints de complications vasculaires actives (HTAP et/ou UD active) généraient plus de NETs que ceux des patients sans complication vasculaire en hypoxie. De plus, le différentiel de pourcentage de NETs entre la normoxie et l'hypoxie était significativement plus important (+7,4%) chez les patients aux complications vasculaires, que chez les témoins (-1,9%), mais également comparativement aux patients sans complication vasculaire (+1,4%).

Lorsque les neutrophiles de ScS et de témoins étaient stimulés avec du PMA, un puissant agoniste de la NETose via la voie Nox-dépendante, tous deux voyaient leur capacité à générer des NETs fortement diminués sous hypoxie.

2.3. La NETose des neutrophiles sclérodermiques implique des FRO mitochondriaux, contrairement à la NETose de neutrophiles de sujets contrôles

Les mitochondries sont impliquées dans la voie Nox-indépendante de NETose via la génération de FRO mitochondriaux. Les neutrophiles de ScS et de sujets sains ont été stimulés de façon autologue en normoxie et en hypoxie. L'ADN était marquée par du DAPI, les NETs par du DAPI et un anticorps spécifique de la NE, les FRO mitochondriaux par un anticorps spécifique (TOMM20). Chez les sujets sains, en hypoxie et en normoxie, très peu de neutrophiles contenaient des FRO mitochondriaux. Notamment, il n'y avait pas de FRO mitochondriaux au niveau des neutrophiles générant des NETs. A l'inverse, la quasi-totalité des neutrophiles de ScS stimulés en normoxie et en hypoxie contenaient des FRO mitochondriaux, et tous les neutrophiles en NETose en contenaient. De plus, des protéines mitochondriales oxydées étaient également présentes sur des NETs ScS.

2.4. Le phénomène de NETose est un processus Nox-indépendant dans la ScS

Dans la mesure où les neutrophiles de ScS se comportaient différemment en hypoxie que les neutrophiles de sujets contrôles, nous avons émis l'hypothèse que la voie impliquée dans la génération de NETs était différente dans la ScS, comparativement aux sujets sains.

Ainsi, nous avons stimulé de façon autologue les neutrophiles de ScS et de témoins en normoxie et hypoxie, en ajoutant des inhibiteurs spécifiques des deux voies principalement impliquées dans la génération de NETs : la chelerythrine chloride, inhibiteur de la voie Nox-dépendante via l'inhibition de PKC (iPKC) et le MitoTEMPO, inhibiteur de la voie Nox-indépendante.

Dans la population témoin, l'utilisation des deux types d'inhibiteur n'avaient pas d'impact sur la génération de NETs en normoxie. En revanche, l'utilisation d'iPKC avait pour conséquence d'augmenter la génération de NETs en hypoxie. A l'inverse, les neutrophiles de ScS voyaient leur capacité à générer des NETs significativement inhibée par le MitoTEMPO en normoxie et en hypoxie, alors que l'utilisation d'iPKC n'avait pas de conséquence significative.

Nous avons analysé l'effet des inhibiteurs sur les neutrophiles selon le phénotype des patients sclérodermiques en normoxie et hypoxie, afin de comprendre si les voies conduisant à la NETose étaient différentes en fonction de la présence (n=11) ou non (n=7) de complications vasculaires actives, puisque la quantité de NETS produite était plus importante en cas de HTAP et d'UD. L'effet inhibiteur du MitoTEMPO était constaté dans les deux sous-groupes de patients sclérodermiques en hypoxie, sans différence entre ces deux sous-groupes, suggérant un mécanisme identique chez tous les patients ScS, impliquant la voie Nox-indépendante.

2.5. Conclusion

Notre travail montre qu'à l'inverse des sujets sains, le phénomène de NETose dans la ScS est un processus Nox-indépendant faisant intervenir les FRO mitochondriaux. De plus, nous montrons que ce mécanisme est commun à l'ensemble des patients ScS, mais qu'il est plus marqué (ou moins bien régulé) chez les patients avec complications vasculaires actives. L'hypoxie apparait comme un puissant inducteur de NETose dans les neutrophiles sclérodermiques, alors qu'elle inhibe la NETose dans les neutrophiles de sujets contrôles, soulignant le phénotype fonctionnel aberrant des neutrophiles de sujets sclérodermiques.

3. ARTICLE EN COURS D'ÉCRITURE

NETOSIS IMPLICATES A MITOCHONDRIAL REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION THROUGH A NADPH-OXIDASE INDEPENDENT PATHWAY AND IS EXACERBATED BY HYPOXIA IN SYSTEMIC SCLEROSIS

Didier K, Serhal N, Salez G, Petitjean A, Terryn C, Peyret H, Dubuisson F, Djerada Z, Giusti D, Le Jan S, Servettaz A.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Systemic sclerosis (SSc) is a rare connective tissue disease characterized by a skin and organs fibrosis, vasculopathy and autoimmunity. Due to vascular complications, organs and cells of SSc patients are exposed to repeated or chronic hypoxia. We hypothesized that the excess of neutrophil extracellular traps (NETs) production recently evidenced in SSc patients, especially in those with severe vascular damage could be triggered by neutrophil hypoxia.

METHODS: Neutrophils from 30 SSc patients and 16 controls were stimulated with serum in autologous conditions in normoxia (37°C and 21% O_2) and in hypoxia (37°C and 1% O_2) using an hypoxic chamber. NETs were visualized, and quantified, by staining with Sytox orange, DAPI, neutrophil elastase. To explore the intrinsic pathway implicated, specific inhibitors of the NADPH-oxidase (Nox) pathway (chelerythrine chloride) and the Nox-independent pathway (MitoTEMPO) were used.

RESULTS: Neutrophils from SSc exposed to autologous serum in normoxia conditions release high amount of NETs. Hypoxia significantly exacerbated NETosis in neutrophils from SSc patients, whereas it abrogated NETs release in neutrophils from controls (p=0.0005 and p=0.0002, respectively).

Hypoxia-induced NETosis was evidenced in patients with vascular complication (pulmonary arterial hypertension and active digital ulcer), as in patients without active vascular complication (p=0.01) suggesting a common aberrant neutrophil response to hypoxia in SSc patients.

Moreover, in normoxia and hypoxia conditions, the specific inhibition of the Nox-independent pathway significantly decreased NETosis in SSc neutrophils ($p<0.0001$), whereas it has no effect on NETosis in control neutrophils. In addition mitochondrial reactive oxygen species (ROS) were early generated by SSc neutrophils displaying NETosis. By contrast neutrophils from controls did not produce mitochondrial ROS during NETosis.

CONCLUSION: Neutrophils from SSc patients, display an unique functional state characterized by a basal production of mitochondrial ROS and a deregulated Nox-independent pathway of NETosis. Hypoxia contributes to the aberrant functional phenotype of SSc neutrophils and further stimulates SSc NETosis.

ABBREVIATION

AAb	autoantibody
ANCA	anti-neutrophil cytoplasm antibody
dcSSc	diffuse cutaneous systemic sclerosis
DU	digital ulcer
EC	endothelial cell
ERA	endothelin receptor antagonist
HIF-1α	hypoxia-inductible factor 1 α
HMGB1	high mobility group box 1
ILD	interstitial lung disease
IPF	idiopathic pulmonary fibrosis
lcSSc	limited cutaneous systemic sclerosis
mtDNA	mitochondrial DNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
mtROS	mitochondrial reactive oxygen species
NE	neutrophil elastase
NET	neutrophil extracellular traps
Nox	NADPH-oxidase
PAH	pulmonary arterial hypertension
PDE5i	phosphodiesterase type 5 inhibitor
PKC	protein kinase C
PKCi	inhibitor of PKC
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
ROS	reactive oxygen species
SLE	systemic lupus erythematosus
SRC	scleroderma renal crisis
SSc	systemic sclerosis
TGF- β	transforming growth factor-β
TLR	toll-like receptor
VEGF	vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a rare connective tissue disease, characterized by organ and skin fibrosis (two subsets according to skin fibrosis (limited SSc [lcSSc] or diffuse SSc [dcSSc]), vasculopathy and autoimmunity (17). Beside skin fibrosis, life-threatening complications can also occur in SSc, such as pulmonary arterial hypertension (PAH) and interstitial lung disease (ILD), both leading to respiratory insufficiency (22,24). The exact pathogenesis of SSc remains unclear, based on a triad impacted by oxidative stress, leading to vasculopathy and fibrosis (58). SSc is marked by an excessive collagen synthesis by fibroblasts and myofibroblasts through several defects in the control of *transforming growth factor-β* (TGF-β) pathways, and endothelial cells (EC) alteration leading to early angiogenesis and vasculogenesis abnormalities. Furthermore, SSc is characterized by a breakdown of self-tolerance, toward various antigens, and especially nuclear antigens.

Growing evidence argues for a role of other cells, notably platelets, macrophages and more recently neutrophils in disease pathogenesis (24,30,58). Neutrophils are evidenced in the early stages of the disease in lesional and non-lesional skin areas (211–213). These cells are known to produce a high level of reactive oxygen species (ROS), which play a central role in SSc pathogenesis (221,222). ROS were found in lesional skin of patients, but also in non-lesional skin, suggesting an oxidative environment occurring in SSc (228). ROS, and other markers reflecting the oxidative stress, are correlated with the severity of the skin and lung fibrosis (76,225,226,228,229). Thus, oxidative stress and neutrophil activation are strongly linked together. Interestingly, neutrophils from SSc patients are able to directly influence fibroblast and EC migration and proliferation *in vitro* (136,216,406). Recently, our team evidenced that NETosis, a kind of activation depending on oxidative stress, was upregulated in neutrophils from SSc patients exposed to their own serum (407). NETosis is an active process allowing the release of traps (called NETs for Neutrophil Extracellular Traps) containing decondensed chromatin and several proteins. This form of activation has been observed in various conditions (254,408). Our team and two others evidenced, that NETosis was increased in patients displaying active vascular complications such as PAH or digital ulcers (DU), and was also higher at the early stages of the disease (115,394,407).

The factors initiating NETosis in SSc neutrophils and the pathways involved are still unknown. One could hypothesize that the regulation of NETosis should be directly linked to the regulation of oxidative environment. In healthy people, several regulators of oxidative stress are evidenced, influenced by the percentage of oxygen in the environment (396). In idiopathic

pulmonary fibrosis (IPF), a disease characterized by lung fibrosis looking like SSc, NETosis occurs in hypoxic lungs (397,409). Chronic or acute tissular hypoxia is frequent in some complications of SSc (400). Indeed, repeated and severe Raynaud's phenomena, DU-related critical ischemia, PAH, and ILD, exposed organs and cells to transient or chronic hypoxia, that may induce phenotypic changes (401,402). In response to such hypoxia, SSc fibroblasts and EC express the potent angiogenic factor *vascular endothelial growth factor* (VEGF), that create an anarchic angiogenesis worsening the hypoxic microenvironment (402). Furthermore, hypoxia is implicated in the development of idiopathic PAH, favors the generation of oxidative stress, and is able to induce NETosis in diverse physiological and pathological contexts, notably through the *hypoxia-inductible factor 1 α* (HIF1α) and *high mobility group box 1* (HMGB1) pathways (397–399). This last one was recently evidenced as a potential inductor of NETosis in SSc (115).

Here we hypothesized that hypoxia, that occurs in SSc patients, especially in those with severe vascular damage, could be a trigger of NETosis in SSc through the modulation of mitochondrial oxidative stress.

PATIENTS AND METHODS

Study design and population

We included patients over age 18 at the time of the inclusion and with a diagnosis of SSc according to the ACR/EULAR criteria (43). Eligible patients had to have heart sonography, a pulmonary function test and at least one high-resolution CT scan during follow-up. For all patients, the following data were collected: age at disease onset (defined as the age at which the first non–Raynaud's phenomenon symptom appeared), disease duration, sex, skin phenotype, organ involvement during follow-up (PAH, ILD, scleroderma renal crisis [SRC]), presence (or absence) of antinuclear antibody and the specific AAb (anti-topoisomerase I, anti-centromere, anti-RNA polymerase III, anti-U1RNP, anti-U3RNP, anti-Pm/Scl, anti-Ku, anti-Th/To, anti-NOR90) or none of these nine AAbs.

Patients were classified as having dcSSc or lcSSc according to the Leroy and Medsger classification (17). ILD was defined as the presence of at least one usual sign of SSc-associated ILD on HRCT, defined by the identification of fibrotic features on chest HRCT generally most pronounced in the lung bases (commonly non-specific interstitial pneumonia). PAH was diagnosed based on right-heart catheterization according to diagnostic criteria at the time of inclusion (mean pulmonary arterial pressure ≥20 mmHg and pulmonary capillary wedge pressure ≤15 mmHg in a patient with no ILD or ILD with forced vital capacity % predicted ≥70% and extent of ILD on HRCT ≤20%). SRC was defined as the abrupt onset of severe hypertension and/or decline in renal function, with proteinuria but without an alternative etiology and/or microangiopathy visualized on a renal biopsy.

Blood donors from the French Blood Institute were enrolled as controls.

Ethical considerations

The study was approved by the ethics committee for the protection of human beings involved in biomedical research (2016/49-ID RCB: 2016-A01517-44). Informed consent to participate was obtained from each patient and control subject included in the study for blood collection and the use of their de-identified medical record data.

Neutrophil isolation, stimulation and inhibition

To isolate neutrophils, heparinized blood was layered on an association of dextran and diatrizoate gradient with a density of 1.113 ± 0.001 g/mL (Polymorphprep: Proteogenix, Schiltigheim, France) following the manufacturer's instructions. Cells were then distributed in a 24 well plate (2.10^5 cells/well) on coverslips coated with L-lysine (Acros Organics, Belgium).

Neutrophils were then stimulated with either 50nM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA: Sigma-Aldrich, USA), 5 µM of calcium ionophore (A23187: Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA), or autologous serum (final dilution 10%). In some experiments, 10µM of chelerythrine chloride (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA), an inhibitor of protein kinase C (PKCi), were added to specifically inhibit the Nox-dependent pathway, or 100µM of MitoTEMPO (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) were added to specifically inhibit the Nox-independent pathway.

Neutrophils were then incubated for 4 h at 37°C with 21% or 1% O_2 (using an hypoxia chamber), in a final volume of 500 µL. Each condition was performed in duplicate. At the end of incubation, cells were washed and fixed by paraformaldehyde 4% (VWR, Darmstadt, Germany).

Visualization and quantification of NETs

Sytox Orange nucleic acid stain (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) was used to stain extracellular DNA filaments with a dilution of 1:5000, and DAPI (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) was used for intra and extracellular DNA labelling with a dilution of 1:1000. Neutrophil elastase (NE) was stained using a mouse polyclonal antibody to NE (1:250. NP57, abcam, Cambridge, UK) revealed by a secondary donkey anti-mouse antibody Alexa Fluor 568 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA). Mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) was stained using a specific rabbit polyclonal antibody (1:250. TOMM20, abcam, Cambridge, UK), revealed by a secondary donkey anti-rabbit antibody Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA).

NETs were visualized using an inverted epifluorescence microscope (AxioObserver Z1: Zeiss, Germany; camera Cool Snap HQ2: Roper Scientific, Les Ulis, France) with the software Metamorph (Molecular devices, version 7.7.10, San Jose, CA,USA) at a magnification of 20x with an excitation/emission of 547/570 nm for Sytox Orange and 350/461 nm for DAPI. On

each slide, 16 successive images (on the slide center) of 398 µm by 297 µm were taken for a total area about 2 mm2 by coverslips. Mitochondrial ROS were visualized using a slide scanner (Olympus: VS120, Tokyo, Japan) with the software OlyVIA (Olympus, version 2.9.2, Tokyo, Japan) at a magnification of 6.6x and 20x with an excitation/emission of 350/461 nm for DAPI, 579/603 nm for NE and 499/520 nm for TOMM20.

The quantification of NETs was done as previously described, using a home-made macro running in ImageJ software (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, USA) that counted the number of nucleus stained by DAPI and NETs were analyzed using the signal of Sytox Orange (407).

Statistical analysis

GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was used for statistical analyses. The variables were not normally distributed, as assessed by the d'Agostino and Pearson omnibus normality test and Shapiro–Wilk normality test, and comparisons between two groups were performed using the Mann–Whitney test or the Wilcoxon test, as appropriate. *p*-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Description of the population

A total of 30 patients with SSc (nine dcSSc), and 16 controls were included in this study. The clinical and biological characteristics of the studied population are presented in **Table 1**. Regarding on internal organ involvement, six patients had ILD (two dcSSc), ten had PAH (two dcSSc), nine had active ischemic DU (three dcSSc) and one had an history of SRC without activity at the time of inclusion (dcSSc). All patients presented with Raynaud's phenomenon. Among them, 17 patients were identified in this work as patients "with active vascular complications", defined by the presence of PAH (8/17), active ischemic DU (7/17), or both of them (2/17).

Concerning treatment, two patients were treated with prednisone ≤ 10mg per day (one dcSSc), six were treated with mycophenolate mofetil (five dcSSc), 13 were treated with an endothelin receptor antagonist (ERA), of whom 12 with Bosentan (four dcSSc) and one with Macitentan (one lcSSc), seven patients were treated with a phosphodiesterase type 5 inhibitor (PDE5i), of whom six with Tadalafil (one dcSSc) and one with Sildenafil (one lcSSc), three patients were treated with Treprostinil (two dcSSc), and one patient was treated with Riociguat (one lcSSc).

Table 3. Description of the population.

	Total SSc (n = 30)	dcSSc (n = 9)	lcSSc (n = 21)	Controls (n = 16)
General features				
Female, n (%)	27 (90)	7 (77.8)	20 (95.2)	10 (62.5)
Age at inclusion (year), median (IC)	61 (30-87)	62 (30-75)	60 (33-87)	48 (24-59)
Disease duration (year), median (IC)	4 (1-25)	3 (1-25)	4 (1-21)	
Internal organ involvement				-
ILD, n (%)	6 (20)	2 (22.2)	4 (19.1)	-
PAH, n (%)	10 (33.3)	2 (22.2)	8 (38.1)	-
Active DU, n (%)	9 (30)	3 (33.3)	6 (28.6)	-
SRC, n (%)	1 (3.3)	1 (11.1)	0 (0)	-
Antibody[1]				
Anti-topoisomerase I, n (%)	8 (26.7)	4 (44.4)	4 (19.0)	
Anti-centromere, n (%)	14 (46.7)	1 (11.1)	13 (61.9)	
Anti-RNA polymerase III, n (%)	1 (3.3)	1 (11.1)	0 (0)	
Anti-U1RNP, n (%)	2 (6.7)	0 (0)	2 (9.5)	
Anti-NOR90, n (%)	1 (3.3)	1 (11.1)	0 (0)	
Not identified, n (%)	4 (13.3)	2 (22.2)	2 (9.5)	
Treatment[2]				
Prednisone	2 (6.7)	1 (11.1)	1 (4.8)	-
Mycophenolate mofetil	6 (20)	5 (55.6)	1 (4.8)	-
ERA[3]	13 (30)	4 (44.4)	9 (42.9)	-
PDE5i[4]	7 (23.3)	1 (11.1)	6 (28.6)	-
Treprostinil	3 (10)	2 (22.2)	1 (4.8)	-
Riociguat	1 (3.3)	0 (0)	1 (4.8)	-

[1] All patient were tested for anti-topoisomerase I, anti-centromere, anti-RNA polymerase III, anti-U1RNP, anti-U3RNP, anti-Pm/Scl, anti-Ku, anti-Th/To and anti-NOR90 antibody. [2] Description of the treatments at the time of inclusion. [3] Twelve patients were treated with Bosentan and one patient with Macitentan. [4] Six patients were treated with Tadalafil and one with Sildenafil. SSc = systemic sclerosis. dcSSc = diffuse cutaneous systemic sclerosis. lcSSc = limited cutaneous systemic sclerosis. ILD = interstitial lung disease. PAH = pulmonary arterial hypertension. DU = digital ulcer. SRC = history of scleroderma renal crisis (not active). ERA = endothelin receptor antagonist. PDE5i = phosphodiesterase type 5 inhibitor. CI = confidence interval.

Hypoxia exerts opposite effects on NETosis in SSc neutrophils compared to control neutrophils incubated with autologous serum

After exposition to autologous serum in normoxic environment, neutrophils from SSc patients with active vascular complications (PAH, active DU) generate more NETs (quantified by the percentage of NETs per nucleus) than neutrophils from controls ($p < 0.05$, **Figure 2A**) as previously evidenced by us and other teams. When autologous incubations were performed in hypoxic condition (1% O_2 using an hypoxia chamber), NETosis was found abrogated in

control neutrophils ($p = 0.0002$, **Figure 1, panels A, B, C**). By contrast, the percentage of NETs per nucleus significantly increased in SSc neutrophils ($p = 0.0005$, **Figure 1, panels D, E, F)**).

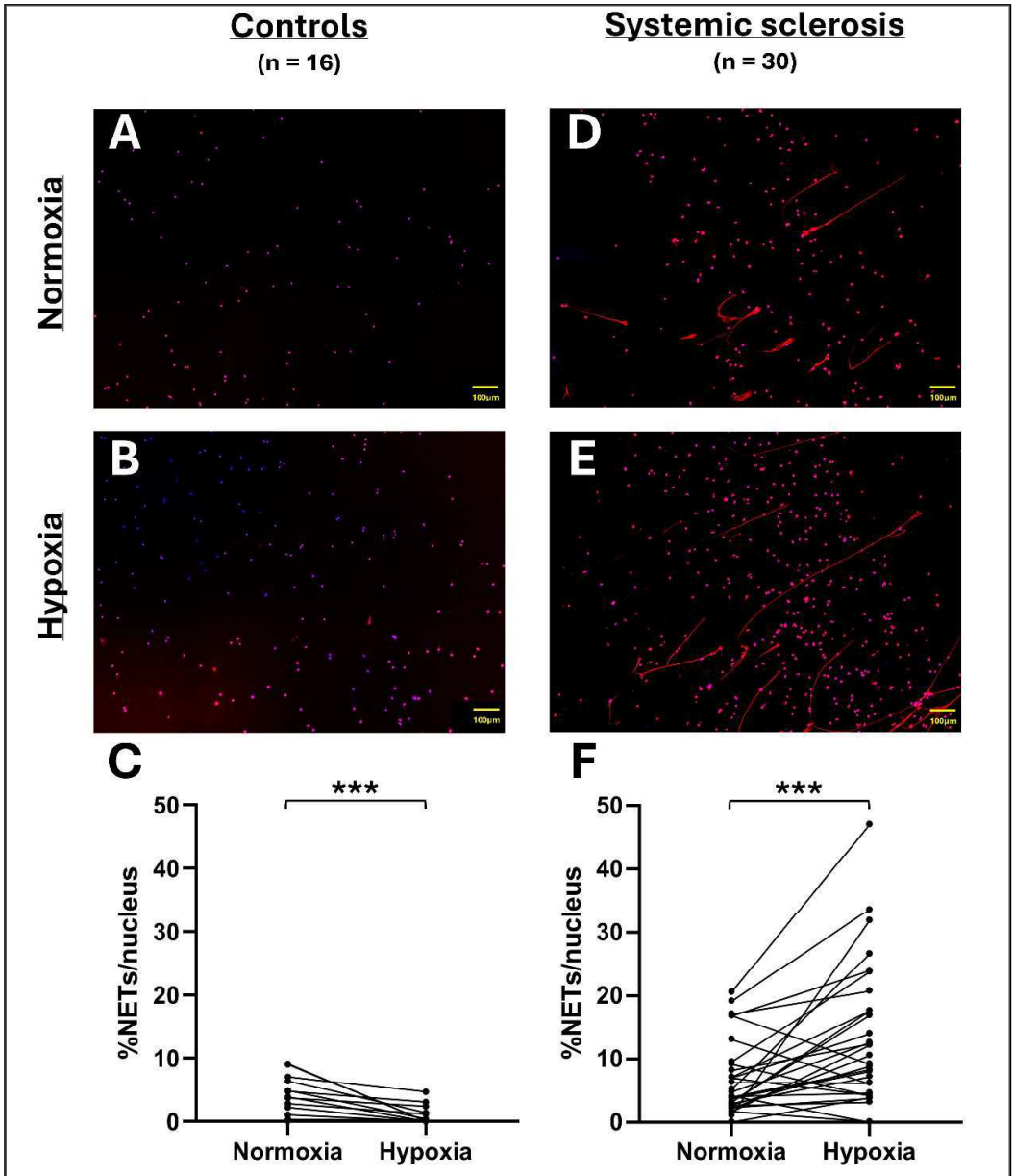


Figure 14. Hypoxia significantly increased NETosis phenomenon in systemic sclerosis (SSc) patients, by contrast with controls. *(**A**) and (**B**) illustrate the most representative pictures of polymorphonuclear neutrophils (PMN) from controls, and (**D**) and (**E**) PMN from SSc patients (Sytox Orange and DAPI, 16 consecutives pictures with 20x magnification) incubated in normoxia and hypoxia (respectively) with autologous serum. (**C**) and (**F**) represent the effect of hypoxia on the percentage of NETs per PMN from controls (n=16), and from SSc patients (n=30) respectively. Experiments in normoxia and hypoxia for each patient and control were performed simultaneously and in duplicate. *** $p < 0.001$ (Wilcoxon test).*

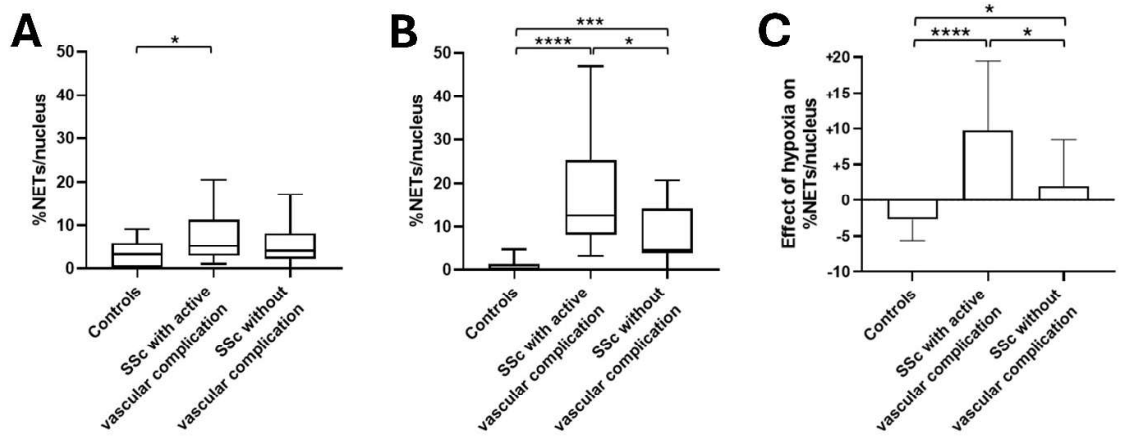


Figure 15. Hypoxia preferentially increased NETosis phenomenon in systemic sclerosis (SSc) patients with vascular complications*. Patients were divided into two subgroups: patients with active vascular complications (pulmonary arterial hypertension or active digital ulcer) or without these complications. All stimulations were performed in autologous condition and in duplicate. The percentage of NETs released by PMN is represented by a "box and whiskers". Boxes show the 25–75th percentiles, lines show the median value, and whiskers show the range of the percentage of NETs released by PMN. (**A**) and (**B**), represent the median percentage of NETs, respectively in normoxia and hypoxia (n=16 for controls, n=17 for patients with active vascular complications, and n=13 for patients without vascular complications. (**C**) represents the differential between normoxia and hypoxia. **** p < 0.0001, *** p < 0.001, * p < 0.05 (Mann-Whitney test).*

Hypoxia differentially exacerbates NETs release in SSc patients according to their phenotype

To assess if the paradoxical effect of hypoxia on SSc neutrophils was depending on the phenotype of the disease and given previous results obtained by others and us showing that NETosis was increased in patients with vascular complications, we further investigated the effect of hypoxic condition on neutrophils from patients according their disease characteristics.

When stimulated in hypoxic environment, neutrophils from SSc patients displaying active vascular complications (PAH, active DU) released significantly more NETs than those from controls (median of 12.5% and 0% respectively, $p < 0.0001$) (**Figure 2B**). Neutrophils from patients without active vascular complication also released significantly more NETs than those from controls (median of 4.5%, $p = 0.0001$). Comparing the two groups of SSc patients, we evidenced that neutrophils from patients with active vascular complications generated higher amounts of NETs than patients without active vascular disease at the time of the study when stimulated in this condition ($p = 0.01$).

To better understand the change induced by hypoxia in NETosis induction between the different subgroups of patients we measured the difference between the percentage of NETs per

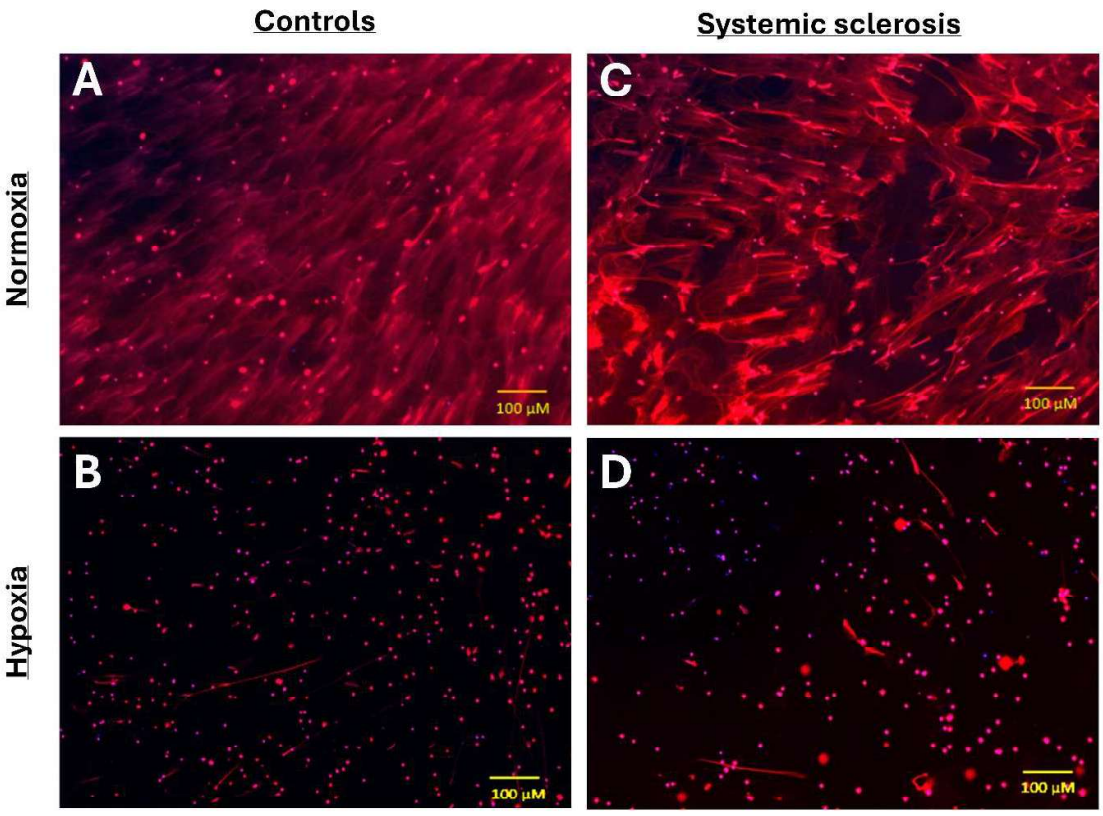
cell released in normoxia and in hypoxia for each tested individual by subtraction (**Figure 2C**). NETs production significantly increased in neutrophils from SSc patients (median difference of +4.3% of NETs, $p = 0.0005$) compared with controls (median difference of -1.7% of NETs, $p = 0.0002$). The highest difference between normoxia and hypoxia was observed in neutrophils from the subgroup of patients with active vascular complication (median difference of +7.1% of NETs). Compared with neutrophils from SSc patients without vascular complication (median difference of +1.4% of NETs), the increase in NETs production induced by hypoxia was significantly higher for neutrophils from SSc patients with active vascular complication ($p = 0.02$).

Taken together these results show that neutrophils from SSc patients, especially from those with active vascular disease display an aberrant response to hypoxia leading to activate NETosis pathways and NETs release.

NETosis is associated with metabolic changes and an early production of mitochondrial ROS in SSc neutrophils

To further analyze the functional phenotype of SSc neutrophils, we stimulated them with PMA, instead of autologous serum in normoxic and hypoxic conditions. Healthy neutrophils stimulated with PMA were used as controls. PMA is known to trigger NETosis by activating PKC and NADPH-oxidase pathway.

NETosis decreased in SSc neutrophils stimulated with PMA in hypoxia compared to normoxia (**Supplementary Figure 1)**. Thus, the stimulation with PMA and SSc serum had opposite effects on SSc neutrophils in hypoxia, suggesting they activated different pathways. We hypothesis that serum-induced SSc NETosis was depending on mitochondrial rather than NADPH-oxidase generated ROS.



***Supplementary Figure 1**. Hypoxia inhibited NETosis phenomenon when PMN from controls (**A – B**) and from SSc (**C – D**) were stimulated with PMA. The most representative pictures of 16 consecutives pictures with 20x magnification are presented here. PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate.*

After stimulation with autologous serum, almost no neutrophils from controls (n=4) produced mitochondrial (mt)ROS, in normoxia and in hypoxia (**Figure 3A**). Even in the rare neutrophils from healthy controls performing NETosis no mtROS was evidenced (**Figure 3B**). By contrast, almost all SSc neutrophils exposed to autologous serum (n=4) produced mtROS, in normoxia and in hypoxia (**Figure 3C**). Moreover all SSc neutrophils with NETs contained mtROS (**Figure 3D**).

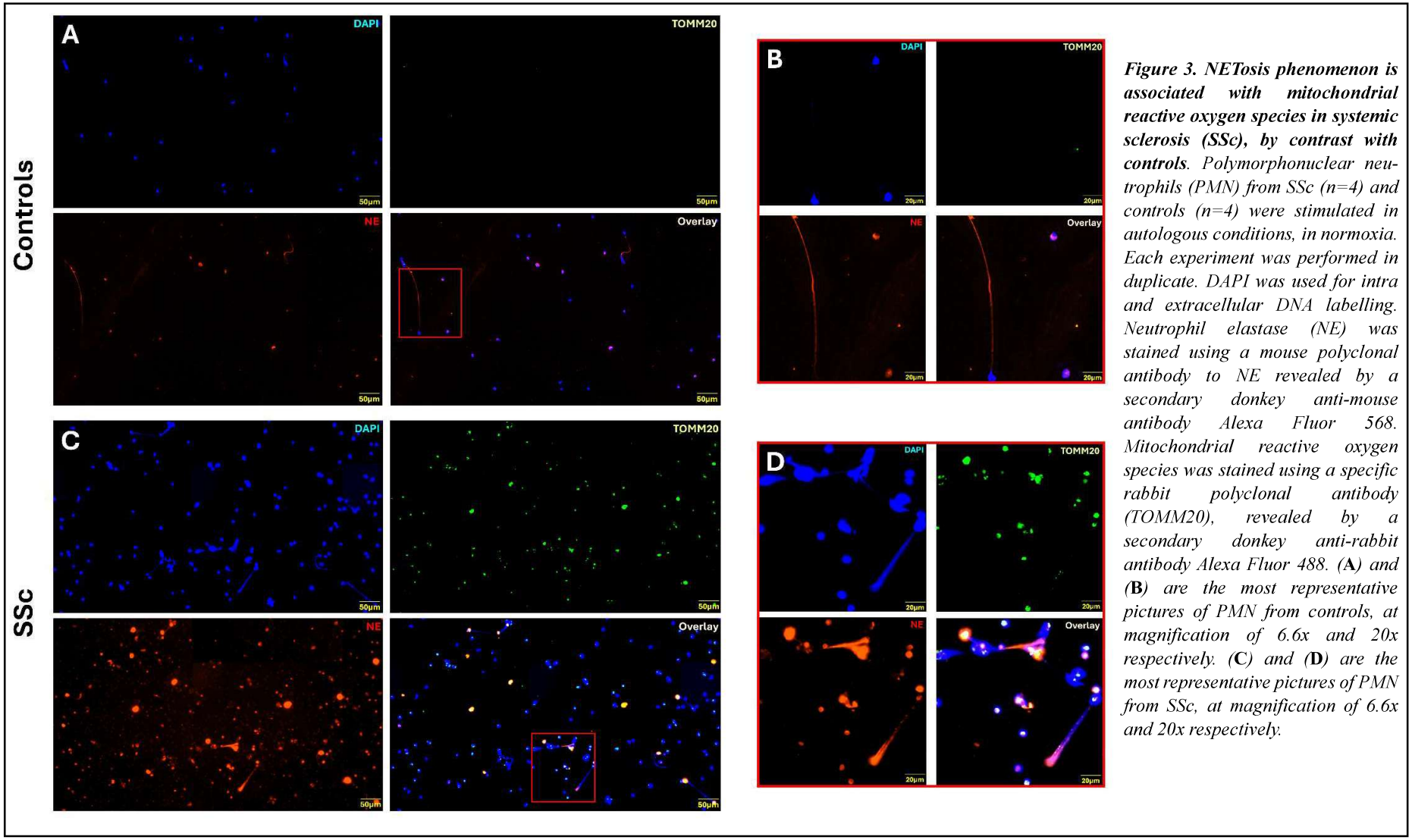


Figure 3. NETosis phenomenon is associated with mitochondrial reactive oxygen species in systemic sclerosis (SSc), by contrast with controls*. Polymorphonuclear neutrophils (PMN) from SSc (n=4) and controls (n=4) were stimulated in autologous conditions, in normoxia. Each experiment was performed in duplicate. DAPI was used for intra and extracellular DNA labelling. Neutrophil elastase (NE) was stained using a mouse polyclonal antibody to NE revealed by a secondary donkey anti-mouse antibody Alexa Fluor 568. Mitochondrial reactive oxygen species was stained using a specific rabbit polyclonal antibody (TOMM20), revealed by a secondary donkey anti-rabbit antibody Alexa Fluor 488. (**A**) and (**B**) are the most representative pictures of PMN from controls, at magnification of 6.6x and 20x respectively. (**C**) and (**D**) are the most representative pictures of PMN from SSc, at magnification of 6.6x and 20x respectively.*

NETosis phenomenon is a NADPH-oxidase independent process in SSc

Given the differences observed in neutrophils function and mitochondrial activation after hypoxia within SSc patients and controls, we hypothesized that the NEtosis pathways could be distinctively regulated in neutrophils from SSc patients and controls in normoxia and in hypoxia. Two main pathways have been described to induce NETosis in neutrophils: a classical pathway involving NADPH-oxidase (Nox), and a Nox-independent pathway. We took advantage of available specific inhibitors of each pathway to address this question. Neutrophils from each patient and control were stimulated with autologous serum simultaneously in normoxia and in hypoxia, with a Nox-dependent pathway inhibitor, the protein kinase C inhibitor (PKCi), or with a specific mitochondria-targeted antioxidant (MitoTEMPO) that inhibits a Nox-independent pathway (**Figure 4**).

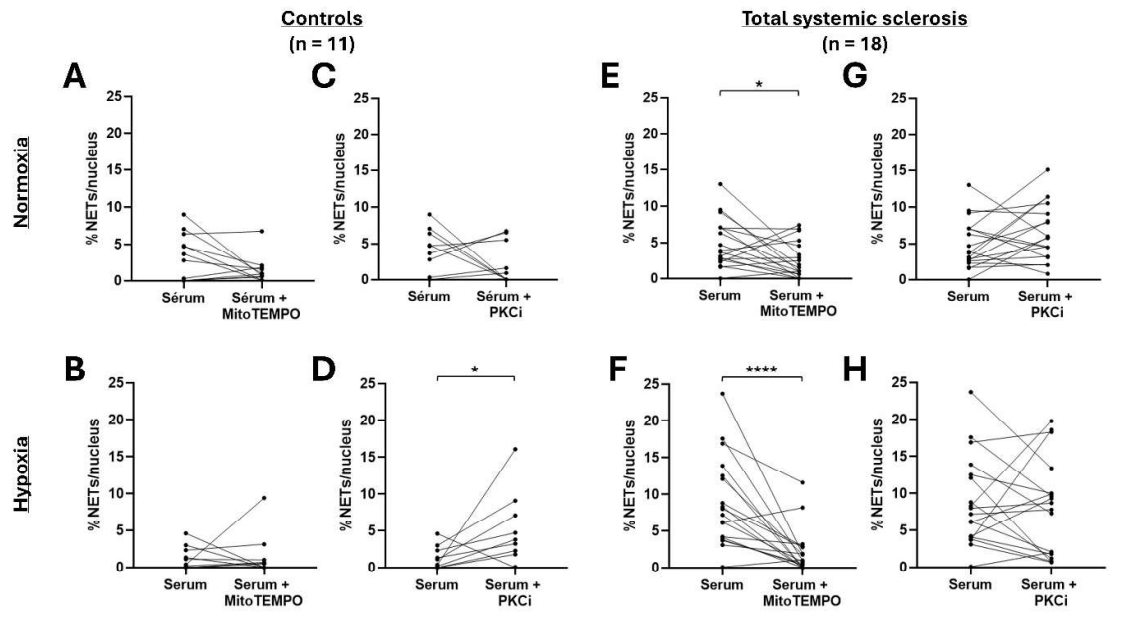


Figure 4. NETosis phenomenon is a NADPH-oxidase (Nox)-independent process in systemic sclerosis (SSc) patients, by contrast with controls*. (**A**) and (**B**) represent the effect of MitoTEMPO (a Nox-independent pathway inhibitor), and (**C**) and (**D**) the effect of chelerythrine chloride (an inhibitor of PKC [PKCi], to inhibit the Nox-dependent pathway) on polymorphonuclear neutrophils (PMN) from controls (n=11) in normoxia and hypoxia respectively. (**E**) and (**F**) represent the effect of MitoTEMPO, and (**G**) and (**H**) the effect of PKCi on PMN from SSc patients (n=18) in normoxia and hypoxia respectively. **** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$ (Wilcoxon test).*

Concerning neutrophils from controls (n=11), the addition of MitoTEMPO did not significantly modulate NETs production in normoxic (**Figure 4A**, $p = 0.14$) and hypoxic

conditions (**Figure 4B**, $p = 0.97$). The inhibition of PKC did not modify NETosis in normoxic condition (**Figure 4C**, $p = 0.55$), whereas it restored the ability of neutrophils to perform NETosis in hypoxia (**Figure 4D**, $p = 0.03$).

In neutrophils from SSc patients (n=18), MitoTEMPO significantly reduced NETs production both in normoxia (**Figure 4E**, $p = 0.04$) and in hypoxia (**Figure 4F**, $p < 0.0001$). On the other side, the addition of PKCi did not influence NETs generation by SSc neutrophils in normoxia (**Figure 4G**, $p = 0.17$) and in hypoxia (**Figure 4H**, $p = 0.39$).

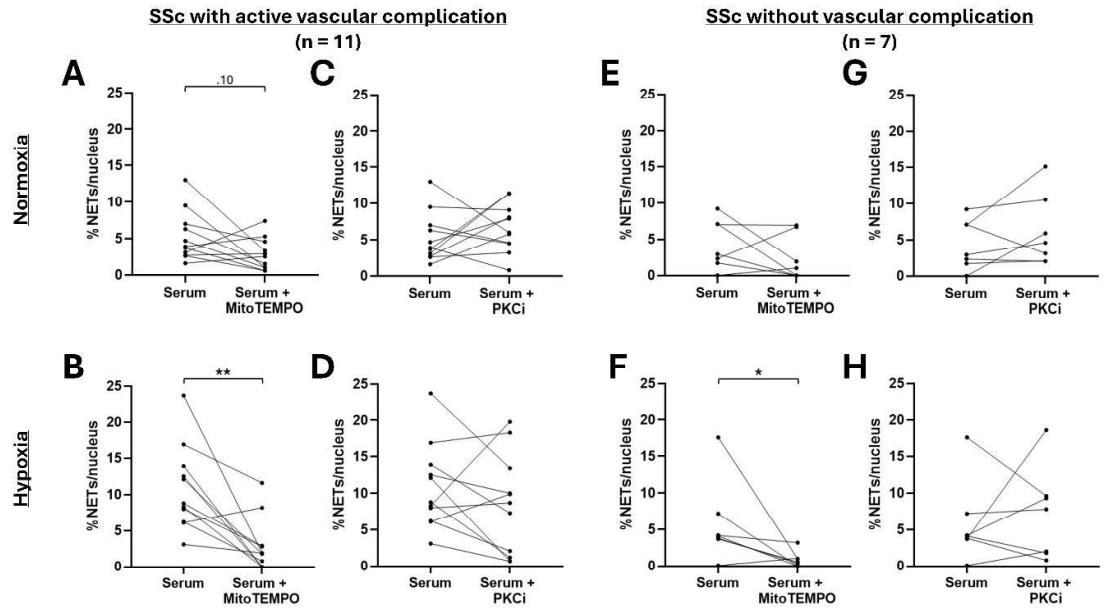


Figure 16. NETosis phenomenon is a NADPH oxidase (Nox)-independent process in all type of systemic sclerosis (SSc). (***A***) and (***B***) represent the effect of MitoTEMPO (a Nox-independent pathway inhibitor), and (***C***) and (***D***) the effect of chelerythrine chloride (an inhibitor of PKC [PKCi], to inhibit the Nox-dependent pathway) on polymorphonuclear neutrophils (PMN) from SSc patients with vascular complication (pulmonary arterial hypertension and active digital ulcer, n=11) in normoxia and hypoxia respectively. (***E***) and (***F***) represent the effect of MitoTEMPO, and (***G***) and (***H***) the effect of PKCi on PMN from SSc patients without vascular complication (n=7) in normoxia and hypoxia respectively. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (Wilcoxon test).

We next analyzed the effects of NETosis inhibitors regarding the vascular phenotype of SSc patients.

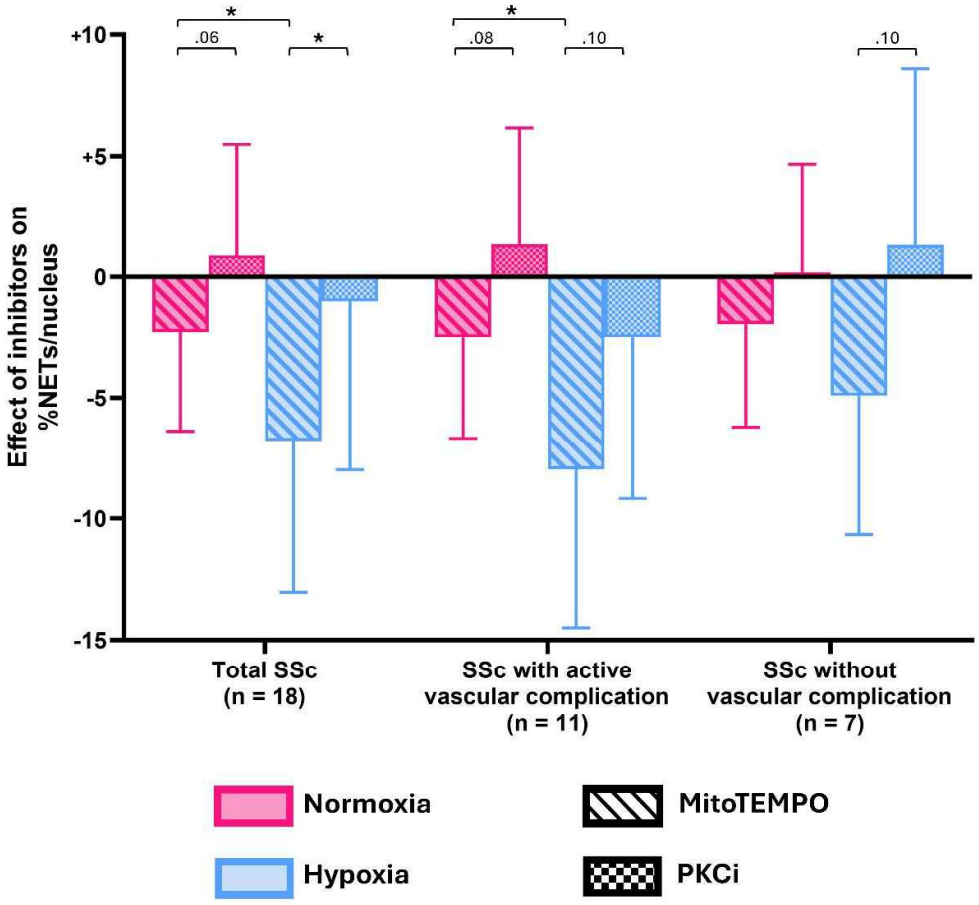
The addition of MitoTEMPO on neutrophils from SSc patients displaying active vascular complication (n=11) was associated with a trend to a decrease in NETosis in normoxia

(**Figure 5A**, $p = 0.10$) and a significant reduction in hypoxia (**Figure 5B**, $p = 0.003$). On the other side, the addition of PKCi did not change the quantity of NETs generated in normoxia (**Figure 5C**, $p = 0.36$) and in hypoxia (**Figure 5D**, $p = 0.24$).

Regarding neutrophils from SSc patients without active vascular complication (n=7), the addition of MitoTEMPO did not modify NETosis in normoxia (**Figure 5E**, $p = 0.29$), but again significantly inhibited NETs production in hypoxia (**Figure 5F**, $p = 0.04$). As observed in the group of patients avec active complications, PKCi did not change the level of NETs produced whatever the percentage of oxygen in the environment (**Figure 5G**, $p = 0.21$ in normoxia and **Figure 5H**, $p = 0.93$ in hypoxia).

Regarding the percentage of change induced by the inhibitors used in the different conditions of oxygen tested, the highest reduction of NETs production was observed with MitoTEMPO on neutrophils from SSc patients with active vascular complications (**Supplementary Figure 2**).

Taken together, compared to healthy neutrophils, we evidenced that neutrophils from SSc patients, display a distinctive functional state characterized by a basal production of mitochondrial ROS. Hypoxia further increases the mitochondrial generation of ROS suggesting a Nox-independent pathway of NETosis in this setting. The inhibition of the production of ROS by mitochondria partially inhibits NETosis of SSc neutrophils, whereas the inhibition of the classical Nox-dependant pathway has no effect.



Supplementary Figure 2. NETosis phenomenon is a NADPH oxidase (Nox)-independent process in all type of systemic sclerosis (SSc). *Polymorphonuclear neutrophils (PMN) from SSc patients (n=18) were stimulated in autologous conditions, in normoxia and hypoxia simultaneously for each patient. Each experiment was performed in duplicate, without inhibitor, with chelerythrine chloride (an inhibitor of PKC [PKCi], to specifically inhibit the Nox-dependent pathway), or MitoTEMPO (specific inhibitor of the Nox-independent pathway). SSc patients were divided into two subgroups: those with vascular complication (pulmonary arterial hypertension or active digital ulcer, n=11), and those without (n=7). * $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).*

DISCUSSION

Based on the direct observation and quantification of NETosis we evidenced that neutrophils from SSc patients exposed to autologous serum display pathological functional abnormalities characterized by a production of mitochondrial ROS in the context of excessive NETosis. Neutrophils from most of the SSc patients tested displayed such functional abnormalities, although this pattern was evidenced to be more severe in neutrophils from patients with PAH and active DU. We unraveled that the main pathway involved in the SSc-related NETosis, was PKC and Nox-independent. Furthermore we evidenced that hypoxia was a potent trigger of neutrophil activation in SSc neutrophils, by further increasing the mitochondrial generation of ROS, and NETs generation.

We evidenced that both quantity and quality differ between NETosis in healthy neutrophils and SSc neutrophils exposed to autologous sera. In a previous work, we showed that NETosis was increased in neutrophils from SSc patients displaying active vascular complications such as PAH or DU by a similar *in vitro* approach and similar stimulation with autologous serum (407). Other teams have confirmed this point by using other methods to measured and quantified NETosis (115,394). We also previously observed that NETosis was higher at the early stages of the disease (115,394,407). Here, we confirm these results and unravel a part of the mechanisms involved in serum-driven SSc-NETosis, highlighting major differences with serum-driven healthy NETosis. The best-characterized types of NETosis are NADPH oxidase (Nox)-dependent and Nox-independent NETosis (254,288). Whereas neutrophils from controls were not inhibited by MitoTEMPO, those from SSc patients were significantly inhibited by MitoTEMPO, regarding on the capacity to generate NETs, signing a Nox-independent pathway occurring in SSc in both hypoxia and normoxia. Consistent with these results, we also evidenced that NETosis is associated with mitochondrial ROS in SSc and not in controls. Attributing an important role in Nox-independent NET formation to mitochondria has been recently evidenced (288). Indeed, mitochondria play a minimal role in ATP synthesis in neutrophils, but play two roles in NETosis. First, mitochondria can mediate ROS production, and second, mitochondrial DNA (mtDNA) can be released extracellularly. Mitochondrial ROS are produced through activation of the SK channel (288). This increase in mtROS production has been shown to be required for calcium ionophore that involves Nox-independent NET formation. This excess of mtROS has been evidenced in other auto-immune

diseases, such as SLE or ANCA-associated vasculitis (282,410). Interestingly, low-density granulocytes from SLE patients also required mtROS for NETosis (282). It is important to note, that even if neutrophils from SSc patients with vascular complication generated more NETs than those from other SSc patients in normoxia and hypoxia, NETosis was also decreased by MitoTEMPO without difference between neutrophils from other patients. This suggests that the pathway driving aberrant NETosis is common and Nox-independent in all SSc patients whatever their phenotype. By contrast, when neutrophils from controls were incubated in hypoxia with PKCi, they recovered the capacity to generate NETs (that was normally inhibited by hypoxia), suggesting that NETosis predominantly implicates a Nox-dependent process through PKC, in healthy neutrophils in accordance with the literature (288,411).

NETosis requires neutrophil activation. Therefore, resting neutrophils in noninflammatory conditions do not undergo NETosis. Our results suggest that neutrophils from SSc patients display a particular functional state and are primed to undergo NETosis. Up to now, little is known about neutrophils in SSc. It was evidenced that they expressed lower CD16 and CD62L and higher pSTAT3 and pSTAT6 compared to controls (214). Moreover the same team observed a reduced expression of two receptors of the chemoattractant CXCL8, that could impact their migration and phagocytosis (214). Indirect elements also suggest a sustained activation of neutrophils in SSc patients. Indeed, high levels of the proteins S100A8 and S100A9 (also called calprotectin), representing the main part of neutrophil cytosolic proteins and reflecting the activity of these cells, are found in SSc patients, especially in those with ILD (176,217,218,395). Moreover, by generating high levels of ROS, SSc neutrophils could display an auto amplification loop favoring their own activation (220,221). The exact mechanisms initiating neutrophil activation in SSc have to be solved. In a previous work, we evidenced that neutrophils from SSc patients were primed to enhance NETosis, as they were able to perform NETosis even after stimulation with healthy, non SSc serum. We also evidenced that incubation with autologous SSc serum exacerbated NETosis, suggesting that SSc specific serum factors enhance the process. Accordingly, previous works demonstrated that neutrophils in SSc are activated by mitochondrial peptides and platelet microparticles through HMGB1, leading to the mobilization of their granule content, an enhanced proteolytic activity, and a prolonged survival (114,219). Interestingly, Manfredi *et al.*, demonstrated that HMGB1 derived from platelets can activate neutrophil in SSc patients and promote NETosis (115). Nevertheless, various other stimuli could be involved that remain to be determined. Our work does not allow to unravel these points. In addition, SSc neutrophils could display intrinsic abnormalities that could alter

oxidative stress regulation and different pathways important for NETosis such as peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) or certain kinase cascades and transcription factor activation.

In healthy neutrophils, NETosis is abrogated in hypoxic environment (412). In this work we observed this property know for neutrophils. By contrast, hypoxia enhances NETosis in SSc neutrophils. NETosis is particularly upregulated in patients with active vascular complication (115,394,407). Due to visceral complications (repeated and severe Raynaud's phenomenon, DU-related critical ischemia, PAH), organs and cells of these patients are exposed to transient or chronic hypoxia (401,402). Our results suggest a direct effect of hypoxia on the level of NETs released by SSc neutrophils. Interestingly, Kortam *et al.*, demonstrated that patients with active DU generated more NETs than those with an history of DU but without activity at the time of the sample (394). This suggests that NETosis could vary according to local content in oxygen, and is amplified when acute tissular hypoxia occurs during digital ischemia or PAH. Hypoxia is implicated in the generation of oxidative stress by numerous kinds of cells including mtROS. In response to hypoxia, SSc fibroblasts and EC are known to express the potent angiogenic factor *vascular endothelial growth factor* (VEGF), that create an anarchic angiogenesis worsening the hypoxic microenvironment (402). Regarding neutrophils, hypoxia has been shown to trigger NETosis in various conditions, notably by inducing *hypoxia-inductible factor 1 α* (HIF1α) and HMGB1 pathways (397–399). HMGB1 released by activated platelets could trigger the formation of NETs through toll-like receptor 4 (TLR4)/p38 MAPK signaling pathway in neutrophils. The oxidative stress produced by the implication of the Nox-independent pathway is mostly generated by mitochondria, which is strongly impacted by hypoxia (288,413,414).

To date the role of NETs in the pathogenesis SSc is unknown. While NETs are beneficial during infections, they may play a detrimental role in the case of various inflammatory, vascular and fibrotic diseases and other pathophysiological conditions. In idiopathic PAH, NETs activate local proinflammatory and proangiogenic responses in pulmonary vascular endothelium via ROS–induced TLR4-mediated signaling (415). In SLE, mitochondrial ROS are involved in NETs generation, and the release of oxidized mtDNA stimulates type I interferon production (282). Interstingly, patients with SSc exhibit an interferon type I signature, and type I interferon could participate to the vasculopathy through the downregulation of friend leukemia integration 1 and vascular endothelial cadherin (180,187). The demonstration of excessive and pathogenic

NETosis in SSc could open new therapeutic opportunities for SSc patients. Molecules targeting NETosis have been recently developed. Anti-citrullinated histone antibodies has recently completed Phase I healthy volunteer clinical studies and is transitioning into the next stage of its clinical development with the initiation of Phase 2 proof-of-concept trials in patients with rheumatoid arthritis and healthy volunteers (387,389). mTOR may represent an alternative therapeutic way usefull to control NETosis in SSc patients since mTOR inhibitors are easily available drugs. Experiments are underway to adress this hypothesis. In SSc fibroblasts, the p38-MAPK and PI3K-AKT pathways are dysregulated, leading to an activation of the *mammalian target of rapamycin* (mTOR), thereby facilitating protein synthesis, cell migration, and proliferation (416,417). The inhibition of mTOR with rapamycin in mouse models of SSc prevents fibrosis. This pathway is also activated in kidneys of SSc patients undergoing SRC, suggesting a common activation of this pathway in vasculopathy and fibrosis (418,419). mTOR signaling is also found upregulated in SSc macrophages that expressed a specific transcriptomic signature, characterized by an upregulation of hypoxia and mTOR signaling, suggesting that all these dysregulated processes could be linked (420). We hypothesized that hypoxia, by enhancing kinase cascades required for Nox-independant NETosis (Akt, p38-MAPK, cSrc, PyK2), will also active mTOR in neutrophils.

We are aware that our work has limitations. The number of patients included is limited due to the need of freshly purified neutrophils since we directly reproduced NETosis *in vitro*. Nevertheless, despite this limited number we observed significant differences with control neutrophils. Some of our patients were treated with drugs that could have modulated the results since ERA, PDE5i, or epoprostenol have been shown to limit the generation of NETs (336,394,421). Nevertheless, despite these drugs we observed in the group of patients with active vascular complication a higher production of NETs in vitro both in normoxia and hypoxia. Regarding the inhibitors tested, we used the concentrations previously defined in the literature. We did not performed experiments by using simultaneously PKCi and MitoTEMPO and did not test mTOR inhibitor to date.

CONCLUSION

In this study we evidenced that neutrophils from SSc patients, especially those with active vascular complications display a distinctive functional state characterized by a basal production of mtROS and a high release of NETs through a Nox-independent pathway. Hypoxia exacerbates the pathological phenotype of SSc neutrophils by further increasing the mitochondrial generation of ROS and NETosis. The inhibition of mtROS partially inhibits NETosis of SSc neutrophils, whereas the inhibition of the classical Nox-dependent pathway has no effect.

Further studies are needed to determine the specific sequence of events involved in SSc NETosis, how hypoxia modulates the process, and the consequences of the release of high quantities of NETs regarding SSc pathogenesis.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de mon travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence via une technique d'imagerie quantitative originale que le phénomène de NETose était présent de manière excessive dans la ScS, et principalement chez les patients ayant des complications vasculaires actives comme l'HTAP ou les UD ischémiques, ainsi que chez les patients ayant une courte durée d'évolution de la maladie (407). Nous avons également mis en évidence qu'il n'existait pas de différence quant à la quantité de NETose générée selon le phénotype cutané (dcScS ou lcScS) ou encore selon le type d'auto-anticorps détecté.

Sur le plan mécanistique, notre travail, basé sur des stimulations par du sérum autologue, montre que des facteurs contenus dans le sérum de patients ScS jouent un rôle dans l'excès de NETose observé (407). Par ailleurs, nous avons montré que les neutrophiles de patients ScS avaient eux-mêmes une prédisposition à générer de grandes quantités de NETs *in vitro* par rapport que ceux de sujets sains. En accord avec cette dernière observation, nous avons mis en évidence que le phénomène de NETose dans la ScS était un processus Nox-indépendant impliquant la production de ROS mitochondriaux et que cette propriété des neutrophiles de ScS était exacerbée par en cas d'environnement l'hypoxique. De façon intéressante pour des fins thérapeutiques ultérieures, nous avons démontré que la voie d'induction du phénomène de NETose était identique chez les neutrophiles provenant de patients ScS avec ou sans complication vasculaire, avec cependant un effet accru de l'hypoxie sur l'induction de la NETose chez les patients avec une HTAP ou des UD actives.

Ce travail soulève de nouvelles questions quant à l'implication des NETs dans les différentes complications survenant au cours de la ScS, et leur impact cellulaire et immunologique dans la physiopathogénie de la maladie. De plus, si nos travaux identifient des pistes, les différents mécanismes impliqués dans cet excès de NETs doivent être mieux identifiés, notamment les acteurs moléculaires induits lors de l'hypoxie et les facteurs sériques impliqués. De plus, les mécanismes impliqués dans la clairance des NETs doivent également être analysés chez les patients atteints de sclérodermie.

1. IMPLICATION DES NETS DANS LES DIFFERENTES COMPLICATIONS DE LA SCS

Si d'autres équipes ont confirmé nos résultats sur l'excès de NETs chez les patients ScS souffrant d'HTAP ou d'UD via une quantification par technique ELISA des complexes

ADN/MPO, l'implication directe éventuelle des NETs dans le développement de ces complications demeure inconnue (115,394,407).

Des travaux montrent que les NETs pourraient participer aux lésions d'organes dans le LES ou les vascularites à ANCA. En effet, des NETs ont été mis en évidence au niveau de la peau lésée et au niveau rénal à proximité des lésions de glomérulopathie chez les patients lupiques, tout comme dans les biopsies de rein, de poumon ou de mastoïde de patients atteints de vascularite à ANCA (335,336,349,353,358,362,363). Dans l'HTAP idiopathique et l'hypertension pulmonaire post-embolique, les NETs ont la capacité de promouvoir la prolifération des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire en opérant une transformation phénotypique de ces dernières avec un relargage d'endothéline-1, aggravant ainsi le processus d'angiogenèse anarchique (415,422). De plus, les NETs sont directement mis en évidence au niveau des lésions thrombotiques intra-pulmonaires (415). De façon intéressante, l'administration de vésicules extracellulaires de neutrophiles (contenant notamment de la NE, impliquée dans la génération de NETs) à des souris induit une HTAP, suggérant un impact direct de ce matériel protéique et notamment de la NE dans le développement de l'HTAP dans ce modèle (423). Dans l'hypothèse d'un lien entre HTAP sclérodermique et NETs, il nous semble intéressant d'analyser des échantillons d'artères pulmonaires de patients ScS transplantés pulmonaires afin de mettre en évidence des NETs au niveau lésionnel.

Le rôle du phénomène de NETose dans le développement d'UD sclérodermique n'est pas établi. En revanche, son implication dans différentes situations d'ischémie critique, et surtout d'ischémie-reperfusion hors sclérodermie, est clairement établie (424). Dans le LES, le phénomène de Raynaud est un facteur indépendant associé à des concentrations élevées de NETs sériques (339). Dans les dermatomyosites, les patients ayant des ulcérations cutanées génèrent plus de NETs (369). De façon intéressante, Kortam *et al.*, ont mis en évidence que les patients ScS souffrant d'UD actives génèrent plus de NETs que ceux aux antécédents d'UD mais sans activité au moment du prélèvement (394). Ces données suggèrent que le phénomène de NETose peut être exacerbé lors d'un processus ischémique aigu, sans que pour le moment on ne puisse savoir s'il en est l'initiateur ou le reflet.

La CRS est une complication vasculaire redoutée de la ScS. Il s'agit d'une complication rare, associée à certains marqueurs cliniques et immunologiques. Dans nos travaux, peu de patients inclus avaient eu une CRS et aucun n'avait de CRS au moment de l'analyse fonctionnelle de NETose réalisée. A notre connaissance, aucune étude publiée sur la NETose

dans la ScS n'a inclus de patients avec une CRS active. La physiopathologie exacte de cette complication n'est pas connue mais associe une vasculopathie rénale, avec une hypoxie glomérulaire secondaire, entraînant une activation du système rénine-angiotensine ainsi qu'une augmentation d'expression des récepteurs de l'endothéline, favorisant la vasoconstriction et aboutissant à un tableau de microangiopathie thrombotique (26). Les analyses histologiques rénales révèlent des lésions endothéliales associées à la formation de thrombi, principalement dans les petits vaisseaux et de la fibrose adventitielle (26). Comme dit précédemment, le phénomène de NETose participe aux lésions glomérulaires visibles dans le LES et les vascularites à ANCA, via une dysfonction endothéliale (335,362,363). Par ailleurs, certaines lésions glomérulaires visibles dans le LES pourraient en partie dues aux NETs via HMGB1, également imputé dans la ScS comme pouvant induire la NETose (115,340). Dans le SAPL, les NETs semblent impliqués dans la formation des thrombi et des analyses transcriptomiques réalisées au niveau rénal suggèrent indirectement une possible induction de NETose *in situ* dans la néphropathie associée au SAPL se manifestant notamment par un tableau de microangiopathie thrombotique (337). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que le phénomène de NETose pourrait être impliqué dans la CRS, notamment par la formation de micro-thrombi pouvant aboutir au tableau de microangiopathie. Pour répondre à cette question, nous allons analyser des biopsies rénales de patients avec un diagnostic de CRS, afin de mettre en évidence des NETs au niveau lésionnel. De plus, nous analyserons en parallèle les reins issus de deux modèles murins reproduisant certaines caractéristiques de la maladie humaine : modèle par injection répétées d'acide hypochloreux (HOCl) dans lequel une vasculopathie rénale a été mise en évidence, et modèle de souris avec pompe continue de bléomycine dans lequel des NETs ont été identifiés au niveau de la peau lésée (215,230). Nous chercherons à mieux caractériser l'atteinte rénale dans ces deux modèles et à mettre en évidence des NETs in situ et dans le plasma. Ce projet sera réalisé par Laura Levasseur, que j'encadrerai dans le cadre d'un Master 2 dans l'unité en 2025-2026.

Plusieurs arguments suggèrent également une possible implication de la NETose dans la fibrose ScS. En effet, il existe chez les patients avec PID une alvéolite neutrophilique (211,212). De plus, dans un modèle murin de ScS (modèle par injections répétées de bléomycine), les NETs sont associés à une accumulation de macrophages polarisés M2 au niveau du derme lésionnel, favorisant la dysfonction fibroblastique (215). Chez l'homme, les macrophages M2 sont capables de recruter les neutrophiles au niveau des poumons chez les patients ScS atteints de PID (213). Des travaux menés dans d'autres contextes de pathologies

fibrosantes non liées à la ScS ouvrent des perspectives intéressantes. Des dépôts de NETs au niveau lésionnel pulmonaire ont été identifiés dans les PID associées aux myosites (371). Dans la fibrose pulmonaire idiopathique, marquée par un micro-environnement hypoxique aboutissant à l'accumulation de FRO localement, un défaut de migration des neutrophiles et une production locale de NETs semblent participer aux dégâts tissulaires (397). De ce fait, le phénomène de NETose pourrait également participer ou aggraver les lésions de fibrose au cours de la ScS.

2. IMPACTS CELLULAIRES ET IMMUNOLOGIQUES DES NETS DANS LA SCS

Comme dit précédemment de nombreux travaux suggèrent une implication possible des NETs dans la vasculopathie et la fibrose sclérodermique. Cependant, il n'y a pas de donnée actuellement publiée sur les interactions entre les NETs et les fibroblastes et les CE dans la ScS. Des données sont disponibles dans d'autres pathologies.

En effet, dans le LES, les NETs participent directement à la dysfonction endothéliale impliquée dans la glomérulopathie via REDD-1 (impliquant la voie HIF-1α), en promouvant une angiogenèse imparfaite (335,336). De plus, les NETs de patients lupiques sont décorés de *tissue factor* au potentiel prothrombotique (336). Dans l'HTAP idiopathique, la stimulation des CE par les NETs via TLR4 induit une expression accrue de NF-κB aboutissant à une production accrue d'ICAM-1 participant au recrutement des neutrophiles. Cette interaction entre CE et NETs est également associée à une augmentation de plusieurs médiateurs de prolifération et de migration endothéliale, notamment MMP9 (415). De plus, les cellules musculaires lisses pulmonaires en réponse au contact avec les NETs ont également une capacité de prolifération accrue, via une expression augmentée d'endothéline-1 (415). Dans la ScS l'interaction entre HMGB1 et les NETs pourrait participer à la dysfonction endothéliale, mais les effets induits sur les CE ne sont pas connus (114,115).

L'impact direct des NETs sur les fibroblastes dans la ScS n'a pas non plus été étudié spécifiquement. Nous avons montré, ainsi que deux autres équipes par des méthodes différentes que le phénomène de NETose est plus important au début de la pathologie chez les patients avec une forme diffuse ou une PID. Cela pourrait suggérer que le phénomène de NETose est impliqué dans l'induction de la fibrose mais pas dans son maintien (115,394,407). Dans les myopathies inflammatoires, les NETs sont directement impliqués dans l'excès de prolifération des fibroblastes à l'origine de la PID, via TLR9 (371). Dans le LES, les NETs potentialisent

l'effet fibrosant des fibroblastes de la peau, notamment via l'IL-17A (336). En dehors de tout contexte pathologique, les NETs ont la capacité d'accroitre la prolifération des fibroblastes *in vitro* et d'induire leur différenciation en myofibroblastes, augmentant ainsi leur capacité à synthétiser du collagène (425). De façon très intéressante, l'inactivation de PAD4, enzyme impliquée dans la NETose, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induit par instillation intratrachéale de bléomycine permet de prévenir la survenue de la fibrose pulmonaire (426). On rappellera que l'un des modèles murins de ScS est également basée sur l'administration de bléomycine, dans lequel des NETs ont été mis en évidence au niveau lésionnel (215). De plus, les NETs ont la capacité d'induire un changement phénotypique des CE en myofibroblastes, opérant ainsi un processus d'EndoMT (91,425). Ce processus a été mis en évidence à plusieurs reprises dans la peau fibrosé de patients ScS, et de façon plus importante que chez des sujets sains, suggérant que l'EndoMT participe en partie à la fibrose (90,92,93). Ali *et al.*, ont mis en évidence une corrélation positive significative entre le niveau de NETs et certains marqueurs d'EndoMT, mettant ainsi en évidence des arguments indirects en faveur d'une implication de la NETose dans le processus d'EndoMT dans la ScS (395). Cependant, il n'y a pas eu d'étude du changement phénotypique opéré et l'implication exacte des NETs dans le processus d'EndoMT demeure inconnu.

Ainsi, nous souhaitons étudier l'effet direct des NETs générés en hypoxie sur les CE et les fibroblastes humains. Ce projet a été financé par une bourse de l'Association des Sclérodermiques de France et de la Société de Recherche en Dermatologie et sera réalisé par un doctorant à partir de septembre 2025. Des CE microvasculaires dermiques humaines (HDMEC) et des lignées de fibroblastes (*Normal Human Dermal Fibroblasts*) seront stimulées par des NETs de patients ScS. Nous étudierons ainsi l'effet des NETs sur l'apoptose des CE (via une analyse de cellules vivantes Incucyte® avec marquage caspase-3/7 et Annexin V), sur la perméabilité vasculaire (via un test de perméabilité vasculaire in vitro, ainsi que via l'expression de molécules de jonction des CE telles que VE-cadhérine et ZO-1), ainsi que sur la régulation du tonus vasculaire (via l'expression d'endothéline-1 et du NO). Nous évaluerons la prolifération cellulaire, la production de collagène (via une détection colorimétrique du collagène soluble) ainsi que leur potentiel différenciation en myofibroblaste (via l'expression d'α-SMA). L'expression par les CE de marqueurs à la fois endothéliaux (CD31, VE-cadhérine, vWF) et mésenchymateux (α-SMA, FSP, Vimentine) seront également étudiés.

Les NETs pourraient également être impliqués dans la rupture de tolérance vis-à-vis d'antigènes nucléaires ou cytoplasmiques. En effet, la quasi-totalité des patients ont des auto-Ac détectables dans leur sérum ayant des cibles antigéniques nucléaires, avec la particularité d'être mutuellement exclusifs, présents plusieurs années avant les premiers symptômes, et associés à un phénotype clinique qui leur est propre (24,30,31). Cependant, il existe jusqu'à maintenant peu d'arguments en faveur d'un rôle pathogène de ces auto-Ac (140). Certains antigènes, éventuellement oxydés pourraient être exposés à la surface des NETs et être présentés aux lymphocytes T favorisant une réponse immunitaire T dépendante contre ces néoantigènes. Dans le LES, la PR et les vascularites à ANCA, il a été clairement démontré que le phénomène de NETose participait à la rupture de tolérance vis-à-vis d'autoantigènes (335,350,380,381). De plus, certains des auto-Ac décrits dans ces pathologies ont également la faculté d'activer les neutrophiles et d'induire la génération de NETs, formant ainsi une boucle d'auto-amplification, pouvant aggraver les dégâts tissulaires, dans la mesure où certains de ces auto-Ac sont décrits comme pathogènes (349,375,378). Ainsi, pour répondre à cette question, nous pourrions bloquer le processus de NETose, via notamment des inhibiteurs de PAD4 inhibant la NETose NOX-indépendante, dans le modèle murin HOCl connu pour développer des Ac anti-topoisomérase I (230). Si le phénomène de NETose est la clé de la rupture de tolérance dans la ScS, ils ne devraient plus être mis en évidence. Nous envisageons également d'analyser la composition des NETs produits par les NEUTROPHILES de patients ScS de différents phénotypes, en particulier la présence de protéines topoisomérase et CENP A et B.

3. MECANISMES IMPLIQUES DANS L'ACCUMULATION DE NETS DANS LA SCS

Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués dans l'excès de NETose constaté dans la ScS. Nous sommes conscients que notre travail ne les a pas précisément identifiés. Nous avons démontré que le neutrophiles de sujet ScS était prédisposé à générer des NETs de façon accrue, notamment via une activation de la voie Nox-indépendante et une production de ROS mitochondriaux. La capacité des neutrophiles de ScS à promouvoir un environnement oxydatif est connu de longue date, cependant d'autres facteurs propres aux neutrophiles pourraient être impliqués (221). En effet, il existe au sein d'autres maladies auto-immunes, notamment chez les patients atteints de LES une sous-population de neutrophiles, *low density granulocytes* (LDG), qui se distingue par sa capacité élevée à produire des NETs (335,356,365). De plus, il existe également une polarisation des neutrophiles, influencée par le stress oxydatif environnant et l'environnement cytokinique, à l'instar des lymphocytes (427). Les neutrophiles polarisés

N1 ont une capacité accrue à générer du stress oxydatif, ainsi qu'une grande quantité de NETs (427). Etant donné les anomalies mises en évidence concernant les neutrophiles dans la ScS, il est possible qu'il existe dans la ScS une polarisation préférentiellement N1 des neutrophiles et une augmentation du nombre de LDG. A notre connaissance, ces éléments n'ont pas encore été étudiés dans la ScS.

En dehors du neutrophile, nous avons également montré que le sérum de patients atteints de ScS était capable d'induire une production accrue de NETs sur des neutrophiles contrôles par rapport à du sérum de sujet sain (407). Comme dit précédemment, les microparticules plaquettaires HMGB1+ ont été identifiées comme facteur déclenchant de la NETose dans la ScS (115). Notre protocole impliquait l'utilisation de sérum ne permettant pas l'étude de l'implication des plaquettes et probablement des microparticules plaquettaires. Cependant, nous avons pu mettre en évidence que le sérum de ScS était à même de générer plus de NETs que celui de sujets sains, ce qui suggère qu'il existe également des facteurs sériques impliqués dans cet excès de NETs, indépendamment des microparticules plaquettaires. Nous n'avons pas du tout travaillé sur l'identification des facteurs sériques impliqués dans le travail que nous vous présentons. Dans la littérature, plusieurs cytokines ont été décrites comme inductrices de NETose, notamment l'IL-17 et IL-6, dont les concentrations sont élevées dans la ScS (428,429). Il existe également dans la ScS des niveaux élevés d'IFN via plusieurs mécanismes associant entre autre, une synthèse accrue d'IFN- α via TLR9, ou encore plusieurs polymorphismes aboutissant à une dérégulation de la voie de l'IFN (175,189). De façon intéressante, un lien entre IFN et NETose a été identifié dans le LES (429). Dans le LES, les niveaux élevés de NETs activent les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp), aboutissant à la production d' IFN-α via TLR9, qui lui-même peut favoriser la NETose (429). De plus, les NETs de neutrophiles d'un modèle murin de lupus sont recouverts d'ADN mitochondrial oxydé ayant la faculté d'induire une réponse IFN-I, à l'instar des LDG des patients lupiques (282). Des résultats similaires ont été mis en évidence dans la maladie de Still de l'adulte et le syndrome de Gougerot-Sjögren, dans lesquels l'IFN-α a la capacité d'induire la génération de NETs recouverts d'ADN mitochondrial (430,431). Ainsi, le phénomène de NETose, l'IFN-I et le stress oxydatif mitochondrial semblent être étroitement liés.

Nous avons montré que les FRO mitochondriaux étaient impliqués dans la NETose associés à la ScS. De façon intéressante, la production d'IFN par le stress oxydatif environnant au niveau des fibroblastes de patients ScS induit des modifications au niveau de l'ADN

mitochondrial, leur conférant un phénotype profibrosant (232,432). Par ailleurs, les concentrations plasmatiques d'ADN mitochondrial sont corrélés à l'activation de TLR9, ainsi qu'à la production d'IFN-I, renforçant l'idée d'un lien étroit entre IFN et stress mitochondrial dans la ScS (433). De l'ADN mitochondrial a été mis en évidence dans des vésicules extracellulaires dans la ScS, comme cela est également décrit dans certains cas de NETose impliquant la voie Nox-indépendante (301,433). Il a été démontré dans la ScS, que les FRO mitochondriaux induisent la production de CXCL4, impliqué dans la production d'IFN, via TLR9, en milieu hypoxique (175,434). Ces données viennent corroborer nos résultats, identifiant une majoration du phénomène de NETose via le stress oxydatif mitochondrial sous l'effet de l'hypoxie. Ainsi, l'hypoxie semble jouer un rôle clé dans la génération de NETs, notamment via l'activation des mitochondries et la création d'un environnement oxydatif. En réponse à l'hypoxie, les fibroblastes et les CE synthétisent du VEGF, créant ainsi une angiogenèse anarchique ayant pour conséquence d'aggravant l'environnement hypoxique (402). Dans l'HTAP idiopathique, l'hypoxie induit la génération de NETs via la génération de stress oxydatif à travers les voies d'HIF-1α et d'HMGB1 (397–399). De façon intéressante, Manfredi *et al*., ont mis en évidence que les neutrophiles de patients ScS étaient activés via les microparticules plaquettaires exprimant HMGB1 (115). Une de nos hypothèses est donc que HMGB1, libéré par les plaquettes activées, pourrait se lier TLR4, induire la production de FRO mitochondriaux à travers la voie p38-MAPK, aboutissant à la production d'IFN-I, et à une activation de la voie mTOR. Ces voies excessivement activées participeraient à la dérégulation de la NETose et une génération accrue de NETs. Un environnement hypoxique accroit le phénomène.

La voie p38-MAPK et PI3K-AKT a été montrée comme en permanence activée dans les fibroblastes ScS, aboutissant à une activation de mTOR, facilitant ainsi la synthèse protéique, la migration et la prolifération cellulaire (416,417). L'inhibition de mTOR par la Rapamycine dans le modèle murin par injections répétées de bléomycine prévient la fibrose (418). La voie mTOR est également activée chez les patients souffrant de CRS, suggérant un lien direct entre vasculopathie et fibrose via l'activation de mTOR (418,419). Il a été montré en utilisant des neutrophiles primaires de sujets sains et des cellules myéloides dérivées *in vitro* en neutrophiles que mTOR était impliqué dans la régulation de la NETose en raison de sa capacité à inhiber HIF-1α (412). A notre connaissance, une seule étude a été publiée sur l'inhibition de la voie mTOR dans la ScS. La Rapamycine a été testée versus Methotrexate chez un petit nombre de patients (9 dans chaque groupe) avec une analyse du score de Rodnan, sans montrer de différence entre les deux groupes mais il est difficile d'en tirer des conclusions (435).

La clairance des NETs est principalement dépendante des macrophages et des désoxyribonucléases (DNases) extracellulaires (316). Les macrophages phagocytent les NETs via un processus actif facilité par la DNase I et l'opsonisation des NETs (316). Cette dégradation des NETs par les macrophages semble par ailleurs différente selon la polarisation de ces derniers et notamment être plus importante pour les macrophages pro-inflammatoires (317). Les DNases régulent strictement la disponibilité et la qualité des ADNs endogènes afin de contrôler leur potentiel immunostimulant. L'accumulation de NETs dans le LES, les myopathies inflammatoires ou encore les vascularites à ANCA est lié à un excès de production mais également un défaut de clairance (321,356,370). En effet, il existe dans le LES et les myopathies inflammatoires, une diminution d'activité de la DNase I, ainsi qu'un défaut d'élimination par les macrophages dans le LES (321,370). De façon intéressante, des anomalies de clairance de l'ADN existent également chez les patients ScS. En effet, il existe dans la ScS un défaut d'efferocytose, et un défaut fonctionnel d'endonucléases, notamment de la DNASE1L3 (10–15,194,195). Comme dit précédemment, certains patients atteints de ScS présentent une mutation sur le gène codant pour la DNASE1L3 qui semble réduire la sécrétion de la DNASE1L3 mais aussi altérer sa stabilité structurelle, ce qui au final réduit son activité catalytique (10–14). En accord avec ces observations, il a été récemment montré que les patients ScS porteurs de ce polymorphisme présentent une diminution de l'activité circulante DNASE1L3 (15). Cette diminution d'activité de la DNASE1L3 est accompagnée d'une réduction de la fragmentation des ADNs génomiques circulants et donc d'une accumulation des grands fragments d'ADN chez ces patients ScS (15). L'effet de ce polymorphisme sur l'accumulation de NETs n'a pas été étudié.

4. VERS DE NOUVELLES OPPORTUNITES THERAPEUTIQUES DANS LA SCS

Ce travail ouvre de nouvelles opportunités thérapeutiques, si l'implication des NETs dans la physiopathogénie de la ScS est démontrée, notamment dans les atteintes vasculaires.

Les pistes thérapeutiques pourraient être :

- Cibler spécifiquement la formation de NETs : un anticorps thérapeutique ciblant les protéines histones citrullinées nécessaires à la NETose est en cours d'évaluation dans la polyarthrite rhumatoïde (387,389).
- Cibler la voie mTOR puisque des médicaments sont déjà disponibles et utilisés dans d'autres situations.

CONCLUSION

Nous avons démontré par des études fonctionnelles quantitatives que les neutrophiles de patients ScS, étaient prédisposés à la NETose, après incubation avec du sérum autologue. Ces caractéristiques sont communes à tous les patients mais significativement plus marquées chez les patients ayant des complications vasculaires actives comme l'HTAP ou les UD ischémiques, ainsi que chez les patients ayant une courte durée d'évolution de la maladie, suggérant que la génération de NETs pourrait être impliquée dans la vasculopathie et l'induction du processus de fibrose mais pas dans son maintien. Par ailleurs, nous avons montré que la production de NETs en grande quantité résultait d'une synergie entre le niveau basal d'activation des neutrophiles et des facteurs sériques qui restent à identifier.

Nos travaux dévoilent quelques pistes mécanistiques : La NETose associée à la sclérodermie est un processus Nox-indépendant, dépendant du stress oxydatif mitochondrial, et est exacerbé par l'hypoxie. De façon intéressante à des fins thérapeutiques, nous avons pu démontrer que la voie d'induction du phénomène de NETose était identique chez les neutrophiles provenant de patients ScS avec ou sans complication vasculaire, avec cependant un effet accru de l'hypoxie sur les neutrophiles de patients avec une HTAP ou des UD actives.

Ce travail ouvre de nouvelles voies de recherche, avec comme priorité l'analyse des potentiels effets délétères des NETs dans la pathogénie de la maladie et notamment la dysfonction endothéliale. Ces éléments sont en effet un prérequis indispensable avant d'envisager de cibler éventuellement la NETose d'un point de vue thérapeutique dans cette pathologie.

ANNEXES

Durant mon parcours, j'ai été amené à réaliser d'autres projets portant sur la ScS, ou des pathologies sclérosantes proches, ayant permis la publication de plusieurs travaux.

Vous trouverez ci-dessous l'ensemble de ces travaux par ordre chronologique descendant :

1. **Didier K**, Sobanski V, Robbins A, Truchetet ME, Barnetche T, Contin-Bordes C, Hot A, Fort R, Guilpain P, Maria A, Agard C, Pennaforte JL, Viguier M, Martin T, Jolly D, Barbe C, Giusti D, Launay D, Servettaz A. Impact of autoantibody status on stratifying the risk of organ involvement and mortality in SSc: experience from a multicentre French cohort of 1605 patients. **RMD Open**. 2024;10(4):e004580
2. Knapp S, Bolko L, Servettaz A, **Didier K**. [Eosinophilic fasciitis: From pathophysiology to therapeutics]. **Rev Med Interne**. 2024;45(8):488-497.
3. **Didier K**, Robbins A, Antonicelli F, Pham BN, Giusti D, Servettaz A. [Updates in systemic sclerosis pathogenesis: Toward new therapeutic opportunities]. Rev Med Interne. 2019;40(10):654-663.
4. **Didier K**, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F, Servettaz A. Autoantibodies Associated With Connective Tissue Diseases: What Meaning for Clinicians? **Front Immunol**. 2018;9:541

RMD Open
Rheumatic & Musculoskeletal Diseases

ORIGINAL RESEARCH

Impact of autoantibody status on stratifying the risk of organ involvement and mortality in SSc: experience from a multicentre French cohort of 1605 patients

Kevin Didier ,[1,2] Vincent Sobanski ,[3,4] Ailsa Robbins ,[1,2] Marie-Elise Truchetet ,[5] Thomas Barnetche ,[5] Cécile Contin-Bordes ,[6,7] Arnaud Hot,[8] Romain Fort,[8] Philippe Guilpain,[9] Alexandre Maria,[9] Christian Agard,[10] Jean-Loup Pennaforte,[11] Manuelle Viguier,[12,2] Thierry Martin,[13] Damien Jolly,[14] Coralie Barbe,[15] Delphine Giusti,[16,2] David Launay,[3,17] Amélie Servettaz[1,2]

To cite: Didier K, Sobanski V, Robbins A, *et al*. Impact of autoantibody status on stratifying the risk of organ involvement and mortality in SSc: experience from a multicentre French cohort of 1605 patients. *RMD Open* 2024;**10**:e004580. doi:10.1136/rmdopen-2024-004580

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (https://doi.org/10.1136/rmdopen-2024-004580).

Received 27 May 2024
Accepted 15 October 2024

Check for updates

© Author(s) (or their employer(s)) 2024. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Dr Kevin Didier;
kdidier@chu-reims.fr

ABSTRACT

Introduction Systemic sclerosis (SSc) is a rare autoimmune disease currently classified into two subgroups based on skin extension. The aim of this study was to determine in a large cohort whether the determination of autoantibody (AAb) profile among a full antinuclear AAbs panel including nine specificities had a higher impact than skin phenotype on stratifying the risk of organ involvement and mortality in SSc.

Methods Data for patients with SSc followed in seven French university hospitals were retrospectively analysed in terms of skin phenotype, AAbs (anti-topoisomerase I (ATA), anticentromere (ACA), anti-RNA polymerase III (anti-RNAPIII), anti-U1RNP, anti-U3RNP, anti-Pm/Scl, anti-Ku, anti-Th/To, anti-NOR90), organ involvement and mortality. Multivariate analyses were performed to identify independent factors associated with organ involvement and mortality.

Results We included 1605 patients with SSc (367 with diffuse cutaneous SSc). On multivariate analysis, ATAs were associated with interstitial lung disease and mortality (OR=3.27 (95% CI 2.42 to 4.42); HR=1.9 (95% CI 1.01 to 3.58)), anti-RNAPIII with scleroderma renal crisis and mortality (OR=7.05 (95% CI 2.98 to 16.72); HR=2.35 (95% CI 1.12 to 4.93)), anti-U1RNP with arthritis (OR=3.79 (95% CI 2.16 to 6.67)), anti-Pm/Scl and anti-Ku with myositis (OR=7.09 (95% CI 3.87 to 12.98) and 7.99 (95% CI 2.41 to 26.46)). The skin phenotype was not associated with survival or organ involvement on multivariate analysis without stepwise selection.

Conclusion This study unravels, by contrast with skin phenotype, a strong association between AAbs specificities, organ involvement and outcome in SSc and suggests that patients' classification based on only skin extension is not sufficient for defining prognosis and phenotype.

WHAT IS ALREADY KNOWN ON THIS TOPIC

⇒ Historically, classification of systemic sclerosis (SSc), based on skin phenotype (diffuse or limited cutaneous SSc), has been used to predict prognosis but with a lack of precision, leading to growing interest in the weight of autoantibodies (AAbs) status.

WHAT THIS STUDY ADDS

⇒ Our study highlighted strong independent associations between each AAb and internal organ involvement in this disease. By contrast, the skin phenotype was not an independent factor associated with organ involvement and mortality in SSc.

HOW THIS STUDY MIGHT AFFECT RESEARCH, PRACTICE OR POLICY

⇒ Our results suggests that patients' classification based on only skin extension is not sufficient for defining prognosis and phenotype. Consequently, the systematic and accurate determination of antinuclear AAb specificities at diagnosis could help clinicians to better stratify the individual risk of developing SSc complications and personalise monitoring.

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a rare connective tissue disease characterised by skin and internal organ fibrosis, vasculopathy and autoimmunity. Despite recent improvements in understanding its pathogenesis, which offers new therapeutic opportunities, the mortality rate remains high in a lot of patients, with no existing curative treatment.[1 2] Several organs can be damaged during the disease course and lead to life-threatening involvements such as

interstitial lung disease (ILD), pulmonary arterial hypertension (PAH) and scleroderma renal crisis (SRC).[2 3] The frequency of such complications varies highly among patients with SSc and is difficult to predict individually. Patients are classified as having diffuse cutaneous SSc (dcSSc) or limited cutaneous SSc (lcSSc) depending on the extent of skin fibrosis.[4] Usually, patients with dcSSc are more likely to develop ILD and SRC, whereas PAH is commonly associated with lcSSc.[5] The mortality rate differs depending on the skin phenotype, with a higher rate in dcSSc than lcSSc.[2 3] Nevertheless, prediction of organ involvement and prognosis based on only skin phenotype is insufficient because ILD is also observed in patients with lcSSc and PAH can occur in patients with dcSSc.[6–9] Moreover, skin fibrosis does not develop in some patients. Consequently, additional and early markers are needed to better stratify the individual risk of severe complications and to personalise the screening of organ involvement and disease management.

A main feature that characterises the SSc pathogenesis is the breach of self-tolerance towards various nuclear antigens.[5] Antinuclear antibodies (ANA) represent a heterogeneous family of autoantibodies (AAbs) whose antigen targets are not yet fully determined. SSc AAbs display some remarkable features including early appearance (generally before clinical symptoms[10]), and mutual exclusion (only a single specific nuclear AAb is found in the serum of each patient with SSc, except in rare cases[11]). Besides the three well-known AAbs—antitopoisomerase I antibody (ATA), also called anti-Scl70, anticentromere antibody (ACA) and anti-RNA polymerase III AAbs (anti-RNAPIII)—a dozen of identified AAbs are associated with SSc.[12]

Most previous studies examining only three AAbs (ATA, ACA, anti-RNAPIII) in large cohorts reported associations between AAb subtype, SSc phenotype and prognosis.[5 6] Thus, ATA was found associated with dcSSc and ILD, ACA with lcSSc and anti-RNAPIII antibody with dcSSc and SRC.[13] Three years ago, an innovative study focused on the effect of five AAbs on the timing of organ complication development and disease prognosis in a large but single-centre cohort of patients with SSc and highlighted significant associations between AAb subtype and cumulative incidence of organ complications.[14] Taken together, the five analysed AAbs (ATA, ACA, anti-RNAPIII, anti-U3RNP, anti-Pm/Scl AAbs) are found in 50%–80% of patients with SSc. Consequently, studies including a larger panel of SSc-associated AAbs are needed.

Techniques to test patients' sera for nine SSc-associated AAbs are now available in several centres. This development raises opportunities for clinicians to more accurately determine AAb specificities in patients with SSc. Thus, we conducted a multicentre study to analyse the associations between organ complication development, outcome and nine SSc-associated AAbs (ATA, ACA, anti-RNAPIII, anti-U1RNP, anti-U3RNP, anti-Pm/Scl, anti-Ku, anti-Th/To, anti-NOR90 antibodies). We hypothesised that a precise and early AAb identification in each patient could help to better and early stratify the individual risk of organ involvement and mortality.

PATIENTS AND METHODS

Study design and population

We included patients with SSc over age 18, at the time of the inclusion, who were followed up to 2019 in seven French university hospital centres and fulfilled the inclusion criteria and no exclusion criteria as detailed below.[15] SSc diagnosis has been made clinically, but for inclusion, patients had to fulfil the ACR/EULAR classification criteria. Patients with antisynthetase syndrome, or other diseases that may mimic SSc complications were excluded. Patients who were lost to follow-up for more than 3 years were included only if they were screened again for internal organ involvement after resumption of medical follow-up. Eligible patients had to have heart sonography, a pulmonary function test and at least one high-resolution CT (HRCT) scan during follow-up, either annually or more frequently. We excluded all patients without any follow-up within the last 3 years before the beginning of the study. In each of the selected centres, a patient register was available with filling procedures and consensual definitions of organ complications. A clinical report form (CRF) has been set up for this study. The CRF was completed using centre registers and patient medical files by the same person (KD) in all centres. The following data were collected: age at disease onset (defined as the age at which the first non-Raynaud's phenomenon symptom appeared), disease duration, sex, skin phenotype, organ involvement during follow-up (PAH, ILD, SRC, digital ulcer (DU), arthritis, myositis, intestinal pseudo-obstruction (IPO)), presence (or absence) of ANA and the specific AAb (ATA, ACA, anti-RNAPIII, anti-U1RNP, anti-U3RNP, anti-Pm/Scl, anti-Ku, anti-Th/To, anti-NOR90) or none of these nine AAbs.

Patients were classified as having dcSSc or lcSSc according to the LeRoy and Medsger classification.[4] Patients with SSc *sine scleroderma* were classified as having lcSSc. ILD was defined as the presence of at least one usual sign of SSc-associated ILD on HRCT, defined by the identification of fibrotic features on chest HRCT generally most pronounced in the lung bases (commonly non-specific interstitial pneumonia[16]). PAH was diagnosed based on right-heart catheterisation according to diagnostic criteria at the time of inclusion (mean pulmonary arterial pressure ≥25 mm Hg and pulmonary capillary wedge pressure ≤15 mm Hg in a patient with no ILD or ILD with forced vital capacity % predicted ≥70% and extent of ILD on HRCT ≤20%). SRC was defined as the abrupt onset of severe hypertension and/or decline in renal function, with proteinuria but without an alternative aetiology and/or microangiopathy visualised on a renal biopsy. Myositis was diagnosed with muscle weakness associated with increased creatine phosphokinase level or abnormal findings on electromyography, muscle

MRI or muscle biopsy. Arthritis was defined as inflammatory pain and/or the presence of synovitis. IPO was defined as a clinical and/or radiological appearance of intestinal obstruction without a clearly defined ischaemic, mechanical or postsurgical cause. All deaths (related or not to SSc) during follow-up were collected.

Ethical considerations

The database was constituted in accordance with the reference methodology MR004 of the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (no. 2206749, 13 September 2018). As such, non-opposition was obtained from each patient included in the study for the use of their deidentified medical record data, and data management complied with current French legislation governing nominative personal data, the General Data Protection Regulation of the European Union and the French legislation pertaining to informatics and liberties of 6 January 1978 and its modification in 2018.

Laboratory testing

At least one serum sample from each patient was analysed for AAbs in the referral centre for the patient. A first screening test was performed to detect ANA on HEp-2 cells by indirect immunofluorescence: titers of at least 1:160 or 1:200 dilution (according to the laboratory) were considered positive. The search for AAb targets was driven by the ANA's fluorescence pattern: ATA as homogeneous and nucleolar or speckled, ACA as discrete-coarse speckled, anti-RNAPIII as speckled and/or nucleolar, anti-U1RNP and anti-Ku as speckled, anti-U3RNP, anti-Pm/Scl, anti-Th/To and anti-NOR90 as nucleolar.[17] ATA, ACA, anti-RNAPIII, anti-U1RNP, anti-U3RNP, anti-Pm/Scl and anti-Ku were tested in all serum samples in all centres. Anti-Th/To and anti-NOR90 were tested in all serum samples in four and three centres, respectively.

The following methods were used to detect the AAb specificity, according to the laboratory and the AAb subtype: chemiluminescent method (Theradiag-Fidis, BioFlash apparatus or BioPlex 2200 ANA Screen), ELIA (Elia symphony on Phadia250), line-dot immunoassay (SCL10DIV-24, D-Tek or SCL12D-24, D-Tek or ANA10D-IV-24, D-Tek or DL 1532–1601 G, EuroImmun or DL 1530-1601-4 G, EuroImmun or AD-SPS12D, Eurobio) or ELISA (704555 QUANTA Lite RNA Pol III).

Statistical analysis

Categorical variables are described with number (percentage), and quantitative variables with mean and SD. Factors associated with dcSSc and lcSSc were studied by univariate analysis (Student's t-test, Wilcoxon test, χ^2 test or Fisher exact test, as appropriate). Factors associated with the presence of each defined complication were studied by univariate analysis (Student's t-test, Wilcoxon test, χ^2 test or Fisher exact test, as appropriate) and multivariate analysis (logistic regression without stepwise selection, with all factors significant at p≤0.10 included). Survival curves were established with the Kaplan-Meier method with data censored after 20 years of follow-up. Patients producing several specific AAbs were excluded from analysis to avoid some bias. Variables associated with global survival were identified by univariate analysis (Log-rank test) and multivariate analysis (Cox proportional-hazard model without stepwise selection, with all factors significant at p≤0.10 included). ORs, HRs and 95% CIs were estimated. P<0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed with SAS V.9.4 (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA).

RESULTS

Clinical and immunological features of the SSc cohort

The clinical and biological characteristics of the 1605 patients with SSc included are summarised in table 1: 1299 (80.9%) were female and the mean (SD) age at diagnosis was 52 (15.2) years. Twenty (1.2%) patients were diagnosed before 18-years-old. Patients were followed for a mean of 10 (8.2) years. Among the 1605 patients, 275 (17.1%) patients presented with overlap syndrome (table 1).

During follow-up, 553 (34.5%) patients developed ILD, 142 (8.9%) patients PAH, 60 (3.7%) patients experienced SRC, 574 (35.8%) DU, 349 (21.7%) arthritis, 129 (8.0%) myositis and 14 (0.9%) IPO (table 1). Death occurred in 110 patients (6.9%, the overall survival curve of the population is available in online supplemental figure 1).

A total of 1572 (97.9%) sera were positive for ANA. Among them, 1403 (89.2%) contained at least one from the nine AAbs tested. Most patients' sera contained only one SSc-related AAb subtype, but 32 (1.9%) had AAbs directed against several tested antigens (figure 1). The description of the patients displaying more than one specific AAb is summarised in online supplemental table 1).

Among this cohort, 367 (22.9%) patients had dcSSc and 1238 (77.1%) lcSSc. The patients with lcSSc were more often women (85.0% vs 67.3% for dcSSc, p<0.0001) and older at diagnosis (mean age 52.7 (15.0) and 49.7 (15.5) years old, p=0.0009) than patients with dcSSc (table 1). More patients with dcSSc than lcSSc experienced ILD (56.4% vs 28%, p<0.0001), SRC (10.6% vs 1.7%, p<0.0001), DU (49.3% vs 31.8%, p<0.0001), arthritis (26.7% vs 20.3%, p=0.009) and IPO (1.9% vs 0.6%, p=0.02). The two groups did not differ in the occurrence of PAH (p=0.47) or myositis (p=0.33). Overall, the mortality was higher in patients with dcSSc with 9.3% of patients with dcSSc dying (from any causes) during follow-up as compared with 6.1% patients with lcSSc (p=0.001) (figure 2A). More patients with dcSSc than lcSSc had ATA (51.2% vs 14.3%, p<0.0001), anti-RNAPIII (17.4% vs 2.8%, p<0.0001) or anti-U3RNP (4.9% vs 1.9%, p=0.001). More patients with lcSSc than dcSSc had ACAs (61.6% vs 7.4%, p<0.0001) or anti-U1RNP (4.6% vs 2.2%, p=0.04). The two groups did not differ in terms of the prevalence of anti-Pm/Scl (p=0.15), anti-Ku (p=0.32), anti-Th/To (p=0.22) or anti-NOR90 (p=0.49) AAbs.

Table 1 Main features of the SSc population

	Total (n=1605)	dcSSc (n=367)	lcSSc (n=1238)	P value
General features				
Female, n (%)	1299 (80.9)	247 (67.3)	1052 (85.0)	<0.0001
Age at diagnosis, years, mean (SD)	52.0 (15.2)	49.7 (15.5)	52.7 (15.0)	0.0009
≤16-years-old at diagnosis, n (%)	14 (0.9)	3 (0.8)	11 (0.9)	0.9999
Disease duration, years, mean (SD)	10.0 (8.2)	8.2 (7.2)	10.5 (8.4)	<0.0001
Death, n (%)	110 (6.9)	34 (9.3)	76 (6.1)	0.0001
Organ involvement, n (%)				
PAH	142 (8.9)	29 (7.9)	113 (9.1)	0.47
ILD	553 (34.5)	207 (56.4)	346 (28.0)	<0.0001
SRC	60 (3.7)	39 (10.6)	21 (1.7)	<0.0001
Digital ulcer	574 (35.8)	181 (49.3)	393 (31.7)	<0.0001
Arthritis	349 (21.7)	98 (26.7)	251 (20.3)	0.009
Myositis	129 (8.0)	34 (9.3)	95 (7.7)	0.33
IPO	14 (0.9)	7 (1.9)	7 (0.6)	0.02
Overlap diseases, n (%)				
All overlap diseases	275 (17.1)	33 (9.0)	242 (19.6)	<0.0001
Systemic lupus	36 (2.2)	3 (0.8)	33 (2.7)	0.04
Sjögren syndrome	136 (8.5)	19 (5.2)	117 (9.5)	0.01
Rheumatoid arthritis	38 (2.4)	7 (1.9)	31 (2.5)	0.70
Autoimmune myositis	18 (1.1)	3 (0.8)	15 (1.2)	0.78
Primary biliary cholangitis	38 (2.4)	0 (0)	38 (3.1)	<0.0001
ANCA-vasculitis	4 (0.3)	0 (0)	4 (0.3)	0.58
SSc-related AAbs, n (%)				
AAN	1572 (97.9)	361 (98.4)	1211 (97.8)	0.46
At least one AAb specificity identified	1403 (89.2)	309 (85.6)	1094 (90.3)	0.02
ATA	365 (22.7)	188 (51.2)	177 (14.3)	<0.0001
ACA	789 (49.2)	27 (7.4)	762 (61.6)	<0.0001
Anti-RNAPIII	98 (6.1)	64 (17.4)	34 (2.8)	<0.0001
Anti-U1RNP	65 (4.1)	8 (2.2)	57 (4.6)	0.04
Anti-U3RNP	41 (2.6)	18 (4.9)	23 (1.9)	0.001
Anti-Pm/Scl	55 (3.4)	17 (4.6)	38 (3.1)	0.15
Anti-Ku	12 (0.8)	1 (0.3)	11 (0.9)	0.32
Anti-Th/To*	9 (0.9)	0 (0.0)	9 (1.1)	0.22
Anti-NOR90*	3 (0.4)	1 (0.6)	2 (0.3)	0.49

*Data concerning anti-Th/To AAb and anti-NOR90 AAbs were available for 1014 and 864 patients respectively.
AAb, autoantibody; AAN, antinuclear antibody; ACA, anticentromere antibody; Anti-RNAPIII, anti RNA polymerase III antibody; ATA, anti-topoisomerase I antibody; dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis; ILD, interstitial lung disease; IPO, intestinal pseudo-obstruction; lcSSc, limited systemic sclerosis; PAH, pulmonary arterial hypertension; SRC, scleroderma renal crisis; SSc, systemic sclerosis.

Among the 1238 patients with lcSSc, 74 were classified as *sine scleroderma* with median disease duration of 6.8 years (SD 3.6 years). None of them have been previously classified as dcSSc. We found no statistical difference between patients sine scleroderma compared with lcSSc concerning complications, except for the occurrence of DUs (respectively 20.3% and 32.5%, p=0.03). Among these 74 patients, 8 had ATA, 49 had ACA. The other AAb detected were anti-RNAPIII (n=1), anti-U1RNP (n=1), anti-U3RNP (n=1), anti-Pm/Scl (n=2) or anti-Th/To (n=1).

Factors associated with the occurrence of each type of organ complication according to multivariate analysis in SSc

Because of the high phenotypical heterogeneity occurring in SSc, multivariate analyses were performed to

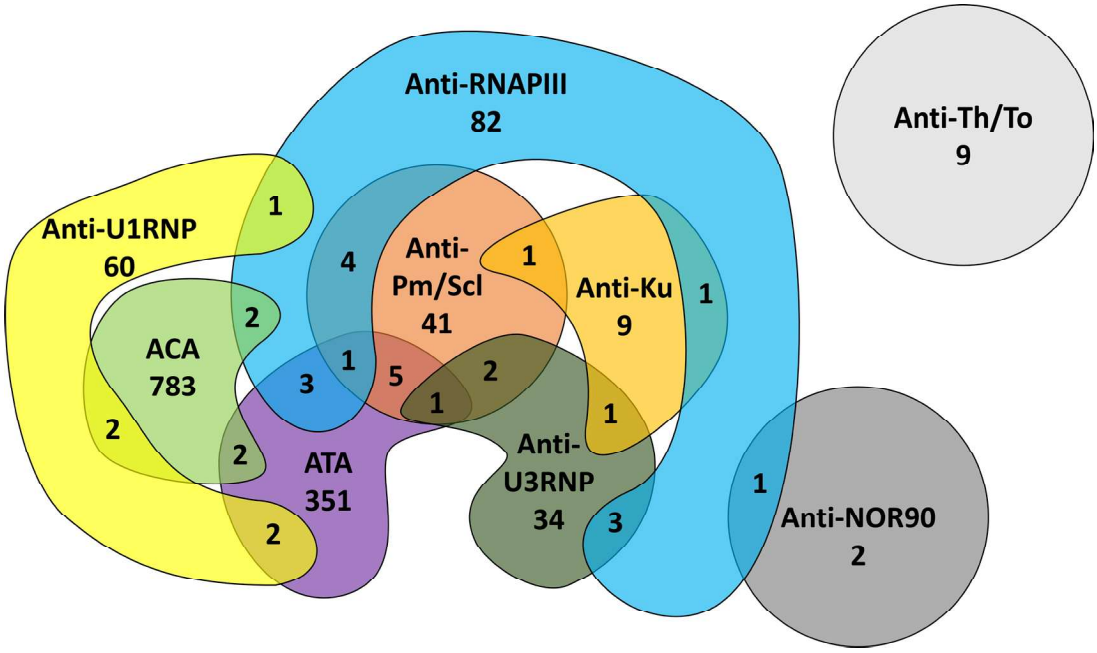


Figure 1 Schematic prevalence of nine SSc-related AAbs in the population: 365 patients had ATA, 789 ACA, 98 anti-RNAPIII, 65 anti-U1RNP, 41 anti-U3RNP, 55 anti-Pm/Scl, 12 anti-Ku, 9 anti-Th/To and 2 anti-NOR90. Thirty-two patients (1.9%) had several AAbs: 14 patients had ATA, 6 ACA, 16 anti-RNAPIII, 5 anti-U1RNP, 7 anti-U3RNP, 14 anti-Pm/Scl, 3 anti-Ku and 1 anti-NOR90. AAbs, autoantibodies; ATA, antitopoisomerase I antibody; ACA; anticentromere antibody; Anti-RNAPIII, anti RNA polymerase III antibody.

identify risk factors associated with the main complications observed in patients with SSc .

ILD was associated with male sex (OR=1.4 (95% CI=1.05 to 1.9), p=0.02), presence of ATA (OR=3.27 (95% CI=2.42 to 4.42), p<0.0001), whereas ILD was negatively associated with ACA (OR=0.18 (95% CI=0.13 to 0.24), p<0.0001). ILD was not associated with skin phenotype subtype or presence of another AAb (table 2 and online supplemental table 2).

PAH was associated with only age at diagnosis (per one additional year, OR=1.04 (95% CI=1.03 to 1.05), p<0.0001) (table 2 and online supplemental table 3). PAH was not associated with the skin phenotype subtype or presence of a specific AAb.

SRC was found associated with anti-RNAPIII (OR=7.05 (95% CI=2.98 to 16.72), p<0.0001) as well as male sex although not statistically significant (OR=2.05 (95% CI=0.91 to 4.66), p=0.09). SRC was negatively associated with the presence of ACA (OR=0.17 (95% CI=0.04 to 0.78), p=0.02). SRC was not associated with skin phenotype subtype or presence of another AAb (table 2 and online supplemental table 4).

DU was associated with age at diagnosis (per 1 additional year, OR=0.97 (95% CI=0.96 to 0.98), p<0.0001), dcSSc subtype (OR=1.53 (95% CI=1.14 to 2.05), p=0.005) or presence of ATA (OR=2.42 (95% CI=1.76 to 3.31), p<0.0001). No other association was found (table 2 and online supplemental table 5).

Arthritis was associated with ATA (OR=1.49 (95% CI=1.03 to 2.15), p=0.04), anti-RNAPIII (OR=2.01 (95% CI=1.21 to 3.34], p=0.007), anti-U1RNP AAb (OR=3.79 (95% CI=2.16 to 6.67), p<0.0001) or anti-U3RNP AAb (OR=2.28 (95% CI=1.15 to 4.52) p=0.02) and negatively associated with the presence of ACA (OR=0.62 (95% CI=0.44 to 0.89), p=0.009). Arthritis was not associated with skin phenotype subtype or another AAb (table 2 and online supplemental table 6).

Myositis was associated with the presence of anti-U1RNP AAb (OR=2.56 (95% CI=1.3 to 5.03), p=0.006), anti-U3RNP AAb (OR=3.32 (95% CI=1.58 to 7.0), p=0.002), anti-Pm/Scl AAb (OR=7.09 (95% CI=3.87 to 12.98), p<0.0001) or anti-Ku AAb (OR=7.99 (95% CI=2.41 to 26.46), p=0.0007), whereas this inflammatory muscle disease was negatively associated with ACA (OR=0.24 (95% CI=0.14 to 0.42), p<0.0001). Myositis was not associated with the skin phenotype subtype (table 2 and online supplemental table 7).

Survival and factors associated with mortality

Survival analyses were first performed to assess the effect of the AAbs on death. Patients with ACA or anti-U1RNP AAb exhibited a better survival (p=0.0003 and 0.05), whereas a worse outcome was observed in patients with ATA (p=0.007), anti-RNAPIII (p<0.0001) or anti-U3RNP AAb (p=0.004) (figure 2, panels B–F).

Anti-ATA and anti-RNAPIII were also identified as independent factors associated with increased mortality by multivariate analysis (anti-ATA: HR=1.9 (95% CI=1.01 to 3.58), p=0.05 and anti-RNAPIII: HR=2.35 (95% CI=1.12 to 4.93), p=0.02). Age at diagnosis, presence of PAH or occurrence of SRC were three other independent factors found associated with increased mortality. On the

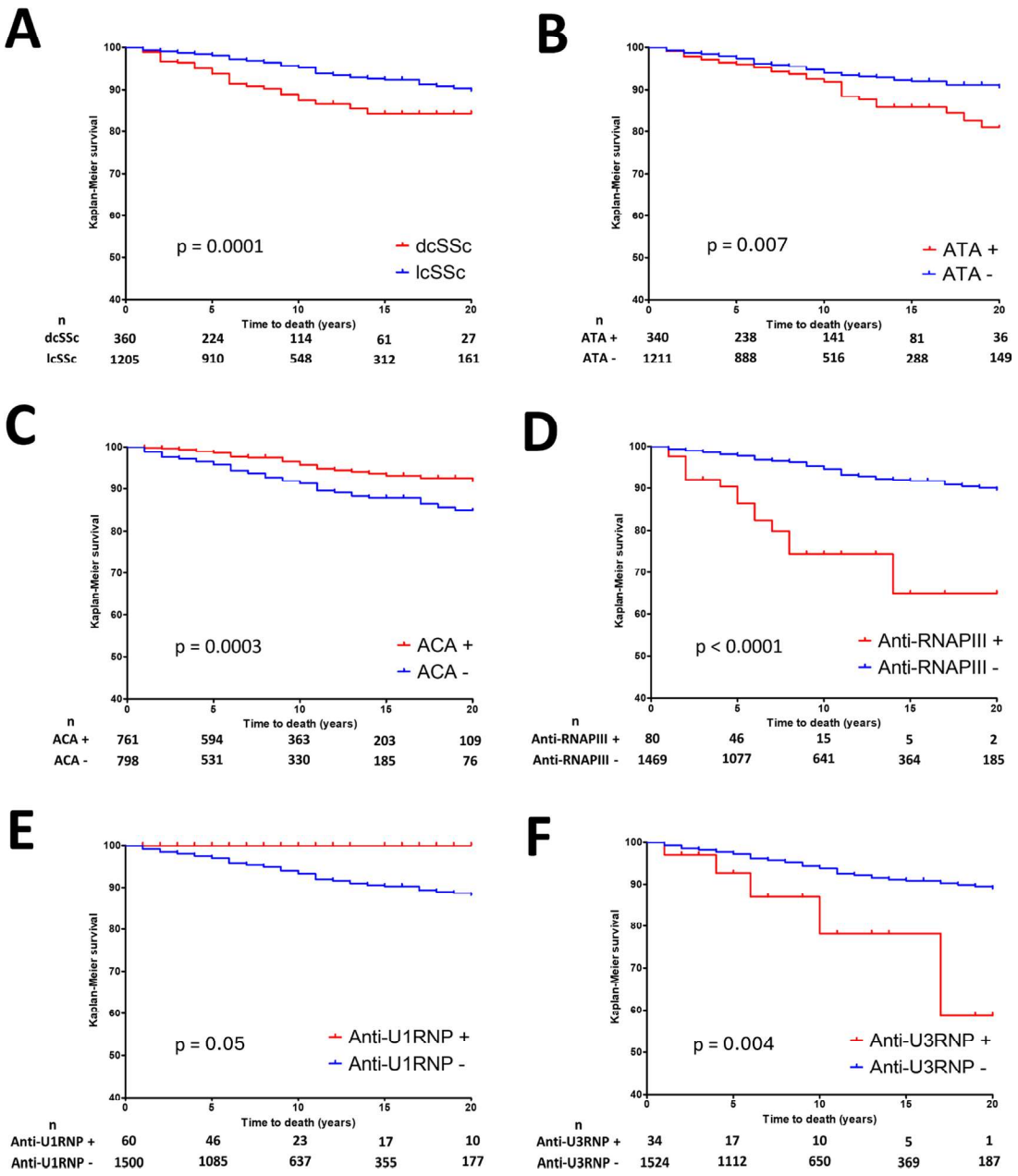


Figure 2 Survival curves of the SSc population by subgroups. Analyses were according to the skin phenotype (A) and the presence or absence of selected AAbs (B–F). AAb, autoantibody; ACA, anticentromere antibody; ATA, antitopoisomerase I antibody; Anti-RNAPIII, anti RNA polymerase III antibody; dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis; lcSSc, limited cutaneous systemic sclerosis.

contrary, outcome was not linked with the skin phenotype (table 3 and online supplemental table 8).

DISCUSSION

In this work, we report data from a large multicentric cohort of patients with SSc focusing on the association between a wide range of AAb specificities, organ complications and disease prognosis. Our observations highlighted the importance of an accurate AAb analysis to guide patient personalised monitoring, as the association between solid organ involvement was much stronger with AAb profile than with skin phenotype in SSc.

We enrolled seven French university hospital centres set up in distinct geographical areas, all belonging to the rare autoimmune and autoinflammatory diseases national network (FAI2R). These centres were chosen because they all applied national guidelines regarding SSc management, including regular screening of organ complications. Moreover, these seven centres were able to detect the AAb specificity against many antigens recently found associated with SSc. Within each centre, all patients with a diagnosis of SSc according to the ACR/EULAR criteria were included. Consequently, with this project, we report data for one of the largest SSc cohorts,

Table 2 Multivariate analysis of factors associated with organ complications in SSc

	PAH (n=1605)		ILD (n=1605)		SRC (n=864)		Digital ulcer (n=1603)		Arthritis (n=1605)		Myositis (n=1603)	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
General features												
Age at diagnosis (per 1 year)	**1.04 (1.03 to 1.05)**	**<**0.0001	–	–	–	–	**0.97 (0.96 to 0.98)**	**<**0.0001	0.99 (0.97 to 1.0)	0.15	0.99 (0.99 to 1.01)	0.91
Male sex	–	–	**1.41 (1.05 to 1.9)**	0.02	2.05 (0.91 to 4.66)	0.09	1.14 (0.86 to 1.51)	0.35	–	–	0.89 (0.56 to 1.4)	0.61
dcSSc subtype	–	–	1.01 (0.75 to 1.34)	0.98	1.63 (0.71 to 3.76)	0.25	**1.53 (1.14 to 2.05)**	0.005	0.89 (0.65 to 1.23)	0.48	–	–
Antibody												
ATA	0.93 (0.54 to 1.62)	0.80	**3.27 (2.42 to 4.42)**	**<**0.0001	–	–	**2.42 (1.76 to 3.31)**	**<**0.0001	**1.49 (1.03 to 2.15)**	0.04	–	–
ACA	1.43 (0.93 to 2.2)	0.10	**0.18 (0.13 to 0.24)**	**<**0.0001	**0.17 (0.04 to 0.78)**	0.02	1.08 (0.81 to 1.44)	0.61	**0.62 (0.44 to 0.89)**	0.009	**0.24 (0.14 to 0.42)**	**<**0.0001
Anti-RNAPIII	–	–	–	–	**7.05 (2.98 to 16.72)**	**<**0.0001	0.69 (0.41 to 1.17)	0.17	**2.01 (1.21 to 3.34)**	0.007	–	–
Anti-U1RNP	–	–	–	–	–	–	–	–	**3.79 (2.16 to 6.67)**	**<**0.0001	**2.56 (1.3 to 5.03)**	0.006
Anti-U3RNP	–	–	–	–	–	–	–	–	**2.28 (1.15 to 4.52)**	0.02	**3.32 (1.58 to 7.0)**	0.002
Anti-Pm/Scl	–	–	1.05 (0.59 to 1.86)	0.87	–	–	–	–	–	–	**7.09 (3.87 to 12.98)**	**<**0.0001
Anti-Ku	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	**7.99 (2.41 to 26.46)**	0.0007
Anti-Th/To	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Anti-NOR90	–	–	–	–	6.15 (0.46 to 81.72)	0.17	<0.001 (<0.001 to >999)	0.97	–	–	–	–

Representation of multivariate analysis of factors associated with organ complications in SSc using a heatmap representation (OR = 1 or non-significant; OR = 0; highest OR).
Statistically significant values are put in bold.
ACA, anti-centromere antibody; anti-RNAPIII, anti-RNA polymerase III antibody.; ATA, anti-topoisomerase I antibody; dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis; ILD, interstitial lung disease; PAH, pulmonary arterial hypertension; SRC, scleroderma renal crisis.

Table 3 Cox proportional-hazards analysis of factors associated with mortality in SSc

	HR (95% CI)	P
General features		
Age at diagnosis (per 1 year)	**1.07 (1.06 to 1.09)**	**<0.0001**
Male sex	1.49 (0.93 to 2.4)	0.10
Clinical features		
dcSSc subtype	1.2 (0.73 to 1.97)	0.48
PAH	**4.46 (2.99 to 6.67)**	**<0.0001**
ILD	0.87 (0.56 to 1.37)	0.56
SRC	**3.56 (1.78 to 7.1)**	**0.0003**
Antibody		
ATA	**1.9 (1.01 to 3.58)**	0.05
ACA	0.77 (0.4 to 1.48)	0.43
Anti-RNAPIII	**2.35 (1.12 to 4.93)**	0.02
Anti-U1RNP	0.44 (0.06 to 3.39)	0.43
Anti-U3RNP	2.63 (0.95 to 7.28)	0.06
Anti-Pm/Scl	–	–
Anti-Ku	–	–
Anti-Th/To	–	–
Anti-NOR90	–	–

Statistically significant values are put in bold.
ACA, anti-centromere antibody; anti-RNAPIII, anti RNA polymerase III antibody; ATA, anti-topoisomerase I antibody; dcSSc, diffuse systemic sclerosis; PAH, pulmonary arterial hypertension; SRC, scleroderma renal crisis; SSc, systemic sclerosis.

including more than 1600 non-selected patients with SSc with a mean disease duration of 10 (8.2) years, a full phenotypic description, and an extensive immunological exploration. This cohort displayed the classical features of SSc concerning organ involvement and overlap-syndrome frequencies and we assume that this large cohort is representative of SSc populations.[13 14 18–21] Regarding immunological markers, a total of 1572 (97.9%) patients were positive for ANA, and a SSc-related nuclear target was identified in 89.2% of the cohort. Our study gives a full description of the frequency and associated phenotype regarding nine AAbs and confirmed that double SSc-specific AAb positivity is extremely rare (32 patients representing less than 2% of the cohort produced more than one AAb).

Given the new therapeutic opportunities in SSc, we need to identify factors associated with the most frequent and severe complications related to SSc to personalise patient management and propose the best therapeutic strategy.[22] For this purpose, we logically focused on clinical and biological variables available early in the course of the disease. Currently, the skin phenotype subtype is the main factor used to classify patients with SSc and predict prognosis and organ involvement.[5 23] In our cohort, univariate analyses highlighted that patients with dcSSc had a higher risk than those with lcSSc to experience ILD, SRC, DU, arthritis and IPO, whereas there was no difference concerning the risk of PAH or myositis, as previously described in other cohorts.[6 7 14] Interestingly, there was no statistical difference between patients *sine scleroderma* compared with lcSSc concerning complications, except for the occurrence of DUs. To further assess the association between cutaneous phenotype and outcome in another way, we performed multivariate analyses without stepwise selection and evidenced that the cutaneous phenotype subtype did not predict any organ outcome in our model, except the development of DU. The association between the dcSSc subtype and DU has been previously reported and may be due to the higher frequency of mechanical ulcers on the back of these patients' hands.[24] Overall, our data demonstrate that the skin phenotype is not a sufficient and reliable factor to formally predict organ damage and disease complications for clinicians.

By contrast to the skin phenotype, we evidenced a strong association between several AAb specificities and organ damages on multivariate analyses without stepwise selection. Indeed, except PAH, each type of organ involvement was found associated with a single or some AAb(s). ILD was found related to the presence of ATA, SRC with anti-RNAPIII, myositis with anti-U1RNP, anti-U3RNP AAb, anti-Pm/Scl or anti-Ku AAbs. Regarding arthritis, this other musculoskeletal complication was observed in patients with ATA, anti-RNAPIII, anti-U1RNP and anti-U3RNP. Patients with ACA were identified as a subgroup at decreased risk for developing musculoskeletal complications (arthritis, myositis), SRC and ILD by our analyses. Previous studies have reported similar associations between the three most frequently identified AAbs (ATA, ACA, anti-RNAPIII) and SSc phenotype in many cohorts.[5 6] ATA was found associated with dcSSc and ILD, ACA with lcSSc and with PAH in some but not all studies, and anti-RNAPIII with dcSSc and SRC.[13 14 18 25] Regarding the other AAbs, data appear more scarce. Anti-U1RNP AAb was found associated with ILD and myositis, and also with PAH in a Japanese and an Australian cohort; anti-U3RNP AAb with PAH and myositis; anti-Pm/Scl and anti-Ku AAbs were both associated with myositis and ILD, and anti-Th/To AAb with PAH.[13 18 26–29] Regarding PAH, this severe complication was found associated with age at diagnosis but without any ANA specificity in our population. Previous studies suggested an association between ACA and PAH and this notion is commonly reported in reviews on the topic.[25] Nevertheless the definition of PAH may be objectionable in a part of these previous studies. Two important analyses on large populations observed no association between ACA and PAH, as reported here.[14 18] Anti-U3RNP and anti-Th/To AAb have been found associated with PAH in some studies focusing on these subgroups of patients producing these rare AAbs.[14 27 29] We may have missed these associations because of lack of patients with these two AAbs. Whatever, the majority of patients with SSc developing PAH do

not produce anti-U3RNP or anti-Th/To AAb, suggesting that AAbs are not key tools to help clinicians in PAH screening. Some teams are currently endeavouring to identify serum biomarkers for PAH based on pathophysiological considerations or without any a priori tools like multiplexed approaches.[30 31]

The mortality rate was about 10% at 10 years in our study, similar to that reported in an Italian cohort and lower than that estimated in another French cohort (about 30%), but this one was smaller and reported by specific centres who probably care for the most severe patients because of their leading role in the disease.[2 23] Logically, older age at diagnosis, PAH and SRC were found associated with reduced survival, as reported in other cohorts.[2 3] Surprisingly, ILD was not associated with a worsen prognosis in the present cohort. Because all patients performed a CT-scan at least at diagnosis, whatever their symptom or respiratory function test result, is it possible that there was an over-representation of 'non-clinically significant ILD" in this cohort by contrast with other cohort performing CT-scan only in case of altered respiratory function test. The skin phenotype was not found associated with mortality in our study, according to both the analyses in subgroups based on immunological profile and to multivariate analyses without stepwise selection in the entire population. This result is supported by 8 of the 10 previously published studies based on multivariate analyses, as shown in online supplemental table 9)[23 32–39] . Of note, Nihtyanova *et al* reported lower survival for dcSSc than patients with lcSSc mainly because of a higher mortality of patients with dcSSc in the first 5 years after disease onset in a well-characterised United Kingdom's cohort.[14] As highlighted by this team, survival rates were the same for lcSSc and dcSSc patients after 5 years of follow-up when survival analyses were performed according to presence or absence of organ involvement. They also analysed in the same cohort the associations between distinct immunological profiles (ACA, ATA, anti-RNAPIII, anti-U3RNP, anti-Pm/Scl, other identified ANA, unidentified ANA, no ANA) and organ complications and survival.[14] Accordingly, the patients who carried ACA had the highest survival, while the patients with unidentified ANA had the lowest survival. In our cohort with a larger panel of ANA specificities determination multivariate analyses without stepwise selection identified two among the nine AAb specificities, ATA and anti-RNAPIII, as factors associated with a higher mortality, whereas patients with ACA or anti-U1RNP AAb exhibited a better survival. These associations are in accordance with older studies on survival focusing only on patients with ATA, ACA and anti-RNAPIII.[40]

ANAs represent relevant biomarkers to improve predictive value of a new patient's outcome-based classification in SSc. Three arguments advocate for this recommendation: (1) these AAbs are produced before any symptoms and complications, (2) they are generally mutually exclusive as observed by all studies including ours[11] and (3) each ANA subtype is found significantly associated with a separate disease profile and outcome as demonstrated here by multivariate analyses without any a priori assumption. Other teams have previously published convincing studies regarding the weight of AAbs for patient classifications by using cluster analysis methods. In a study based on a cohort of 407 patients, adding five SSc-specific AAbs in the cluster analysis allowed to identify a group of patients at high risk of organ involvement with high sensitivity.[41] A cluster analysis within the European Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database distinguished six homogeneous groups of patients with SSc according to skin phenotype subtype, AAb profile, organ involvement and mortality.[8] All these elements raise old questions about the pathogenic role of this family of AAbs in SSc. It is believed that the nuclear nature of their target prevents any accessibility, precluding any direct pathophysiological considerations. Nevertheless, recent data suggest a pathogenic role of these AAbs in the disease. Different potential mechanisms of pathogenicity have been described, notably concerning ATA leading to endothelial cell apoptosis and/or fibroblast and immune cell activation, but many aspects remain to be elucidated.[42]

We consider that the systematic determination of the high number of ANA specificities is a major strength and factor of originality of our study since an important part of SSc population display ANA specificities that were not considered in most previous published studies. In the present cohort, ANA specificities were determined for up to 89% of the patients with SSc, whereas they were usually available in 50%–70% in other studies. The other strengths of our study include the lack of any a priori assumptions in the analyses, the real-life nature of the patient series, the number of included patients from several centres with a well-defined and long-term follow-up and very few lacking data. All centres were officially qualified to manage patients with SSc, but most of them were not recognised as referral centres. This is an important point to avoid an overrepresentation of the most severe cases.

Our study has limitations mainly due to the retrospective collection of the data and the observational nature of our cohort. To limit some bias, we excluded each patient with a lack of follow-up within the last 3 years before the beginning of the study. Furthermore, important factors that could influence organ involvement and mortality, such as other comorbidities, especially cancer and medication data were not available for analysis. Considering immunologic profile and despite the inclusion of more than 1600 patients, we may have missed some associations with AAb specificities because of the low prevalence of some AAbs. We also assume that the methods of detection of the nine AAbs could be different among the different centres. Nevertheless, all methods used assessed high to very high sensitivity and specificity and displayed a high concordance with a Cohen's κ ranged from 0.67 to 0.99.[43–49] Moreover, all centres applied the same algorithm for AAb detection. Capillaroscopic patterns at

diagnosis and during follow-up represent key factors to be considered in patients with SSc evaluation since the importance of nailfold microangiopathy and its evolution have been found to be associated with a higher prevalence of internal organ involvement.[50] Unfortunately, data on nailfold capillaroscopic patterns were missing for a large part of the patients of our multicentre cohort. Furthermore, among the 1605 patients, 240 (14.9%) were diagnosed within the last 3 years. Thus, we could have missed some association because of a short disease duration. Nevertheless, there was no statistical difference between patients with a disease duration inferior to 3 years than patients with a disease duration more than 3 years concerning the prevalence of PAH, ILD, myositis and arthritis (data not shown). Patients with a disease duration inferior to 3 years were more prompted to develop SRC (p=0.009), whereas patients with a disease lasting for more than 3 years suffered more from DUs (p=0.03). SRC is described as an early complication in SSc, whereas DUs occur later in the course of the disease.[14 51] Finally, most of our patients were Caucasian, and therefore extrapolation of our results to other SSc populations with different genetic backgrounds is hazardous.[52]

In conclusion, this study unravelled the strong association among nine ANA specificities, organ involvement and outcome in Caucasian patients with SSc. We provide new evidence for the value of a systematic determination of ANA specificities at diagnosis in patients with SSc since this information could help clinicians to better stratify the individual risk of complication and personalise monitoring. However, a classification based only on ANA would probably be insufficient to fully evaluate patient phenotype and other disease attributes including dynamic biomarkers, nailfold capillary patterns and tissue gene expression signatures have been proposed as innovative means of SSc subsetting and deserve further research.

Author affiliations
[1]Department of Internal Medicine, Infectious Diseases, and Clinical Immunology, University Hospital Centre Reims, Reims, Grand Est, France
[2]UR7509 - IRMAIC, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, Grand Est, France
[3]Univ. Lille, U1286 – Infinite – Institute for Translational Research in Inflammation, Lille, France
[4]Institut Universitaire de France, Paris, Île-de-France, France
[5]Rheumatology Department, FHU ACRONIM, University Hospital Centre Bordeaux, Bordeaux, Nouvelle-Aquitaine, France
[6]CIRID, UMR CNRS-5164, ImmunoConcEpT, Bordeaux University, Bordeaux, France
[7]Immunology and Immunogenetic Department, CHU Bordeaux, Bordeaux, France
[8]Department of Internal Medicine, CHU Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, University Hospital Centre Lyon, Lyon, Auvergne-Rhône-Alpes, France
[9]Department of Internal Medicine-Multiorganic Diseases, Local Referral Center for Auto-immune Diseases, Saint-Eloi Hospital, University Hospital Centre of Montpellier, Montpellier, France
[10]Department of Internal Medicine, University Hospital Centre Nantes, Nantes, Pays de la Loire, France
[11]Department of Internal Medicine, University Hospital Centre Reims, Reims, Grand Est, France
[12]Department of Dermatology, University Hospital Centre Reims, Reims, Grand Est, France
[13]Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, Grand Est, France
[14]Clinical Epidemiology Department, University Hospital Centre Reims, Reims, Grand Est, France
[15]Department of Biostatistics, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, Grand Est, France
[16]Immunology laboratory Department, University Hospital Centre Reims, Reims, Grand Est, France
[17]Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique, CHU Lille, Lille, France

X Vincent Sobanski @VSobanski

Acknowledgements All the authors wanted to acknowledge the patients for their participation in our studies for a better understanding of SSc. The authors are also grateful to the Reims Champagne-Ardenne University for giving them the opportunity to present this work in a conference.

Contributors Conception and design: AS, DL, KD, VS. Administrative support: AS, KD, CB. Provision of study materials or patients: AH, AM, AS, AR, CA, DL, JLP, KD, M-ET, MV, PG, RF, TM. Collection and assembly of data: CC-B, DG, KD, TB. Data analysis and interpretation: AS, CB, DJ, KD. Manuscript writing: all authors. Final approval of manuscript: all authors. Guarantor: AS.

Funding The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not applicable.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplementary information.

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

ORCID iDs
Kevin Didier http://orcid.org/0000-0003-3349-9146
Vincent Sobanski http://orcid.org/0000-0003-3083-2441
Ailsa Robbins http://orcid.org/0000-0003-0858-0380
Marie-Elise Truchetet http://orcid.org/0000-0001-8045-0180
Thomas Barnetche http://orcid.org/0000-0002-0975-8534
Cécile Contin-Bordes http://orcid.org/0000-0003-4652-2907

REFERENCES

1 Didier K, Robbins A, Antonicelli F, *et al*. Updates in systemic sclerosis pathogenesis: Toward new therapeutic opportunities. *Rev Med Interne* 2019;40:654–63.
2 Pokeerbux MR, Giovannelli J, Dauchet L, *et al*. Survival and prognosis factors in systemic sclerosis: data of a French multicenter cohort, systematic review, and meta-analysis of the literature. *Arthritis Res Ther* 2019;21:86.
3 Elhai M, Meune C, Boubaya M, *et al*. Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1897–905.
4 LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28:1573–6.
5 Walker UA, Tyndall A, Czirják L, *et al*. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis* 2007;66:754–63.

6 Meier FMP, Frommer KW, Dinser R, *et al*. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1355–60.
7 Proudman SM, Huq M, Stevens W, *et al*. What have multicentre registries across the world taught us about the disease features of systemic sclerosis? *J Scleroderma Relat Disord* 2017;2:169–82.
8 Sobanski V, Giovannelli J, Allanore Y, *et al*. Phenotypes Determined by Cluster Analysis and Their Survival in the Prospective European Scleroderma Trials and Research Cohort of Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2019;71:1553–70.
9 Leclair V, Hudson M, Proudman SM, *et al*. Subsets in systemic sclerosis: one size does not fit all. *J Scleroderma Relat Disord* 2016;1:298–306.
10 Burbelo PD, Gordon SM, Waldman M, *et al*. Autoantibodies are present before the clinical diagnosis of systemic sclerosis. *PLoS One* 2019;14:e0214202.
11 Heijnen IAFM, Foocharoen C, Bannert B, *et al*. Clinical significance of coexisting antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis: a EUSTAR group-based study. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31:96–102.
12 Didier K, Bolko L, Giusti D, *et al*. Autoantibodies Associated With Connective Tissue Diseases: What Meaning for Clinicians? *Front Immunol* 2018;9:541.
13 Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:35–42.
14 Nihtyanova SI, Sari A, Harvey JC, *et al*. Using Autoantibodies and Cutaneous Subset to Develop Outcome-Based Disease Classification in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2020;72:465–76.
15 van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, *et al*. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65:2737–47.
16 Cottin V, Brown KK. Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD). *Respir Res* 2019;20:13.
17 Hamaguchi Y, Takehara K. Anti-nuclear autoantibodies in systemic sclerosis : News and perspectives. *J Scleroderma Relat Disord* 2018;3:201–13.
18 Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, *et al*. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R172.
19 Scherlinger M, Lutz J, Galli G, *et al*. Systemic sclerosis overlap and non-overlap syndromes share clinical characteristics but differ in prognosis and treatments. *Semin Arthritis Rheum* 2021;51:36–42.
20 Derrett-Smith EC, Nihtyanova SI, Harvey J, *et al*. Revisiting ANCA-associated vasculitis in systemic sclerosis: clinical, serological and immunogenetic factors. *Rheumatology (Sunnyvale)* 2013;52:1824–31.
21 David C, Chaigne B, Hollande C, *et al*. Primary biliary cholangitis and systemic sclerosis (Reynolds syndrome): A case-control study. *Autoimmun Rev* 2021;20:102842.
22 Pope JE, Denton CP, Johnson SR, *et al*. State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2023;19:212–26.
23 Ferri C, Sebastiani M, Lo Monaco A, *et al*. Systemic sclerosis evolution of disease pathomorphosis and survival. Our experience on Italian patients' population and review of the literature. *Autoimmun Rev* 2014;13:1026–34.
24 Tolosa-Vilella C, Morera-Morales ML, Simeón-Aznar CP, *et al*. Digital ulcers and cutaneous subsets of systemic sclerosis: Clinical, immunological, nailfold capillaroscopy, and survival differences in the Spanish RESCLE Registry. *Semin Arthritis Rheum* 2016;46:200–8.
25 Nunes JPL, Cunha AC, Meirinhos T, *et al*. Prevalence of auto-antibodies associated to pulmonary arterial hypertension in scleroderma - A review. *Autoimmun Rev* 2018;17:1186–201.
26 Wodkowski M, Hudson M, Proudman S, *et al*. Clinical correlates of monospecific anti-PM75 and anti-PM100 antibodies in a tri-nation cohort of 1574 systemic sclerosis subjects. *Autoimmunity* 2015;48:542–51.
27 Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, *et al*. Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1112–8.
28 Spielmann L, Nespola B, Séverac F, *et al*. Anti-Ku syndrome with elevated CK and anti-Ku syndrome with anti-dsDNA are two distinct entities with different outcomes. *Ann Rheum Dis* 2019;78:1101–6.
29 Charlton D, Laffoon M, Medsger TA, *et al*. Long-Term Survival and Follow-up of Anti-Th/to Antibody Positive Systemic Sclerosis Patients. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2017;69:1–4426.
30 Bauer Y, de Bernard S, Hickey P, *et al*. Identifying early pulmonary arterial hypertension biomarkers in systemic sclerosis: machine learning on proteomics from the DETECT cohort. *Eur Respir J* 2021;57:2002591.
31 Hoffmann-Vold A, Hesselstrand R, Fretheim H, *et al*. CCL21 as a Potential Serum Biomarker for Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:1644–53.
32 Nihtyanova SI, Schreiber BE, Ong VH, *et al*. Prediction of Pulmonary Complications and Long-Term Survival in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1625–35.
33 Hachulla E, Clerson P, Airò P, *et al*. Value of systolic pulmonary arterial pressure as a prognostic factor of death in the systemic sclerosis EUSTAR population. *Rheumatology (Sunnyvale)* 2015;54:1262–9.
34 Hao Y, Hudson M, Baron M, *et al*. Early Mortality in a Multinational Systemic Sclerosis Inception Cohort. *Arthritis Rheumatol* 2017;69:1067–77.
35 Moon KW, Lee S-S, Lee YJ, *et al*. Clinical and Laboratory Characteristics and Mortality in Korean Patients with Systemic Sclerosis: A Nationwide Multicenter Retrospective Cohort Study. *J Rheumatol* 2018;45:1281–8.
36 Panopoulos S, Bournia V-K, Konstantonis G, *et al*. Predictors of morbidity and mortality in early systemic sclerosis: Long-term follow-up data from a single-centre inception cohort. *Autoimmun Rev* 2018;17:816–20.
37 van den Hombergh WM, Knaapen-Hans HK, van den Hoogen FH, *et al*. Prediction of organ involvement and survival in systemic sclerosis patients in the first 5 years from diagnosis. *J Scleroderma Relat Disord* 2020;5:57–65.
38 Wangkaew S, Prasertwitayakij N, Phrommintikul A, *et al*. Causes of death, survival and risk factors of mortality in Thai patients with early systemic sclerosis: inception cohort study. *Rheumatol Int* 2017;37:2087–94.
39 Strickland G, Pauling J, Cavill C, *et al*. Mortality in systemic sclerosis-a single centre study from the UK. *Clin Rheumatol* 2013;32:1533–9.
40 Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, *et al*. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37:75–83.
41 Boonstra M, Mertens BJA, Bakker JA, *et al*. To what extent do autoantibodies help to identify high-risk patients in systemic sclerosis? *Clin Exp Rheumatol* 2018;36 Suppl 113:109–17.
42 Chepy A, Bourel L, Koether V, *et al*. Can Antinuclear Antibodies Have a Pathogenic Role in Systemic Sclerosis? *Front Immunol* 2022;13:930970.
43 Chandratilleke D, Silvestrini R, Culican S, *et al*. Comparison of two extractable nuclear antigen testing algorithms: ALBIA versus ELISA/line immunoassay. *Pathology (Phila)* 2016;48:491–7.
44 Mahler M, Bentow C, Serra J, *et al*. Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2016;38:14–20.
45 Mahler M, You D, Baron M, *et al*. Anti-centromere antibodies in a large cohort of systemic sclerosis patients: Comparison between immunofluorescence, CENP-A and CENP-B ELISA. *Clin Chim Acta* 2011;412:1937–43.
46 Desplat-Jego S, Bardin N, Larida B, *et al*. Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen for the detection of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:245–55.
47 González C, García-Berrocal B, Pérez M, *et al*. Laboratory screening of connective tissue diseases by a new automated ENA screening assay (EliA Symphony) in clinically defined patients. *Clin Chim Acta* 2005;359:109–14.
48 Pérez D, Gilburd B, Azoulay D, *et al*. Antinuclear antibodies: Is the indirect immunofluorescence still the gold standard or should be replaced by solid phase assays? *Autoimmun Rev* 2018;17:548–52.
49 Alkema W, Koenen H, Kersten BE, *et al*. Autoantibody profiles in systemic sclerosis; a comparison of diagnostic tests. *Autoimmunity* 2021;54:148–55.
50 Sulli A, Paolino S, Pizzorni C, *et al*. Progression of nailfold capillaroscopic patterns and correlation with organ involvement in systemic sclerosis: a 12 year study. *Rheumatology (Sunnyvale)* 2020;59:1051–8.
51 Hachulla E, Clerson P, Launay D, *et al*. Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. *J Rheumatol* 2007;34:2423–30.
52 Al-Sheikh H, Ahmad Z, Johnson SR. Ethnic Variations in Systemic Sclerosis Disease Manifestations, Internal Organ Involvement, and Mortality. *J Rheumatol* 2019;46:1103–8.

La Revue de médecine interne 45 (2024) 488–497

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

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

Mise au point

Fasciite à éosinophiles : actualités physiopathologiques et nouvelles voies thérapeutiques

Eosinophilic fasciitis: From pathophysiology to therapeutics

S. Knapp[a], L. Bolko[b], A. Servettaz[a,c], K. Didier[a,*,c]

[a] *Service de médecine interne, maladie infectieuse et immunologie clinique, hôpital Robert-Debré, CHU de Reims, rue du Général-Kœnig, 51092 Reims cedex, France*
[b] *Service de rhumatologie, hôpital Maison Blanche, CHU de Reims, Reims, France*
[c] *EA 7509 IRMAIC, université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 21 mars 2024

Mots clés :
Fasciite à éosinophiles
Physiopathogénie
Fibrose
Éosinophiles
Thérapeutique

RÉSUMÉ

La fasciite à éosinophiles (FE), ou maladie de Shulman, est une pathologie rare du tissu conjonctif caractérisée par un œdème et une induration douloureuse des membres et du tronc, souvent associés à une hyperéosinophilie et une hypergammaglobulinémie. Elle provoque des arthralgies et une limitation des amplitudes articulaires induisant un important retentissement fonctionnel et une altération de la qualité de vie. Depuis sa description par Shulman en 1974, plus de 300 cas ont été rapportés. Nous présentons ici une revue des actualités diagnostiques, physiopathologiques, et thérapeutiques de cette maladie. L'imagerie par résonance magnétique est utile pour orienter le diagnostic et la biopsie. Le diagnostic repose sur la biopsie cutanée profonde comportant le fascia qui met en évidence un œdème, une sclérofibrose du fascia musculaire et du tissu sous-cutané et un infiltrat inflammatoire parfois composé de polynucléaires éosinophiles. Des formes secondaires à l'utilisation des inhibiteurs de *checkpoint* ont été décrites et l'apparition d'une sclérose cutanée chez ces patients doit faire évoquer le diagnostic. La physiopathologie reste mal connue et la prise en charge mal codifiée, reposant sur des données issues de cohorte rétrospectives et cas cliniques. Le traitement de première intention consiste en corticothérapie orale, parfois associée à un immunosuppresseur, en premier lieu le méthotrexate. Une meilleure compréhension de la physiopathologie permet d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques et de préciser la place de thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de l'interleukine 5 (IL-5) et de l'IL-6.

© 2024 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Eosinophilic fasciitis
Pathogenesis
Fibrosis
Eosinophils
Therapy

ABSTRACT

Eosinophilic fasciitis (EF) is a rare connective tissue disorder characterized by painful edema and induration of the limbs and trunk, likely associated with hypereosinophilia and hypergammaglobulinemia. EF causes arthralgia and range of motion limitation, leading to significant functional impairment and poor quality of life. Since its description by Shulman in 1974, over 300 cases have been reported. We present here a review of the latest diagnostic, pathophysiological and therapeutic developments in this disease. Magnetic resonance imaging appears useful to guide diagnosis and biopsy. Diagnosis is based on a deep skin biopsy involving the fascia, which will reveal edema, sclerofibrosis of the muscular fascia and subcutaneous tissue, and an inflammatory infiltrate sometimes composed of eosinophilic polynuclear cells. EF may occur in patients treated with immune checkpoint inhibitors and the diagnosis should be raised in case of cutaneous sclerosis in these patients. The pathophysiology of the disease remains poorly understood, and its management lacks randomized, controlled, blinded trials. First-line treatment consists in oral corticosteroid therapy, sometimes combined with an immunosuppressant, mainly methotrexate.

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : kdidier@chu-reims.fr (K. Didier).

https://doi.org/10.1016/j.revmed.2024.03.006
0248-8663/© 2024 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

A better understanding of the pathophysiology has opened new therapeutic perspectives and clarified the role of targeted therapies in the management of EF, such as interleukin-6 inhibitors, whose efficacy has been reported in several cases.
© 2024 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Messages à retenir/*highlights*

- La fasciite à éosinophiles est une pathologie rare du tissu conjonctif caractérisée par un œdème et une induration douloureuse des membres et du tronc, souvent associés à une hyperéosinophilie et une hypergammaglobulinémie.
- Elle provoque une limitation des amplitudes articulaires induisant un important retentissement fonctionnel et une altération de la qualité de vie.
- La confirmation diagnostique repose actuellement sur l'analyse histologique des fascias et/ou sur l'IRM des fascias.
- Le traitement de référence consiste en une corticothérapie conduite sur plusieurs mois, en association ou non à des traitements immunosuppresseurs ou immunomodulateurs.
- Les formes réfractaires, cortico-dépendantes et récidivantes sont fréquentes et les complications liées à la corticothérapie s'ajoutent aux séquelles d'une maladie mal contrôlée.
- La mise en évidence d'un rôle clé de certaines cytokines (TGF-β, IL-5 ou IL-6) et de nouveaux acteurs cellulaires et moléculaires offre de nouvelles opportunités thérapeutiques plus ciblées.

1. Abréviations

CCR	*chemokine receptor*
CCL	*chemokine ligand*
CPK	créatinine phosphokinase
CRP	protéine C-réactive
FE	fasciite à éosinophiles
HLA	*Human Leucocyte Antigen*
HPN	hémoglobinurie paroxystique nocturne
ICP	inhibiteur de *checkpoint*
IFN-γ	interféron-gamma
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IRM	imagerie par résonance magnétique
LIF	*Leukemia Inhibitory Factor*
LoSCAT	*Localized Scleroderma Cutaneous Assessment Tool*
MMF	mycophénolate mofétil
MMP	métallo-protéinases matricielles
PD-1	*Programmed cell Death protein 1*
PDL-1	*Programmed cell Death ligand 1*
PNE	polynucléaires éosinophiles
TIMP-1	*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1*
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor alpha*
TGF-β	*Transforming Growth Factor beta*
VS	vitesse de sédimentation

La fasciite à éosinophiles (FE) est également appelée maladie de Shulman, d'après l'auteur qui en a fait la première description en 1974 [1,2]. Il présentait les cas de deux hommes ayant développé un œdème et une induration cutanée des membres, souvent associés à une hyperéosinophilie et une hypergammaglobulinémie. Depuis, plus de 300 cas de cette maladie fibrosante ont été décrits dans la littérature. Bien que la mortalité soit faible, l'impact fonctionnel est sévère et altère la qualité de vie de la grande majorité des patients [3]. La prise en charge de cette pathologie demeure mal définie et sa physiopathologie mal connue. La rareté des cas empêchant la réalisation d'essais contrôlés randomisés, les recommandations actuelles reposent sur des cohortes rétrospectives et des avis d'experts.

Cet article a pour objectifs de rappeler la présentation clinique ainsi que la démarche diagnostique en 2024, puis de présenter une mise à jour sur la physiopathologie de la maladie et ses implications dans la stratégie thérapeutique à l'ère des thérapies ciblées.

2. Étiologies

La FE est la plupart du temps idiopathique, cependant de nombreux facteurs déclenchants et formes secondaires ont été rapportés.

Dans 30 à 45 % des cas, un effort physique, un traumatisme ou une brûlure précèdent l'apparition des symptômes [4,5]. L'hypothèse d'une exposition antigénique provoquée par le traumatisme et déclenchant la réaction inflammatoire a été évoquée. Plus rarement, des cas survenus après une infection (*Borrelia burgdorferi*, *Ascaris lumbricoides*, mycoplasma) ou une exposition au trichloro-éthylène ont été décrits [5,6]. L'imputabilité de différents médicaments a été discutée sans preuve formelle (agonistes dopaminergiques, biphosphonates, statines, inhibiteurs de la pompe à protons, vaccins, anti « Tumor Necrosis Factor » alpha (TNF-α), natalizumab, mésalazine, tocilizumab, amoxicilline, acide acétyl salicylique, phénytoïne, ramipril, héparine en injection sous-cutanée, etc.) [4–8]. Dans une revue récente basée sur les données issues du réseau français de pharmacovigilance et de la base internationale VigiBase, plus de 100 cas de FE secondaires à l'introduction d'un traitement ont été recensés [8]. Les inhibiteurs de *checkpoint* (ICP) étaient au premier rang des traitements pouvant induire une FE, avec 22 cas relevés. L'incidence de cette association parmi les patients traités par ICP est cependant actuellement difficile à évaluer. Dans la majorité de ces cas sous ICP, le traitement reçu était un bloqueur de l'axe *Programmed cell Death protein* 1 et de son ligand (PD-1/PDL-1) (essentiellement le nivolumab et le pembrolizumab). Les symptômes apparaissaient dans les deux ans suivant l'introduction de l'ICP et étaient caractérisés par une hyperéosinophilie importante et une atteinte de la face et du cou plus fréquente que dans les FE survenant hors contexte ICP. L'évolution était généralement favorable sous corticothérapie, parfois associée au méthotrexate, voire spontanément en cas d'arrêt de l'ICP. Les arrêts de traitement décrits étaient liés à une progression de la néoplasie sous-jacente, l'apparition d'une FE ne constituant pas un motif d'arrêt systématique de l'ICP. L'apparition d'une FE pourrait être associée à une meilleure réponse au traitement ICP comme cela a été décrit avec d'autres effets immunologiques non graves [8–10].

3. Pathologies associées

L'association à des maladies hématologiques est bien décrite et concerne environ 10 % des cas de FE [5,11]. Par ordre de

fréquence, les associations décrites sont avant tout l'aplasie médullaire idiopathique, puis les hémopathies malignes lymphoïdes et myéloïdes, plus rarement certains déficits immunitaires humoraux et l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) [6,7,11–15]. La FE peut également constituer une manifestation cutanée de la maladie du greffon contre l'hôte [16].

L'association aux tumeurs solides est plus rarement décrite, probablement sous-estimée : au sein de leur cohorte de 128 patients, Chaigne et al. retrouvaient jusqu'à 20 % de néoplasies, dont 65 % de tumeurs solides (17 cas) se déclarant dans une médiane de deux ans après le diagnostic de FE [7].

L'association aux maladies auto-immunes ou inflammatoires est également rapportée [6,12]. En effet, des cas de thyroïdites auto-immunes, polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux systémique, maladie de Gougerot-Sjögren, spondylarthrite ankylosante, psoriasis, cytopénies auto-immunes, hémophilie acquise, vitiligo, néphropathie à immunoglobuline (Ig) A, diabète de type I, cirrhose biliaire primitive et de maladies inflammatoires de l'intestin ont été rapportés [3,6,7,12,17–20].

4. Présentation clinique

La FE touche majoritairement les adultes, entre 40 et 60 ans avec une prédominance féminine de 50 à 68 % selon les séries [7,11,21–23]. Des cas pédiatriques ont également été décrits, dès l'âge de 1 an.

La FE se présente par un œdème douloureux et une induration symétrique des extrémités des membres, d'apparition brutale, évoluant vers une sclérose du derme profond et du tissu sous-cutané [7,11,22,23]. L'évolution est généralement progressive avec une extension vers les racines des membres et une atteinte secondaire du tronc. L'atteinte des membres est quasi-constante (89–95 %), celle du visage plus rare (4–7 %) et celle des mains exceptionnelle [6,7,11,21–24]. La topographie est majoritairement symétrique mais une localisation unilatérale n'exclut pas le diagnostic [5]. L'œdème peut s'associer à un érythème et un prurit à la phase initiale, puis évolue vers une sclérose du derme profond et du tissu sous-cutané, épargnant l'épiderme. Cela se traduit par un aspect en « peau d'orange » (21–53 %) (Fig. 1A), une sclérose (Fig. 1B) et une hyperpigmentation en plaques [6,7,11,23]. Le signe de la vallée ou « veine en creux » (Fig. 1C) est défini par un affaissement linéaire de la surface de la peau suivant les trajets veineux dans le derme superficiel. Bien qu'il soit très spécifique de la maladie, il n'est pas systématiquement retrouvé (21–80 %) [6,7,21,23,25].

Certains patients ont également des lésions de type morphée (3 à 66 % selon les séries, plus généralement autour de 20 à 40 %). Cette disparité peut être expliquée par des pratiques diagnostiques différentes selon les centres et le caractère rétrospectif de la plupart des observations. La présence de morphée est associée à un risque de fibrose séquellaire et est donc de mauvais pronostic [3,7,11,21–23,26]. De rares cas de FE sans atteinte cutanée clinique ont également été décrits [22,23].

L'atteinte articulaire est caractérisée par des arthralgies, une raideur et une limitation des amplitudes liées à la sclérose aponévrotique et aux rétractions tendineuses [11,24]. La FE peut également se manifester par des arthrites inflammatoires et des synovites dans 10 à 40 % des cas, touchant principalement les mains et les genoux [11,23,24]. L'inflammation peut s'étendre au muscle sous-jacent et provoquer un tableau de myosite [22,27].

Des signes généraux accompagnent habituellement le tableau cutanéo-articulaire, pouvant associer une asthénie, une faiblesse musculaire, des myalgies et une altération de l'état général [22,23].

Les atteintes viscérales sont exceptionnelles et les manifestations extra-cutanéo-articulaires sont principalement liées aux complications de la fibrose. Ainsi, l'induration du tissu sous-cutané et la fibrose des fascias peuvent se compliquer d'atteintes neurologiques par compression, notamment d'un syndrome du canal carpien dans 25 % des cas [11]. Des cas de mononévrite multiple, de paralysie faciale et de hypoglosse et des crises convulsives ont également été rapportés, sans substrat étiologique identifié [6]. La fibrose au niveau du tronc peut limiter l'amplitude thoracique et induire un trouble ventilatoire restrictif [28]. Des cas de sérites avec épanchements péricardiques et pleuraux ont aussi été décrits [6,29].

Deux cas d'atteinte rénale ont été rapportés : un cas de glomérulosclérose segmentaire et focale pauci-immune et un cas de protéinurie sur collapsus ischémique des capillaires glomérulaires associé à une atrophie des tubules corticaux [6].

5. Démarche diagnostique

Le diagnostic est évoqué et retenu devant un faisceau d'arguments cliniques, biologiques, radiologiques, et histologiques.

5.1. Biologie

Plusieurs anomalies biologiques peuvent être rencontrées dans la FE :

- une hyperéosinophilie sanguine chez 55 à 85 % des patients [3,7,11,22,23]. Elle est souvent présente à la phase aiguë, peut être transitoire, et son absence ne doit pas faire éliminer le diagnostic [4] ;
- un syndrome inflammatoire biologique : une élévation de la vitesse de sédimentation (VS) dans 25 à 46 % des cas et/ou une élévation de la protéine C-réactive (CRP) dans 38 à 68 % des cas [3,7,11,23] ;
- une hypergammaglobulinémie polyclonale chez 13 à 45 % des patients, plus rarement une gammapathie monoclonale [7,11,21–23] ;
- des stigmates d'auto-immunité : les anticorps antinucléaires peuvent être faiblement positifs jusque dans 38 % des cas, plus rarement le facteur rhumatoïde [3,11,21,23] ;
- une élévation des enzymes musculaires : l'aldolase semble associée à l'activité de la maladie et augmentée dans 30 % des cas contrairement à la créatinine phosphokinase (CPK) dont l'élévation est plus rare [11,23,25].

D'autres marqueurs comme le « Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 » (TIMP-1) semblent corrélés à l'activité de la FE et pourraient représenter de nouveaux biomarqueurs [30]. Une anémie est rarement décrite, en rapport avec un syndrome inflammatoire ou une pathologique hématologique associée [11].

5.2. Imagerie

Le recours à l'imagerie est utile dans la démarche diagnostique afin de mettre en évidence une atteinte des fascias :

- l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une méthode sensible de diagnostic de l'atteinte des fascias [21,22]. Dans un contexte clinique évocateur, elle peut permettre de conforter le diagnostic sur la base d'éléments spécifiques à la FE : un épaississement des fascias profonds en séquence T1, avec un signal plus intense que celui du muscle en T2 et un rehaussement après injection (Fig. 2). Les anomalies sont généralement circonscrites aux fascias. Elle peut également guider la biopsie. L'intensité de l'atteinte est corrélée à l'activité de la maladie et l'IRM peut être utile dans le suivi [31] ;
- la place de l'échographie dans la stratégie diagnostique est discutée du fait de sa plus grande accessibilité et de son faible

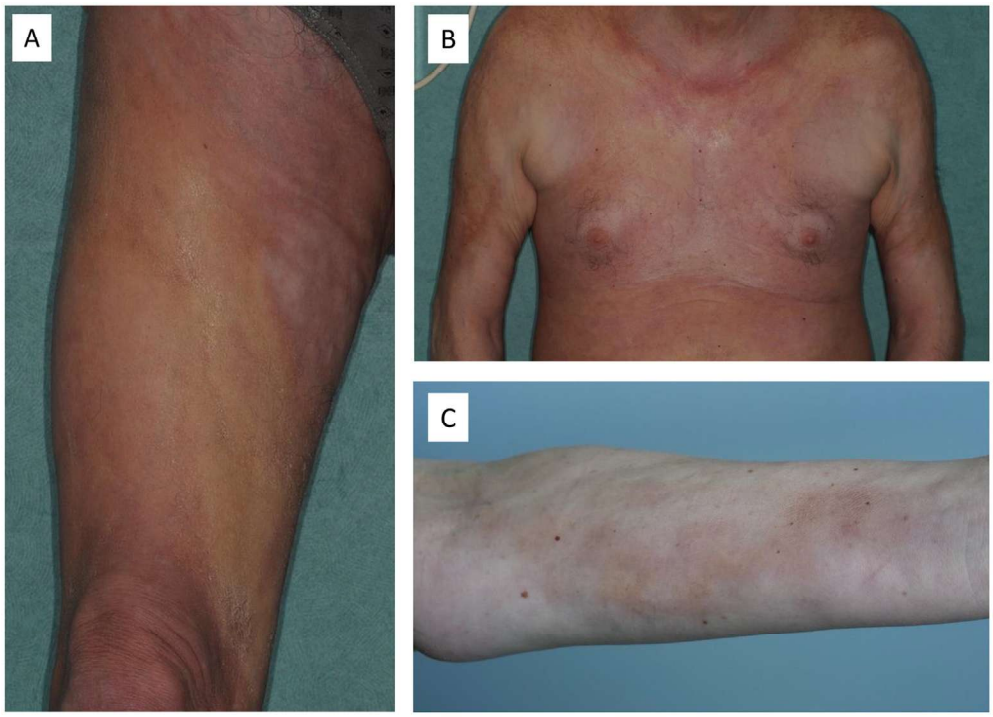


Fig. 1. Manifestations cutanées de la fasciite à éosinophiles. A. Lésions sclérodermiformes de la face antérieure de la cuisse avec aspect en peau d'orange. B. Lésions sclérodermiformes du tronc et des bras avec atrophie cutanée et hyperpigmentation des bras. C. Aspect de « veine en creux » ou « signe du sillon » et hyperpigmentation de l'avant-bras (photos issues de la collection du service de dermatologie du CHU de Reims, avec leur aimable autorisation).

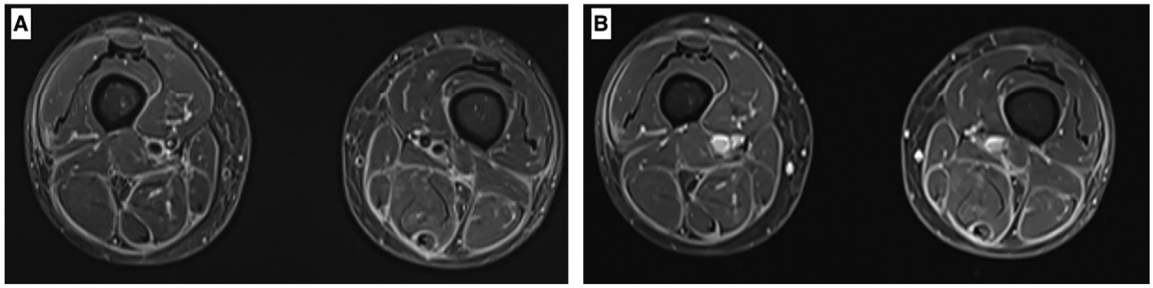


Fig. 2. IRM de cuisses d'un patient atteint de fasciite à éosinophiles. A. Séquence T2 STIR retrouvant un hypersignal spontané du fascia des muscles de la loge postérieure des cuisses, bilatéral et symétrique. B. Séquence T1 avec injection de gadolinium retrouvant un rehaussement des fascias après injection du produit de contraste.

coût. Elle permet d'analyser les fascias ; cependant son caractère opérateur-dépendant et l'absence de normes comparatives de l'épaisseur des fascias limitent son utilisation [32] ;
- la tomodensitométrie par émission de positons peut montrer une augmentation de la captation du fluorodéoxyglucose le long des fascias, sans atteinte du muscle ni de la graisse musculaire, et une augmentation de la captation articulaire [6]. Elle a également un intérêt dans le diagnostic différentiel et dans la recherche d'une néoplasie associée [33].

5.3. Histologie

L'analyse histologique est considérée comme la méthode diagnostique de référence. La biopsie doit concerner l'ensemble des tissus, du muscle jusqu'au derme afin de contenir le fascia.

L'évolution de la sclérose est ascendante du fascia vers le derme, en fonction du degré de sévérité. L'atteinte du fascia est la plus évidente en macroscopie, avec un épaississement pouvant atteindre jusqu'à 15 fois la taille du fascia normal [34]. À l'échelle microscopique, on observe un œdème, un infiltrat inflammatoire de même nature et une sclérose marquée dans la plupart des cas [22,34]. La présence de polynucléaires éosinophiles (PNE) est fréquente mais inconstante. Dans le tissu sous-cutané, on observe dans un premier temps un infiltrat inflammatoire, constitué de lymphocytes, plasmocytes, histiocytes et PNE, dans les régions péri-septales et en périphérie des amas graisseux. La phase inflammatoire œdémateuse évolue vers une sclérose des septa interlobulaires qui peut s'étendre jusqu'au fascia et au derme réticulaire. L'atteinte du derme est fréquente mais inconstante [22,34]. Elle consiste en une fibrose du derme réticulaire associée à un infiltrat lymphocytaire, plasmocytaire et histiocytaire avec présence de quelques PNE, à la jonction dermo-sous-dermique ou péri-annexielle. L'épiderme est épargné dans la majorité des cas [34]. Le muscle sous-jacent peut être normal ou présenter un infiltrat inflammatoire péri-vasculaire, parfois associé à une fibrosclérose interstitielle et une atrophie. Plus rarement, on observe des foyers de nécrose et de régénération de myocytes.

Sur le plan immunologique, des dépôts d'immunoglobulines (Ig) G ou M et/ou de fraction C3 du complément peuvent être observés dans le fascia et le tissu interstitiel musculaire [34]. L'infiltrat inflammatoire, retrouvé le plus souvent dans le fascia et le tissu

Tableau 1
Critères diagnostiques de la fasciite à éosinophiles.

	Jinnin et al., 2018 [4]	Pinal-Fernandez et al., 2014 [5]
Critères majeurs	Lésions sclérotiques des extrémités, en plaque, sans phénomène de Raynaud	I. Œdème, induration et épaississement cutané et des tissus sous-cutanés, diffus ou localisés, symétriques ou non II. Biopsie de pleine épaisseur de peau lésée avec épaississement du fascia et infiltrat macrophagique et lymphocytaire, avec ou sans polynucléaires éosinophiles
Critères mineurs	1. Biopsie comprenant le fascia, avec épaississement du fascia et infiltrat éosinophilique et monocytaire 2. Épaississement du fascia en IRM	1. Hyperéosinophilie > 0,5 G/L 2. Hypergammaglobulinémie > 15 g/L 3. Faiblesse musculaire ou élévation de l'aldolase sérique 4. Signe de la vallée ou aspect peau d'orange Fascia hyperintense en IRM T2
Diagnostic	Critère majeur + 1 ou 2 critère(s) mineur(s)	2 critères majeurs ou 1 critère majeur + 2 critères mineurs

sous-cutané, est majoritairement composé de macrophages et lymphocytes T CD8+ cytotoxiques [35].

5.4. Critères diagnostiques

Bien qu'ils n'aient pas été validés dans de multiples cohortes, les critères diagnostiques proposés par Jinnin et al. et Pinal-Fernandez et al. représentent une aide dans la démarche diagnostique (Tableau 1) [4,5].

6. Diagnostics différentiels

Du fait de la faible incidence de la FE, l'errance diagnostique est souvent de plusieurs mois avec un délai moyen diagnostique de 5 à 13 mois et pouvant dépasser plusieurs années [6]. Un délai diagnostique supérieur à 6 mois est associé à un risque d'évolution défavorable [22,26]. Le tableau clinico-biologique peut être confondu avec d'autres pathologies sclérosantes, œdémateuses ou impliquant une hyperéosinophilie. De nombreuses pathologies infectieuses, inflammatoires, toxiques, et néoplasiques peuvent associer une hyperéosinophilie et des manifestations cutanéo-articulaires [3,6,7,11,21–23,26,36–39].

Les principaux diagnostics différentiels sont résumés dans le Tableau 2.

7. Physiopathologie

Bien que la physiopathologie de la FE reste à éclaircir, de nombreux arguments orientent vers une implication de mécanismes immuno-médiés :

- la présence fréquente d'une hypergammaglobulinémie et d'anticorps antinucléaires [7,11,21–23] ;
- la réponse à la corticothérapie et aux immunosuppresseurs [5,11,23,26] ;
- la présence de complexes immuns circulants et la présence de dépôts d'immunoglobulines et de complément en histologie [34,40] ;
- l'association aux maladies auto-immunes ou inflammatoires citées plus haut.

Cependant, aucune corrélation avec le « Human Leucocyte Antigen » (HLA), ni aucun auto-anticorps spécifique n'ont été mis en évidence [11].

Deux principaux processus pathologiques sont impliqués dans la FE : une réaction immunitaire pro-inflammatoire et la fibrose. Ces deux mécanismes lésionnels sont intriqués et partagent des voies communes. Leur implication dans la FE est étayée par un faisceau d'arguments directs ou indirects (Fig. 3).

À l'échelle cellulaire, l'infiltrat inflammatoire composé de macrophages et lymphocytes T CD8+ contenant du granzyme B laisse évoquer une implication de mécanismes cytotoxiques [35]. Par ailleurs, un excès de CD40-ligand soluble a été retrouvé dans le sérum des patients atteints de FE, suggérant le rôle de T helper [41]. Les récentes observations de FE secondaires au traitement par ICP suggèrent une implication de la voie d'activation PD-1/PDL-1 [9]. Les macrophages composant l'infiltrat cellulaire semblent présenter un phénotype « anti-inflammatoire/pro-fibrosant » (M2) prédominant, avec co-expression du CD206 et du « Transforming Growth Factor » beta (TGF-β) [42]. La présence de PNE dans le fascia est caractéristique de la FE mais inconstante. Leur présence est plus souvent rapportée à la phase précoce de la maladie [35,42]. Ils sécrètent du TGF-β et leur rôle dans la formation de la fibrose a été rapporté dans d'autres pathologies toutefois cela n'a pas été démontré dans la FE [43].

Dans un modèle in vitro, les fibroblastes de patients atteints de FE produisaient jusqu'à 3,7 fois plus de procollagène que les contrôles, et présentaient une augmentation de la transcription des acides ribonucléiques (ARN) messagers du pro-alpha I collagène et de la fibronectine [44]. Dans le tissu sous-cutané et le derme profond, une accumulation de collagène est classiquement décrite.

Plusieurs molécules impliquées dans le déclenchement et/ou le maintien de la fibrose et de l'inflammation auraient un rôle dans la physiopathologie de la FE et représentent de potentielles cibles thérapeutiques :

- TGF-β : une augmentation des concentrations sériques de TGF-β a été rapportée dans la FE et son rôle est central dans la formation de la fibrose, notamment par la stimulation de production de matrice extracellulaire par les fibroblastes. Il régule l'expression de TIMP-1 [45] ;
- TIMP-1 : son augmentation a été observée dans le fascia, le derme et le sérum de patients atteints de FE [30]. Les TIMP sont impliqués dans la régulation de la dégradation de la matrice extracellulaire grâce à leur activité inhibitrice sur les métalloprotéinases matricielles (MMP). À l'instar de la sclérodermie systémique, le TIMP-1 pourrait avoir également une activité cytokinique pouvant induire la prolifération des fibroblastes et la production d'interleukine (IL)-10 mais cela n'a pas été spécifiquement démontré dans la FE [46]. Une étude a montré une élévation des concentrations sériques de MMP-13 chez les patients atteints de FE [47] ;
- IL-5 : plusieurs observations sont en faveur de son rôle dans la FE telles l'élévation de l'IL-5 sérique chez des patients atteints de FE, l'élévation de la production d'IL-5 par les cellules mononuclées de patients en culture in vitro et la présence d'IL-5 dans le liquide synovial d'un patient [45,48]. L'IL-5 est l'une des cytokines principales de la régulation du développement et de la fonction des PNE et est impliquée dans leur production, leur survie, leur activation et leur dégranulation ;
- IL-4 : l'IL-4 est impliquée dans le recrutement des PNE et des lymphocytes T helper exprimant le « chemokine receptor » de

Tableau 2
Principaux diagnostics différentiels de la fasciite à éosinophile.

	Acrodermatite chronique atrophiante	Mucinoses cutanées diffuses	Syndrome hyper-éosinophilique	GEPA	POEMS
Clinique	Éruption érythémateuse ou bleutée, télangiectasies, évolution vers la sclérose	Induration et épaississement cutanés, papules translucides	Urticaire, lésions eczématiformes	Purpura vasculaire, urticaire, livédo	Hyperpigmentation, angiomes, télangiectasies, hypertrichose, épaississement cutané
Localisation	Partie distale des membres	Extrémités, visage	Variable	Diffuse, déclive	Diffuse
Syndrome de Raynaud	Absent	Absent	Absent	Possible	Possible
Histologie	Infiltrat lympho-plasmocytaire dermique périvasculaire et périannexiel	Dépôts de mucine de localisation variable selon l'étiologie, infiltrat inflammatoire possible	–	Infiltrat éosinophilique et granulome giganto-cellulaires, vascularite	Altérations vasculaires complexes, dilatations capillaires, thrombi
Hyper-éosinophilie	–	–	Présente	Présente	Absente
Auto-anticorps	Absent	Absent	Absent	Possible ANCA (40–50 %)	Absent
Atteintes viscérales	Neuropathie, arthralgies	Liée à la pathologie associée	Pulmonaire, gastro-intestinale, cardiaque, neurologique	Asthme, atteinte ORL, hémorragie intra-alvéolaire, neuropathie, atteinte cardiaque	Endocrinopathie, hépato-splénomégalie, polyneuropathie, sérites, atteinte osseuse
Mortalité	Non	Non	Oui	Oui	Oui
Associations (non exhaustives)	Infection systématique par *Borrelia burgdorferi*	Gammapathie monoclonale, hyperthyroïdie, diabète	Syndromes myélo-prolifératifs, lymphomes	–	Gammapathie monoclonale

Adapté de Fett et al. [32].
ANCA : anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles ; ICP : inhibiteurs de *checkpoint* ; POEMS : *Polyendocrinopathy, Organomegaly, Endocrinopathy, M-protein, Skin-changes* ; GEPA : granulomatose à éosinophile avec polyangéite.

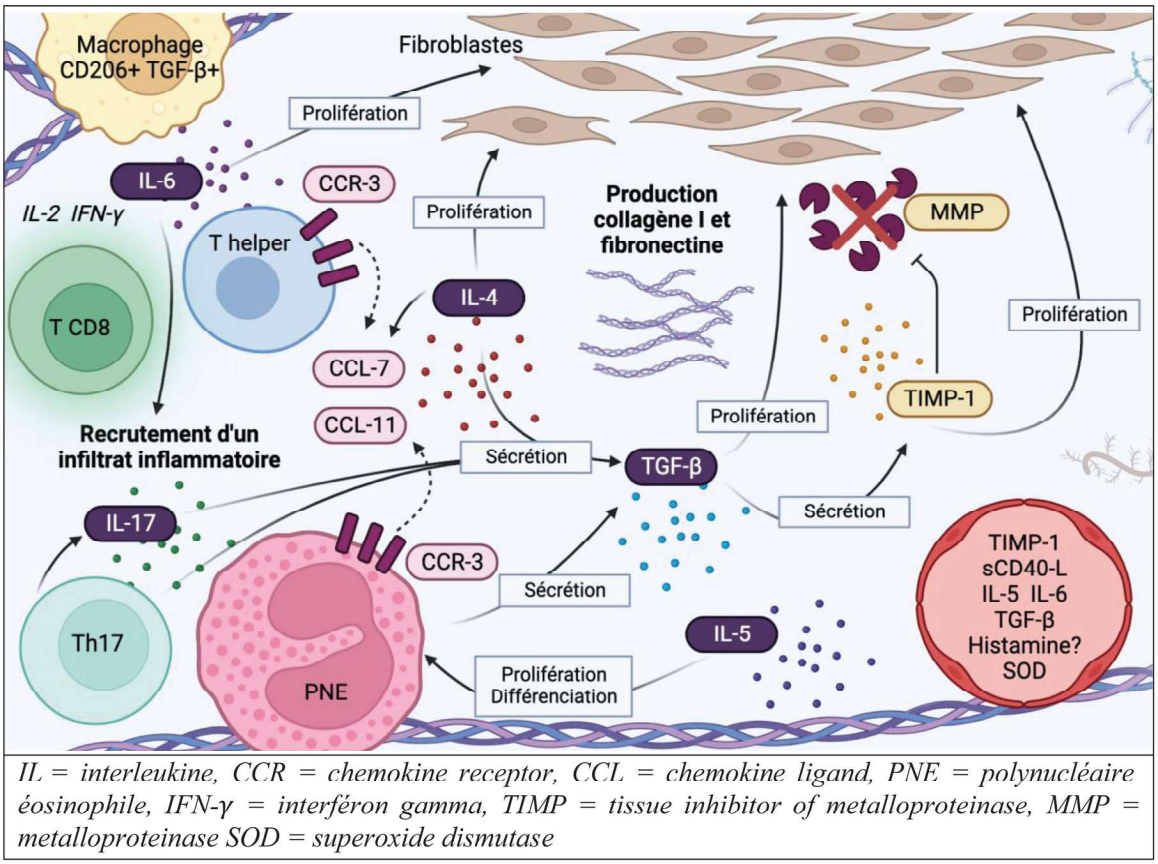


Fig. 3. Synthèse des mécanismes inflammatoires et pro-fibrosants impliqués dans la fasciite à éosinophiles. Lors des phases actives de la maladie, les fascias sont le siège d'un infiltrat inflammatoire constitué de lymphocytes notamment CD8+ et TH17, de macrophages et de PNE. Des lésions de fibrose médiées par l'activation de fibroblastes sont observées, alors que les mécanismes de dégradation de la matrice extracellulaire sont altérés. Plusieurs molécules impliquées dans le déclenchement et/ou le maintien de l'inflammation et de la fibrose pourraient avoir un rôle dans la physiopathologie de la FE et représentent de potentielles cibles thérapeutiques tels que l'IL-5, l'IL-6, le TGF-β. Figure réalisée sur Biorender.com.

type 3 (CCR-3) via une augmentation de la production des facteurs chimiotactiques « chemokine ligand » (CCL) de type 7 et CCL-11 [49]. L'IL-4 est également associée à une augmentation de la prolifération des fibroblastes et de la production de TGF-β ;
- IL-17 : une étude a montré la présence d'un important infiltrat de lymphocytes Th17 chez les patients atteints de FE, en comparaison avec des patients atteints de morphée [50]. Ces lymphocytes sécrètent de l'IL-17 et du TGF-β qui sont des facteurs pro-fibrosant majeurs ;
- famille des IL-6 : une augmentation de la production du « Leukemia Inhibitory Factor » (LIF), cytokine de la famille des IL-6, par les cellules mononuclées activées issues de sang de patients a été observée [51]. L'IL-6 est une cytokine centrale de la réaction inflammatoire. Elle peut induire une augmentation de la production de collagène par les fibroblastes du derme et entretenir la réaction inflammatoire chronique en modifiant le profil de différenciation des lymphocytes T [52]. Les effets de l'IL-6 (mais pas de l'ensemble des cytokines de cette famille) peuvent être bloqués par un anticorps ciblant le récepteur IL-6-R ;
- cytokines Th1 : une augmentation de la production de l'IL-2, de l'interféron-gamma (IFN-γ), par les cellules mononuclées activées issues de sang de patients a été rapportée [51]. Pehl et al. ont également mis en évidence sur une série de biopsies musculaires une majoration de la transcription des gènes *IFNG*, *TNFA*, *STAT1*, impliqués dans les voies Th1 [42].

8. Traitements actuels et nouvelles perspectives

8.1. Principes du traitement

En l'absence de recommandations validées et d'essais thérapeutiques randomisés, il peut être proposé de débuter le traitement par une corticothérapie orale, plus ou moins précédée de bolus de méthylprednisolone s'il existe d'emblée des facteurs de risque de séquelles (atteinte du tronc, insuffisance respiratoire restrictive, atteinte œdémateuse, fibrose histologique). Les traitements de seconde ligne doivent être discutés au cas par cas d'autant plus qu'il n'existe pas de critères validés de réponse thérapeutique ni de durée minimale de traitement et que des évolutions spontanément favorables ont été rapportées [11]. Toutefois, les formes réfractaires, cortico-dépendantes et récidivantes sont fréquentes et les complications liées à la corticothérapie prolongée risquent de s'ajouter aux séquelles d'une maladie mal contrôlée. En conséquence, l'association d'un immunosuppresseur comme le méthotrexate (MTX) peut être discutée d'emblée. Dans les formes réfractaires ou récidivantes, de nouvelles thérapies ciblées peuvent trouver leur place grâce à une meilleure connaissance de la pathogénie [7,11,22]. Dans ces situations, un avis d'expert est conseillé. Parallèlement à la prise en charge médicamenteuse, la kinésithérapie, précoce et par mobilisation douce, a montré son intérêt pour limiter les douleurs résiduelles et la consommation d'antalgiques dans cette pathologie [21]. L'impact psychique et fonctionnel est bien corrélé à l'activité de la maladie et nécessite une prise en charge globale [3]. La Fig. 4 propose un algorithme thérapeutique basé sur les données actuelles de la littérature.

8.2. Corticothérapie

La FE est classiquement cortico-sensible et la place de la corticothérapie systémique orale est bien admise, à une posologie de 0,5 à 1 mg/kg/jour avec une décroissance sur plusieurs mois [3,4,7,11,21,22,53]. Les bolus intraveineux de méthylprédnisolone à 500 ou 1000 mg/jour pendant 3 à 5 jours sont parfois utilisés (9 à 47 % des cas) et seraient associés à un meilleur taux de rémission et à une diminution du taux de recours à une seconde ligne thérapeutique [7,21,22,53]. La durée de traitement doit être prolongée et est de 24 à 31 mois en moyenne [6].

8.3. Immunosuppresseurs et immunomodulateurs

Le recours aux traitements immunosuppresseurs en association à la corticothérapie est courant d'après l'analyse des cas publiés. Ils sont utilisés dans les formes réfractaires, cortico-dépendantes ou récidivantes à visée synergique ou d'épargne cortisonique. Parfois, ils sont également utilisés dès la première ligne (27 à 44 % des patients) dans les formes sévères ou en cas de mauvaise tolérance de la corticothérapie [7,22]. Les données sur l'utilisation de ces traitements sont issues de cas cliniques, séries de cas ou cohortes rétrospectives. Ainsi, leur efficacité intrinsèque ou relative est difficile à évaluer, d'autant plus qu'ils sont le plus souvent associée à la corticothérapie.

Le méthotrexate (MTX) s'est imposé comme un traitement de référence. Selon les séries, 37 à 91 % des patients en reçoivent au cours de leur prise en charge [3,21–23]. Il est habituellement administré de manière hebdomadaire, par voie orale ou sous-cutanée. Il permettrait un meilleur taux de réponse complète en association à la corticothérapie et jusqu'à 80 % de réponse après échec de traitement ou dans les formes cortico-dépendantes [21,24].

Le mycophénolate mofétil (MMF) et l'azathioprine (AZA) sont les immunosuppresseurs les plus utilisés après le méthotrexate [21,23]. Des cas de succès de traitement par la ciclosporine, le cyclophosphamide, la D-pénicillamine, le léflunomide, la sulfasalazine, les inhibiteurs de m-TOR, les anti-TNF-α et le thalidomide ont également été rapportés [3,6,23,26].

D'autres classes thérapeutiques comme les thérapies par radiation ultra-violet [54,55] et les perfusions d'immunoglobulines intraveineuses sont également utilisés, avec des résultats variables [6,54,55]. L'hydroxychloroquine est prescrite dans 20 à 45 % des cas et montre un impact favorable sur la réponse dans la série de Lakhanpal et al. [11]. Les cas d'utilisation de colchicine, d'anti-histaminiques, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou de dapsone sont plus rarement rapportés [6]. Dans les cas de FE associés à une anémie aplastique sévère, les données concernant la réponse au traitement par anti-thymoglobuline ± ciclosporine A ou allogreffe de cellules souches hématopoïétiques sont rares et les résultats variables [6].

8.4. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées représentent une alternative prometteuse dans le traitement de cette pathologie grâce aux avancées des connaissances physiopathogéniques. En effet, une revue systématique des cas d'utilisation d'une biothérapie dans la FE relevait une efficacité de ces traitements dans 50 à 100 % des cas [56] :

- les inhibiteurs de la voie de l'IL-6 étaient les plus efficaces avec un taux de réponse à 100 %, dont 25 % de réponse complète, soulevant l'hypothèse d'une implication majeure de cette cytokine dans la physiopathologie de la FE ;
- les anticorps monoclonaux anti-TNF-α étaient les plus fréquemment prescrits. L'infliximab semblait présenter une supériorité dans cette classe avec 77 % de réponse clinique, dont 23 % de réponse complète. Cette classe thérapeutique doit cependant être utilisée avec prudence car son implication dans des cas de FE iatrogènes est discutée [8] ;
- l'utilisation du rituximab et des inhibiteurs de tyrosine kinase était plus rarement rapportée et l'étude de leur efficacité est probablement impactée par les faibles effectifs ;
- un cas d'utilisation de l'éculizumab a été rapporté chez un patient atteint d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) associée à une FE [14]. La FE avait été diagnostiquée deux ans avant

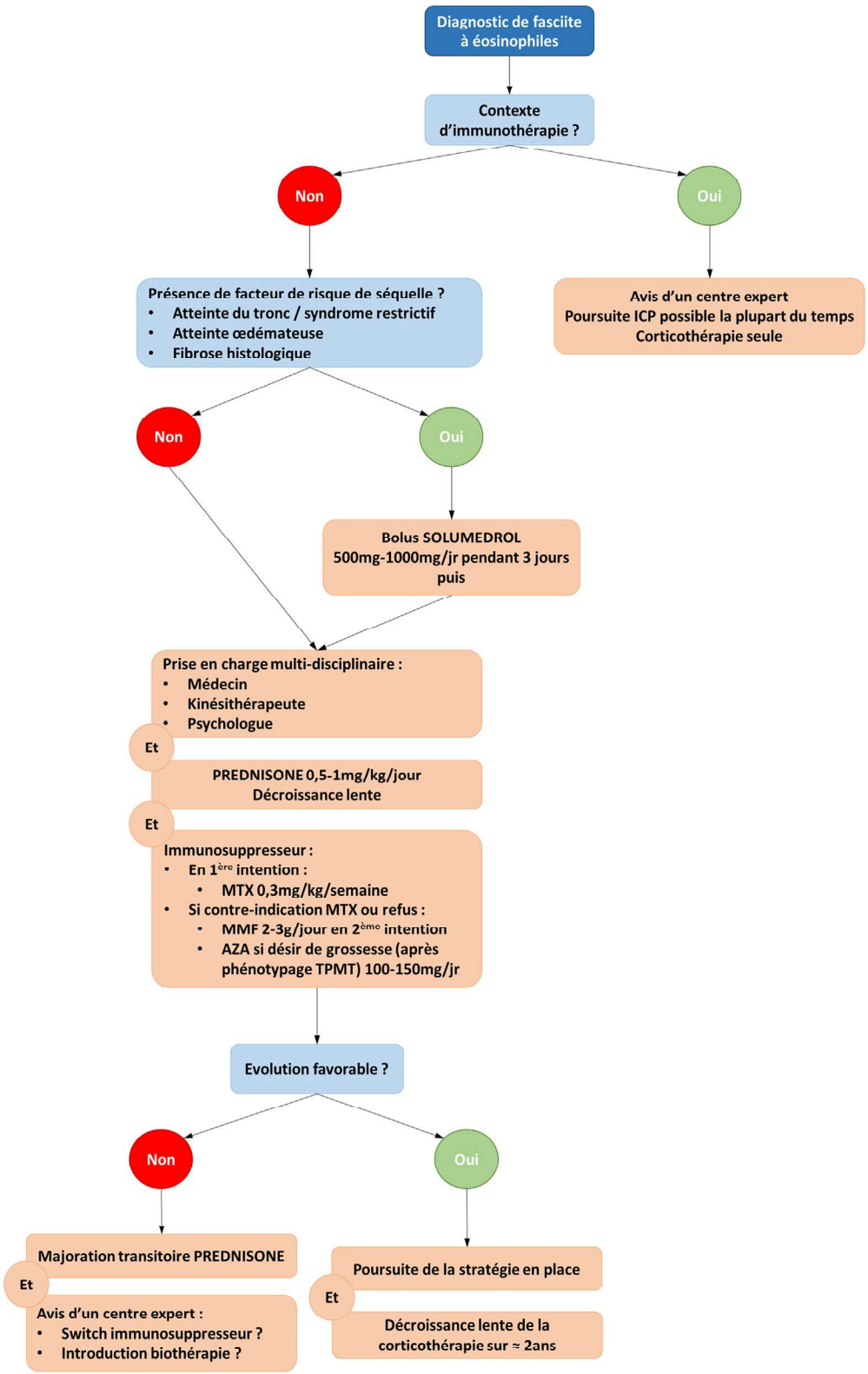


Fig. 4. Algorithme thérapeutique. En l'absence de recommandations validées et d'essais thérapeutiques randomisés, il peut être proposé de débuter le traitement par une corticothérapie orale (0,5–1 mg/kg) plus ou moins précédée de bolus de méthylprednisolone s'il existe d'emblée des facteurs de risque de séquelles (atteinte du tronc, insuffisance respiratoire restrictive, atteinte œdémateuse, fibrose histologique). L'association d'un immunosuppresseur comme le méthotrexate peut être discutée d'emblée compte tenu des risques importants de rechutes, et du risque d'effets secondaires de la corticothérapie prolongée. Dans les formes réfractaires ou récidivantes, un avis d'expert est conseillé afin de proposer le recours à un autre immunosuppresseur ou à une biothérapie ciblée. La kinésithérapie précoce a montré son intérêt pour limiter les séquelles et les douleurs résiduelles. Dans les formes de FE survenant sous inhibiteurs de *checkpoint* (ICP), chaque cas doit être discuté en réunion collégiale. L'arrêt de l'immunothérapie n'est pas systématique. Une corticothérapie orale est fréquemment introduite. AZA : azathioprine ; ICP : inhibiteurs de *checkpoint* ; MTX : méthotrexate ; MMF : mycophénolate mofétil.

l'apparition de l'HPN et persistait malgré trois lignes de traitement par corticothérapie, méthotrexate puis photophorèse. L'éculizumab avait permis une régression partielle du tableau cutané ;

- l'IL-5 : plusieurs cas de succès de traitement ciblant la voie de l'anti-IL-5 ont été rapportés dans la littérature [57,58]. Bien qu'aucune conclusion ne puisse être tirée, le rôle de l'IL-5 dans la physiopathologie de la FE via la prolifération des PNE en fait une cible intéressante. Toutefois, son utilisation en l'absence d'hyperéosinophilie pose question ;
- l'IL-4 : le dupilumab est un anticorps monoclonal ciblant la sous-unité alpha du récepteur de l'IL-4, bloquant ainsi les voies de l'IL-4 et l'IL13. Il est utilisé et bien toléré dans le traitement de la dermatite atopique. Son efficacité dans la FE a été rapportée dans un cas clinique [59] ;
- l'IL-17 : à notre connaissance, aucun cas d'utilisation de traitement ciblant l'IL-17 ou son récepteur n'a été rapporté, mais son rôle dans la FE via les lymphocytes Th17 et la sécrétion de TGF-β pourrait en faire une cible intéressante [50] ;
- le CTLA-4 : par analogie aux cas de FE secondaires à un traitement par ICP, l'abatacept pourrait représenter une cible intéressante dans les formes idiopathiques. À notre connaissance, aucun cas de son utilisation dans la FE n'a été rapporté ;
- le TGF-β : de nombreux traitements ciblant le TGF-β sont en cours de développement pour différentes indications et pourraient bénéficier au patients atteints de FE. Au-delà de son rôle pro-fibrotique, son implication dans les mécanismes immunorégulateurs en fait une cible de choix mais son utilisation est limité en raison de nombreux effets secondaires [60].

9. Évolution, pronostic

L'évolution de la maladie est longue, parfois ponctuée de rechutes, avec un délai de rémission médian d'environ 3 ans [3].

En l'absence d'outils standardisés, l'évaluation de la réponse repose principalement sur l'appréciation du clinicien. Les scores d'évaluation de la sclérose comme le score modifié de Rodnan ou le LoSCAT (*Localized Scleroderma Cutaneous Assessment Tool*), la mesure des amplitudes articulaires, les scores de qualité de vie et le suivi échographique ou IRM pourraient permettre une évaluation plus objective de la réponse mais n'ont pas été étudiés dans ce contexte à ce jour.

Le pronostic est généralement favorable sous traitement avec une rémission complète ou partielle observée dans 60 % des cas [7,11,21,22]. Des cas de rémissions spontanées ont également été rapportés [11].

La présence d'une hyperéosinophilie sanguine > 1000/mm^3 semble associée à la survenue de rechute(s) [7].

La sévérité de la présentation clinique au diagnostic impacte le pronostic fonctionnel : la présence de lésions de morphée, la présence de fibrose, l'œdème et l'aspect en peau d'orange et une élévation importante de la CRP sont associés à un risque de lésions séquellaires [7,26,53]. L'âge avancé ou inférieur à 12 ans, la longueur du délai diagnostique et de rémission et la survenue de rechute(s) sont également corrélés à un mauvais pronostic fonctionnel [3,7,26].

10. Conclusion

La mise en évidence d'un rôle clé de certaines cytokines (TGF-β, IL-5 ou IL-6) et de nouveaux acteurs cellulaires et moléculaires offre de nouvelles opportunités thérapeutiques plus ciblées, à l'instar d'autres pathologies inflammatoires plus fréquentes, et ouvre des perspectives de médecine personnalisée.

Consentement éclairé et confidentialité des données

Les auteurs déclarent que l'article ne contient aucune donnée personnelle pouvant identifier le patient ou le sujet.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Contribution et responsabilité des auteurs

L'ensemble des auteurs atteste du respect des critères de l'*International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) en ce qui concerne leur contribution à l'article.

Références

[1] Shulman LE. Diffuse fasciitis with eosinophilia: a new syndrome? Trans Assoc Am Physicians 1975;88:70–86.
[2] Rodnan GP, DiBartolomeo A, Medsger TA. Proceedings: eosinophilic fasciitis. Report of six cases of a newly recognized scleroderma-like syndrome. Arthritis Rheum 1975;18:525.
[3] Mertens JS, Thurlings RM, Kievit W, Seyger MMB, Radstake TRD, de Jong EMGJ. Long-term outcome of eosinophilic fasciitis: a cross-sectional evaluation of 35 patients. J Am Acad Dermatol 2017;77:512–7.
[4] Jinnin M, Yamamoto T, Asano Y, Ishikawa O, Sato S, Takehara K, et al. Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of eosinophilic fasciitis. J Dermatol 2018;45:881–90.
[5] Pinal-Fernandez I, Selva-O'Callaghan A, Grau JM. Diagnosis and classification of eosinophilic fasciitis. Autoimmun Rev 2014;13:379–82.
[6] Sène D. [Eosinophilic fasciitis (Shulman's disease): diagnostic and therapeutic review]. Rev Med Interne 2015;36:738–45.
[7] Chaigne B, Tieu A, Beeker N, Zuelgaray E, Bouaziz J-D, Sène D, et al. Cluster analysis reveals eosinophilia and fibrosis as poor prognostic markers in 128 patients with eosinophilic fasciitis. J Am Acad Dermatol 2022;87(5):997–1005.
[8] Teboul A, Chouchana L, Durrieu G, Eftekhari P, Treluyer J-M, Mouthon L, et al. Drug-induced eosinophilic fasciitis: a dual pharmacovigilance analysis. J Am Acad Dermatol 2022;86:1372–5.
[9] Chan KK, Magro C, Shoushtari A, Rudin C, Rotemberg V, Rossi A, et al. Eosinophilic fasciitis following checkpoint inhibitor therapy: four cases and a review of literature. Oncologist 2020;25:140–9.
[10] Salamaliki C, Solomou EE, Liossis S-NC. Immune checkpoint inhibitor-associated scleroderma-like syndrome: a report of a pembrolizumab-induced "eosinophilic fasciitis-like" case and a review of the literature. Rheumatol Ther 2020;7:1045–52.
[11] Lakhanpal S, Ginsburg WW, Michet CJ, Doyle JA, Moore SB. Eosinophilic fasciitis: clinical spectrum and therapeutic response in 52 cases. Semin Arthritis Rheum 1988;17:221–31.
[12] de Masson A, Bouaziz J-D, de Latour RP, Benhamou Y, Moluçon-Chabrot C, Bay J-O, et al. Severe aplastic anemia associated with eosinophilic fasciitis: report of 4 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 2013;92:69–81.
[13] Daniels P, Shilian R, Huq M, Hostoffer R. Eosinophilic fasciitis in common variable immunodeficiency with hypereosinophilia. Ann Allergy Asthma Immunol 2021;126:99–100.
[14] Frumholtz L, Sebert M, de Masson A, Attias P, Ades L, Roux J, et al. Efficacy of eculizumab against eosinophilic fasciitis associated with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. J Eur Acad Dermatol Venereol 2017;31:e101–2.
[15] Pituch-Noworolska A, Mach-Tomalska H, Szaflarska A, Adamek D. Shulman disease (eosinophilic fasciitis) in X-linked agammaglobulinemia. Pol J Pathol 2016;67:183–8.
[16] Hidalgo Calleja C, Martín Hidalgo D, Román Curto C, Vázquez López L, Pérez López E, Cabrero Calvo M, et al. Graft versus host disease-related eosinophilic fasciitis: cohort description and literature review. Adv Rheumatol 2022;62:33.
[17] Markusse HM, Breedveld FC. Rheumatoid arthritis with eosinophilic fasciitis and pure red cell aplasia. J Rheumatol 1989;16:1383–4.
[18] Nakakubo Y, Yamamoto K, Fujita M. Atypical presenting symptoms of acute onset acquired haemophilia with eosinophilic fasciitis. Eur J Case Rep Intern Med 2020;7:001722.
[19] Luo G, Wan Y, Wang X, Zhang J, Deng X. Eosinophilic fasciitis associated with generalized morphea and IgA nephropathy. Dermatol Ther 2020;33:e13641.
[20] Tahara K, Yukawa S, Shoji A, Hayashi H, Tsuboi N. Long-term remission by cyclosporine in a patient with eosinophilic fasciitis associated with primary biliary cirrhosis. Clin Rheumatol 2008;27:1199–201.
[21] Wright NA, Mazori DR, Patel M, Merola JF, Femia AN, Vleugels RA. Epidemiology and treatment of eosinophilic fasciitis: an analysis of 63 patients from 3 tertiary care centers. JAMA Dermatol 2016;152:97–9.
[22] Lebeaux D, Francès C, Barete S, Wechsler B, Dubourg O, Renoux J, et al. Eosinophilic fasciitis (Shulman disease): new insights into the therapeutic management from a series of 34 patients. Rheumatology (Oxford) 2012;51:557–61.

[23] Mango RL, Bugdayli K, Crowson CS, Drage LA, Wetter DA, Lehman JS, et al. Baseline characteristics and long-term outcomes of eosinophilic fasciitis in 89 patients seen at a single center over 20 years. Int J Rheum Dis 2020;23:233–9.
[24] Berianu F, Cohen MD, Abril A, Ginsburg WW. Eosinophilic fasciitis: clinical characteristics and response to methotrexate. Int J Rheum Dis 2015;18:91–8.
[25] Nashel J, Steen V. The use of an elevated aldolase in diagnosing and managing eosinophilic fasciitis. Clin Rheumatol 2015;34:1481–4.
[26] Endo Y, Tamura A, Matsushima Y, Iwasaki T, Hasegawa M, Nagai Y, et al. Eosinophilic fasciitis: report of two cases and a systematic review of the literature dealing with clinical variables that predict outcome. Clin Rheumatol 2007;26:1445–51.
[27] Liu Y, Zeng Y, Xie Y, Gao L, Chu H, Xiao Z, et al. Eosinophilic fasciitis associated with myositis: report of four cases and review of the literature. Australas J Dermatol 2019;60:e227–31.
[28] Chalker RB, Dickey BF, Rosenthal NC, Simms RW. Extrapulmonary thoracic restriction (hidebound chest) complicating eosinophilic fasciitis. Chest 1991;100:1453–5.
[29] Chen Z, Wasti B, Shang Y, Jia A, Xiang X, Ouyang R. Clinical characteristics and risk factors of patients with eosinophilic fasciitis associated with pleural effusion. Sci Rep 2023;13:5452.
[30] Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Asano Y, Yazawa N, Tamaki K. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and 2 in patients with eosinophilic fasciitis. Br J Dermatol 2004;151:407–12.
[31] Kirchgesner T, Dallaudière B, Omoumi P, Malghem J, Vande Berg B, Lecouvet F, et al. Eosinophilic fasciitis: typical abnormalities, variants and differential diagnosis of fasciae abnormalities using MR imaging. Diagn Interv Imaging 2015;96:341–8.
[32] Narula NG, Abril A, Calamia KT, Berianu F. Musculoskeletal ultrasound as a diagnostic tool for eosinophilic fasciitis and correlation with magnetic resonance imaging findings. Int J Rheum Dis 2021;24:721–3.
[33] Marie I, Sauvetre G. Fluorodeoxyglucose positron emission tomography in eosinophilic fasciitis. Joint Bone Spine 2014;81:541.
[34] Barnes L, Rodnan GP, Medsger TA, Short D. Eosinophilic fasciitis. A pathologic study of twenty cases. Am J Pathol 1979;96:493–518.
[35] Toquet C, Hamidou MA, Renaudin K, Jarry A, Foulc P, Barbarot S, et al. In situ immunophenotype of the inflammatory infiltrate in eosinophilic fasciitis. J Rheumatol 2003;30:1811–5.
[36] Weller PF, Bubley GJ. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. Blood 1994;83:2759–79.
[37] Fett N, Arthur M. Eosinophilic fasciitis: current concepts. Clin Dermatol 2018;36:487–97.
[38] Dispenzieri A. POEMS syndrome: 2019 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol 2019;94:812–27.
[39] Ferreli C, Gasparini G, Parodi A, Cozzani E, Rongioletti F, Atzori L. Cutaneous manifestations of scleroderma and scleroderma-like disorders: a comprehensive review. Clinic Rev Allerg Immunol 2017;53:306–36.
[40] Seibold JR, Rodnan GP, Medsger TA, Winkelstein A. Circulating immune complexes in eosinophilic fasciitis. Arthritis Rheum 1982;25:1180–5.
[41] Jinnin M, Ihn H, Yazawa N, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Circulating soluble CD40 ligand in patients with eosinophilic fasciitis. Ann Rheum Dis 2003;62:190–1.
[42] Pehl D, Preuße C, Allenbach Y, Benveniste O, Dittert P, Alten R, et al. Eosinophilic fasciitis (Shulman syndrome)-recognition of the histological spectrum allows for new insights into possible pathomechanisms. Rheumatology (Oxford) 2023;62:2005–14.
[43] Gieseck RL, Wilson MS, Wynn TA. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. Nat Rev Immunol 2018;18:62–76.
[44] Kähäri V-M, Heino J, Niskanen L, Fräki J, Uitto J. Eosinophilic fasciitis: increased collagen production and type I procollagen messenger RNA levels in fibroblasts cultured from involved skin. Arch Dermatol 1990;126:613–7.
[45] Dziadzio L, Kelly EA, Panzer SE, Jarjour N, Huttenlocher A. Cytokine abnormalities in a patient with eosinophilic fasciitis. Ann Allergy Asthma Immunol 2003;90:452–5.
[46] Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. Cell Mol Life Sci 2014;71:659–72.
[47] Asano Y, Ihn H, Jinnin M, Tamaki Z, Tamaki K, Sato S. Serum levels of matrix metalloproteinase-13 in patients with eosinophilic fasciitis. J Dermatol 2014;41:746–8.
[48] Nishiya K, Tanimoto N, Hashimoto K, Hashizume M, Tominaga A. Serum and synovial fluid levels of interleukin-5 in a patient with eosinophilic fasciitis. Ann Rheum Dis 1996;55:935–6.
[49] Hosonuma M, Isozaki T, Furuya H, Yamazaki Y, Ikari Y, Nishimi S, et al. Pos0429 interleukin-4 activates eosinophils and Ccr3-positive T helper cells migration to fascia and promotes fibrosis in eosinophilic fasciitis. Ann Rheum Dis 2021;80:443.
[50] Moy AP, Maryamchik E, Nikolskaia OV, Nazarian RM. Th1- and Th17-polarized immune infiltrates in eosinophilic fasciitis – a potential marker for histopathologic distinction from morphea. J Cutan Pathol 2017;44:548–52.
[51] Viallard JF, Taupin JL, Ranchin V, Leng B, Pellegrin JL, Moreau JF. Analysis of leukemia inhibitory factor, type 1 and type 2 cytokine production in patients with eosinophilic fasciitis. J Rheumatol 2001;28:75–80.
[52] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 2014;6:a016295.
[53] Zuelgaray E, Chevret S, Jachiet M, Cacoub P, Kahn J-E, Groh M, et al. Trunk involvement and peau d'orange aspect are poor prognostic factors in eosinophilic fasciitis (Shulman's disease): a multicenter retrospective study of 119 patients. J Am Acad Dermatol 2023;88:160–3.
[54] Kroft EBM, Berkhof NJG, van de Kerkhof PCM, Gerritsen RMJP, de Jong EMGJ. Ultraviolet A phototherapy for sclerotic skin diseases: a systematic review. J Am Acad Dermatol 2008;59:1017–30.
[55] Adamski J, Kinard T, Ipe T, Cooling L. Extracorporeal photopheresis for the treatment of autoimmune diseases. Transfus Apher Sci 2015;52:171–82.
[56] Mufti A, Kashetsky N, Abduelmula A, Lytvyn Y, Sachdeva M, Yeung J. Biologic treatment outcomes in refractory eosinophilic fasciitis: a systematic review of published reports. J Am Acad Dermatol 2022;86:951–3.
[57] Shamriz O, Hershko AY, Talmon A, Ribak Y, Elazary AS, Horev L, et al. The efficacy of off-label IL-5-modulating treatment in rare eosinophil-mediated diseases. Allergol Int 2021;70:266–8.
[58] Sanchez-Melendez SN, Shaw KS, Pan CX, Taylor DL, Shahriari N, Mazori DR, et al. Mepolizumab for refractory eosinophilic fasciitis: a retrospective analysis from two tertiary care centres. Clin Exp Rheumatol 2023;41:1721–2.
[59] Xia R, Liu J, Su T, Xia J, Yin Z. Dupilumab for treatment of eosinophilic fasciitis. Clin Exp Dermatol 2022;47:2298–300.
[60] Teicher BA. TGFβ – directed therapeutics: 2020. Pharmacol Ther 2021;217:107666.

La Revue de médecine interne 40 (2019) 654–663

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

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

Mise au point

Actualités dans la physiopathologie de la sclérodermie systémique : vers de nouvelles opportunités thérapeutiques

Updates in systemic sclerosis pathogenesis: Toward new therapeutic opportunities

K. Didier[a,b], A. Robbins[a,b], F. Antonicelli[b], B.N. Pham[b,c], D. Giusti[b,c], A. Servettaz[a,*,b]

[a] *Service de médecine interne, maladies infectieuses et immunologie clinique, faculté de médecine de Reims, CHU de Reims, 51100 Reims, France*
[b] *EA 7509 Immuno-régulation et remodelage tissulaire dans le cancer et dans les maladies auto-immunes et inflammatoires, université Reims Champagne Ardenne, 51100 Reims, France*
[c] *Laboratoire d'immunologie, faculté de médecine de Reims, CHU de Reims, 51100 Reims, France*

I N F O A R T I C L E

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 11 juillet 2019

Mots clés :
Sclérodermie systémique
Physiopathologie
Traitement

R É S U M É

La sclérodermie systémique est une connectivite rare, caractérisée par une fibrose de la peau et de différents organes internes, une vasculopathie systémique et des anomalies de l'immunité innée et adaptative. Des dysfonctions des fibroblastes, des cellules endothéliales et des lymphocytes, mais également d'autres cellules de l'immunité sont de mieux en mieux décrites, même si l'origine exacte et la chronologie de ces anomalies restent inconnues. Le stress oxydatif semble jouer un rôle clé dans la maladie. Il semble en effet impliqué très précocement dans le développement de la fibrose, de la vasculopathie et dans les anomalies de la tolérance immunitaire observées chez tous les patients, bien que l'expression de la maladie soit très hétérogène. Ce stress semble influencé par des facteurs génétiques et environnementaux. Sur le plan thérapeutique, il n'existe actuellement aucun traitement curatif. Des immunosuppresseurs et des molécules actives sur l'atteinte vasculaire sont proposés dans certains cas avec une efficacité variable d'un patient à l'autre et globalement modérée. Seule l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, réservée aux formes sévères ou rapidement progressives, a montré une régression de la fibrose prolongée ainsi qu'une réduction de la morbi-mortalité, mais expose à une potentielle toxicité. Au cours de la dernière décennie, de nouveaux mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la sclérodermie systémique ont été découverts, offrant de nouvelles perspectives thérapeutiques. Dans cette revue, nous nous proposons de faire le point sur les récentes avancées dans la connaissance de la physiopathologie de la sclérodermie systémique et leurs implications dans la prise en charge thérapeutique, actuelle et future.

© 2019 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Systemic sclerosis
Scleroderma
Pathogenesis
Treatment

A B S T R A C T

Systemic sclerosis is a rare connective tissue disease characterized by skin and several internal organ fibrosis, systemic vasculopathy and immune abnormalities. Even if fibroblasts and endothelial cells dysfunction, as well as lymphocytes and other immune cells implication are now well described, the exact origin and chronology of the disease pathogenesis remain unclear. Oxidative stress, influenced by genetic and environmental factors, seems to play a key role. Indeed, it seems to be implicated in the early phases of fibrosis development, vasculopathy and in immune tolerance abnormalities shared by all patients, although disease expression is heterogeneous. To date, no curative treatment is available. Even if immunosuppressive treatment or drugs acting on vascular system are proposed for some patients, overall,

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : aservettaz@chu-reims.fr (A. Servettaz).

https://doi.org/10.1016/j.revmed.2019.05.016
0248-8663/© 2019 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

treatment efficiency remains modest. Only autologous hematopoietic stem cells transplantation, reserved for patients with severe or rapidly progressive fibrosis, has recently demonstrated efficiency, with lasting regression of fibrosis. Nevertheless, this treatment can expose to important, life-threatening toxicity. In the last decade, new mechanisms implicated in the pathogenesis of systemic sclerosis have been unraveled, bringing new therapeutic opportunities. In this review, we offer to focus on recent insights in the knowledge of systemic sclerosis pathogenesis and its implication in current and future medical care.
© 2019 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abréviations

α-SMA	alpha-smooth muscle actin
APRIL	a proliferation-inducing ligand
ARE	antagonistes des récepteurs de l'endothéline
BAFF	B cell activating factor of the TNF
CB1	cannabinoid receptor 1
CB2	cannabinoid receptor 2
CE	cellules endothéliales
CTGF	connective tissue growth factor
FRO	forme réactive de l'oxygène
HTAP	hypertension artérielle pulmonaire
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL	interleukine
IPDE5	inhibiteur de la phosphodiestérase de type 5
LB	lymphocyte B
LT	lymphocytes T
NO	monoxide d'azote
PDGF	platelet derived growth factor
PID	pneumopathie interstitielle diffuse
PNN	polynucléaires neutrophiles
PTX3	pentraxin 3
ScS	sclérodermie systémique
TGF-β	transforming growth factor-β
TK	tyrosine kinase
UD	ulcérations digitales
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor

La sclérodermie systémique (ScS) est une connectivite rare caractérisée par un processus de fibrose et une vasculopathie. De multiples lésions viscérales impliquant préférentiellement ou non l'un de ces deux processus font la sévérité de cette maladie. Même si la physiopathologie de cette maladie est encore incertaine, de grands progrès ont été faits ces dernières années.

Cette pathologie se caractérise par une dysfonction des cellules endothéliales (CE) et des fibroblastes et par une auto-immunité comme présenté sur la Fig. 1. Certaines prédispositions génétiques et expositions environnementales ont été suggérées pour expliquer, en partie, ces dysfonctionnements cellulaires mais le poids exact de ces facteurs génétiques et environnementaux dans le déclenchement de la maladie demeure controversé. Sur le plan clinique, la maladie est marquée par une grande hétérogénéité, ce qui suggère de grandes variations dans les mécanismes physiopathologiques. Depuis quelques années, la recherche a permis de révéler de nouvelles voies pathogéniques susceptibles d'être impliquées dans la ScS offrant de nouvelles opportunités thérapeutiques (Tableau 1). Certaines molécules candidates sont d'ailleurs déjà utilisées dans d'autres pathologies vasculaires ou inflammatoires [1,2].

Cette revue propose de faire le point sur la compréhension actuelle des mécanismes pathogéniques de cette affection, et les options thérapeutiques actuelles (Tableau 1) et futures (Tableau 2) qui en découlent.

1. Facteurs de risques identifiés ou supposés et impacts thérapeutiques possibles

1.1. Facteurs génétiques

Le plus grand facteur de risque de développer une ScS mis en évidence au cours de ces dernières années semble être la présence d'antécédents familiaux de ScS. Dans la population indienne Choctaw, la prévalence s'élève à près de 660 par million d'habitants, alors qu'elle se situe entre 30 et 240 par million d'habitants dans le reste du monde [3]. Des polymorphismes au sein de plusieurs gènes impliqués dans la régulation de la fibrose ainsi que dans la vasculopathie ont été identifiés tels que les gènes *tgf-b*, *fbn1* (codant pour fibrillin 1), *ctgf* (codant pour le Connective Tissue Growth Factor (CTGF)), *kcna5* (codant pour un canal potassique voltage dépendant) ou bien *upar* (codant pour Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor) [4]. Environ 45 loci semblent impliqués, certains sont également associés à d'autres maladies auto-immunes. Cependant, une faible concordance de survenue de la maladie entre jumeaux mono- et dizygotes suggère que d'autres facteurs tels que des facteurs épigénétiques et environnementaux soient impliqués [5].

1.2. Facteurs épigénétiques

Des modifications épigénétiques ont été mises en évidence dans la ScS, principalement à type de méthylation de l'ADN. Ces modifications ont été observées notamment au niveau des gènes régulant la synthèse de collagène, la signalisation du TGF-β, ou l'activation des lymphocytes T (LT) [6]. Des médicaments modulant la méthylation de l'ADN tel que l'azacitidine actuellement utilisé dans des pathologies hématologiques, pourraient donc avoir un intérêt dans la ScS. Ce type d'approche est également à l'étude dans d'autres pathologies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus systémique [7] (Tableau 2).

1.3. Facteurs environnementaux

Le rôle de la silice dans la pathogénie de la ScS est connu depuis longtemps avec notamment une prévalence élevée de la maladie chez les tailleurs de pierre et les ouvriers des mines d'or. La silice représente le principal facteur de risque extérieur de développer une ScS. La silice est pourvoyeuse de radicaux libres oxygénés [8].

L'imputabilité des solvants organiques a été démontré dans le cadre d'une méta-analyse mais sans qu'aucun solvant ne soit précisément mis en cause [9]. En revanche, l'imputabilité des prothèses mammaires siliconées a été infirmée [10].

Concernant le rôle d'agents infectieux, une similitude entre la protéine UL70 du virus cytomégalovirus (CMV) et l'ADN topoisomérase 1, cible antigénique des anticorps anti-Scl70 a été montrée [11],

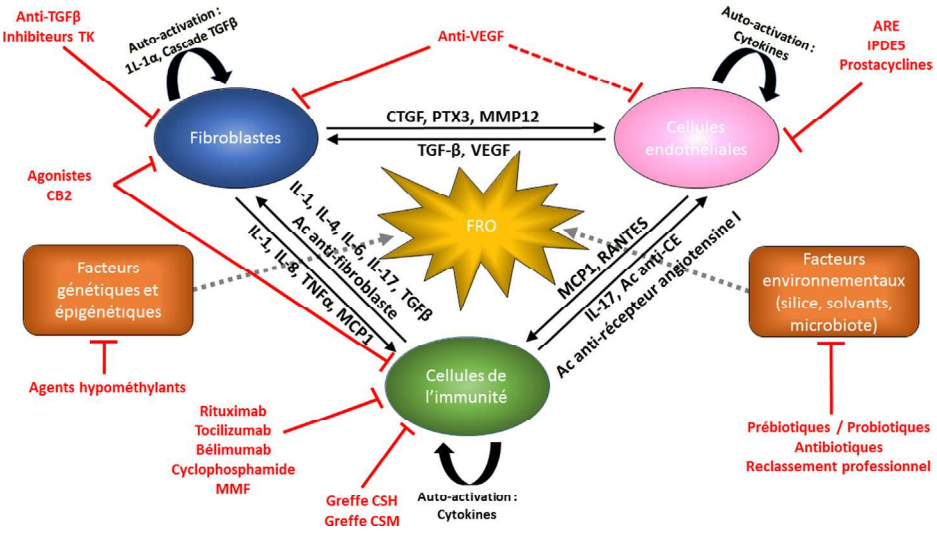


Fig. 1. Physiopathologie de la SSc s'articulant autour de trois axes : fibroblastes, cellules endothéliales et cellules de l'immunité et principales cibles des traitements actuels ou futurs (en rouge). Rôle central des formes réactives de l'oxygène (FRO) ciblant les 3 axes pathologiques. Modulation des propriétés des cellules endothéliales (CE) via les antagonistes des récepteurs de l'endothéline (ARE), les inhibiteurs de la phosphodiestérase de type 5 (IPDE5) et les prostacyclines, effet potentiellement néfaste des anti-VEGF sur les CE (représenté en pointillés). Inhibition de la prolifération et de la synthèse de collagène par les fibroblastes via les anti-TGFβ, les inhibiteurs de tyrosine kinase (TK) et les anti-VEGF. Inhibition de différents acteurs du système immunitaire par le Rituximab, le Tocilizumab, le Bélimumab, le Cyclophosphamide et le Mycophénolate mofétil (MMF). Greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) seul traitement actuellement curatif agissant au niveau du système immunitaire, rôle en cours d'évaluation de la greffe de cellules souches mésenchymateuses (CSM). Action double des agonistes des récepteurs au cannabinoïde (CB2) sur les fibroblastes et le système immunitaire. Possibilité de moduler les facteurs environnementaux via des prébiotiques/probiotiques ou des antibiotiques (agissant sur le microbiote). Modulation des facteurs épigénétiques via l'utilisation d'agents hypométhylants. Ac : anticorps. IL : interleukine.

ainsi qu'une homologie de structure entre la protéine UL94 du CMV et une protéine membranaire (NAG 2) exprimée par les fibroblastes et les CE humains [12]. Il a été démontré que des anticorps anti-UL94 étaient capables, d'une part, d'entraîner une apoptose des CE, et d'autre part, d'induire la transcription de molécules d'adhésion, de cytokines, de TGF-β et de CTGF par les fibroblastes [13].

1.4. Rôle du microbiote

Des anomalies de l'équilibre du microbiote (dysbiose) pourraient participer à la ScS comme au développement d'autres maladies auto-immunes [14]. L'atteinte de la motricité digestive et la prolifération microbienne, fréquentes dans la ScS [15], pourraient favoriser une dysbiose. Cependant, il existe actuellement peu de données dans la ScS. Volkmann et al. ont mis en évidence des différences concernant le microbiote chez 17 patients sclérodermiques comparé à des sujets sains [16]. Andréasson et al. ont également montré que la dysbiose chez les patients sclérodermiques était non seulement fréquente mais également précoce dans la maladie [17]. Ces deux études ont objectivé un déficit en *Faecalibacterium prausnitzii* dans la flore digestive des patients, bactérie ayant un rôle immunorégulateur. La modulation du microbiote via des prébiotiques ou probiotiques dans la ScS, à l'instar d'autres maladies systémiques, pourrait constituer une nouvelle alternative thérapeutique [14]. Des essais thérapeutiques sont nécessaires pour étudier l'efficacité de cette stratégie, qui devra probablement être mise en place très précocement dans le développement de la maladie.

2. Rôle des cellules endothéliales et impacts thérapeutiques possibles

La ScS est une maladie de l'endothélium. Le syndrome de Raynaud lié à une microangiopathie est présent dans plus de 90 % des ScS et précède les autres signes cliniques dans la majorité des cas. Une macro-angiopathie est également fréquente dans la ScS. Environ 10 % des patients développent une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) et environ 5 % une microangiopathie rénale [18,19]. Un dysfonctionnement et des anomalies de l'homéostasie des CE entraînent une altération de la barrière physiologique endothéliale et des anomalies de régulation du tonus vasculaire. L'atteinte de l'endothélium est probablement très précoce et est un facteur majeur dans le développement de la ScS [20].

Au cours de la ScS, on observe une anomalie de régulation du tonus vasculaire avec notamment des concentrations plasmatiques élevées d'endothéline 1. Ce peptide aux propriétés vasoconstrictrices, pourrait concourir au développement de phénomènes ischémiques distaux et à l'apparition d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) [21]. La concentration plasmatique d'endothéline semble être corrélée à la sévérité de la microangiopathie, mais également à la sévérité de l'atteinte d'organe (principalement la fibrose pulmonaire, l'HTAP et la dysfonction rénale) [22]. En effet, outre son rôle dans la vasculopathie, l'endothéline serait capable de stimuler également les fibroblastes [21]. Les effets produits dépendent du récepteur, mais aussi du tissu cible et de la concentration locale en endothéline 1. Il a été démontré qu'en bloquant la liaison de l'endothéline à son récepteur A, une vasodilatation était observée. Cette voie thérapeutique est actuellement utilisée pour la prévention secondaire des ulcères digitaux d'origine ischémique (UD) [23], ainsi que dans le traitement de l'HTAP [24].

Points clés facteurs de risques

- association entre ScS et certains gènes mais poids exacte de ces déterminants génétiques dans le développement pas clairement démontré ;
- rôle d'agents environnementaux (silice et solvants principalement, en l'état actuel des connaissances) ;
- pistes en faveur du rôle du microbiote et de modifications épigénétiques suggérant de nouvelles opportunités thérapeutiques à évaluer.

Tableau 1
Récapitulatif des différents traitements ayant une indication actuellement reconnue dans la sclérodermie systémique (ScS).

Classe Thérapeutique	Molécule	Indication(s) thérapeutique(s)	Effet(s) observé(s)	Niveau de preuve	Réf
ARE	Bosentan	HTAP UD	Amélioration de la dyspnée et test de marche dans l'HTAP Prévention secondaire des UD	A et C[a] B	[23,29]
	Ambrisentan	HTAP	Amélioration de la dyspnée et test de marche dans l'HTAP	A et C[a]	[24,29]
	Macitentan	HTAP	Amélioration d'un critère combiné de morbi-mortalité dans l'HTAP	B et C[a]	[29,109]
IPDE5	Sildenafil	HTAP UD	Amélioration de la dyspnée dans l'HTAP Prévention secondaire des UD (étude négative mais recommandation PNDS et EULAR)	A et C[a] C	[29,110]
	Tadalafil	HTAP	Amélioration de la dyspnée dans l'HTAP	B et C[a]	[24,29]
Prostacyclines	Epoprostenol	HTAP	Amélioration de la dyspnée NYHA et du test de marche dans l'HTAP sévère	A	[29,111]
	Iloprost	UD	Amélioration des phénomènes de Raynaud sévères avec troubles trophiques	B	[112]
	Selexipag	HTAP	Amélioration d'un critère combiné de morbi-mortalité dans l'HTAP non sévère Selexipag en prévention des UD : étude négative	B	[29,113,114]
Activateur guanylate cyclase	Riociguat	HTAP	Amélioration de la dyspnée, du test de marche et de l'index cardiaque dans l'HTAP	B et C[a]	[29,115]
Immuno-supresseurs	Cyclophosphamide	FC FP	Amélioration (limitée) de la fibrose pulmonaire Arrêt de l'évolution de la fibrose si fibrose cutanée rapidement progressive	C	[80,81]
	Mycophénolate mofetil	FC FP	Amélioration (limitée) de la fibrose pulmonaire Amélioration de la fibrose cutanée	C	[81,82]
Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques		FC FP	Amélioration de la fibrose cutanée et des fonctions respiratoires	A	[83–85]

ARE : antagonistes des récepteurs de l'endothéline ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire ; IPDE5 : inhibiteur de la phosphodiestérase de type 5 ; NYHA : classification de le New York Heart Association ; UD : ulcération digitale ; FP : fibrose pulmonaire. FC : fibrose cutanée.
[a] Selon sévérité de l'HTAP.

Chez ces patients sclérodermiques, une perturbation de la cascade rénine-angiotensine est également observée. En effet, il existe une élévation de la concentration sérique de l'angiotensine II ayant un effet vasoconstricteur et une diminution de l'angiotensine (1–7) ayant un effet vasodilatateur [25]. La dérégulation de cette balance aboutit finalement à une vasoconstriction plus importante impliquée dans la crise rénale sclérodermique, justifiant un recours aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion [19].

Le NO est un puissant vasodilatateur or l'expression de la NO synthase semble être diminuée chez les patients, favorisant la vasoconstriction et le phénomène de Raynaud [26]. De plus, un polymorphisme génétique aboutissant à une diminution de la disponibilité du NO pourrait prédisposer à la ScS [27]. Néanmoins, le rôle exact de cette molécule dans la ScS reste encore incertain d'autant que d'autres travaux ont rapporté un excès de NO notamment à la phase précoce de formes diffuses de ScS. En réalité, l'excès de NO semble aussi délétère que le déficit, car il pourrait aboutir à la production de grandes quantités de radicaux libres oxygénés toxiques [28]. La voie du NO représente une cible thérapeutique majeure lors de l'HTAP via les agonistes des récepteurs de l'endothéline, les inhibiteurs de la phosphodiestérase de type 5 et les analogues de la prostacycline [29].

Au cours de la ScS, on observe une libération importante de chimiokines (notamment MCP-1 et RANTES) et de molécules d'adhésion par les CE au début de la maladie, telles que E-Selectine, *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) et *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) [30]. Les concentrations élevées d'E-Selectine et d'ICAM-1 semblent être corrélées à la sévérité de la microangiopathie au niveau de la capillaroscopie [31]. Ces molécules pourraient participer au recrutement de cellules immunitaires.

Dans la ScS, comme au cours d'autres pathologies vasculaires, les concentrations sériques de microparticules endothéliales sont également élevées. Ces microparticules sont des fragments cellulaires issus de CE, et pourraient être impliquées dans la régulation de l'inflammation, la coagulation, l'apoptose et la prolifération cellulaire [32].

Des anomalies de l'angiogenèse et de la vasculogenèse sont bien établies dans cette pathologie, en partie liées à une dérégulation du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), facteur angiogénique impliqué dans la prolifération des CE. Des concentrations élevées de VEGF ont été mesurées dans le sérum de patients ScS et sont inversement corrélées à la présence d'UD [33]. Cependant l'excès de VEGF, comme de NO précédemment rapporté, semble délétère. De même, la synthèse excessive de Pentraxine 3 (PTX3) par les fibroblastes semble impliquée dans les anomalies de l'angiogenèse

Tableau 2
Récapitulatif des différents traitements en cours d'évaluation dans la sclérodermie systémique (ScS).

Classe	Molécule	Potentielle(s) indication(s)	Effet(s) observé(s) chez l'animal	Effet(s) observé(s) chez l'homme	Phase étude (nombre patients)	Réf
Agoniste CB2	Anabasum	FC FP	Prévention de l'apparition de FP et PC ainsi que de l'apparition d'anticorps	Régression de la fibrose cutanée et pulmonaire avec amélioration des fonctions respiratoires	Phase II (27) Phase II (36)	[63–65]
Anti-CD20	Rituximab	FC FP	Réduction FC et disparition des auto-anticorps dans model murin TSK si administré précocement (pas d'efficacité après installation de la FC)	Amélioration de la fibrose cutanée Amélioration des fonctions respiratoires	Série de cas avec revue de la littérature (13 + 40)	[1,90]
Anti-IL-6	Tocilizumab	FC FP	Régression de la FC dans modèle murin bléomycine mais pas dans modèle murin TSK1	Amélioration modérée (non significative) de la FC Mais stabilisation des volumes respiratoires	Phase II (87) Phase III (212)	[2,107,108]
Anti-BAFF	Belimumab	FC	/	Amélioration de la fibrose cutanée (non significative)	Étude pilote (20)	[91]
Anti-TGFβ	Fresolimumab	FC	Inhibition du développement de fibrose au niveau cutané et pulmonaire dans modèle murin bléomycine	Amélioration rapide de la fibrose cutanée dans les formes de ScS rapidement progressives	Étude pilote ouverte (15)	[59,60]
Activateur guanylate cyclase	Riociguat	FC Raynaud	Arrêt du développement de la FC dans 2 modèles murins (TSK1 et bleomycine)	Pas d'amélioration significative du score de Rodnan. Réduction quasi significative des symptômes liés au Raynaud, sans diminution du nombre d'UD	Phase IIb (121)	[76–78]
Inhibiteur de tyrosine kinase	Nintedanib	FC FP	Très bon résultat sur la fibrose et la vasculopathie dans model murin Fra2 de ScS mais complication possible à type d'HTAP	Etude dans la fibrose pulmonaire au cours de ScS versus placebo (SENSCIS): Diminution de la pente de décroissance de la capacité vitale forcée à 52 semaines	Phase III (576 patients randomisés 1:1)	[67–68]
Greffe de cellules souches mésenchymateuses		FC Raynaud	Diminution de la FP dans les modèles murin bléomycine Diminution des marqueurs de stress oxydatif dans les modèles HOCI	Amélioration de la fibrose cutanée et de la vasculopathie sans effet indésirable notable	Séries de cas (9 à 12)	[86]

CB2 : canabinoid receptor 2 ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire ; FC : fibrose cutanée ; FP : fibrose pulmonaire ; UD : ulcération digitale.

[34]. D'autres facteurs avec une action anti-angiogénique comme l'endostatine, la thrombospondine 1 et le CXCL4 pourraient également intervenir [35–37].

Par ailleurs, il existe dans la ScS une diminution du nombre de cellules progénitrices endothéliales circulantes dérivées de la moelle osseuse à la phase initiale de la maladie, ce qui pourrait participer à la vasculopathie [38]. D'autres études orientent plutôt vers une dysfonction [39] ou une apoptose précoce [40] de ces progéniteurs. De plus, les cellules progénitrices des patients exprimeraient préférentiellement des gènes leur conférant des propriétés inflammatoires et d'adhésion [41].

2.1. *Facteurs participant à la dysfonction endothéliale*

Le système immunitaire est directement impliqué dans la dysfonction endothéliale. Des anticorps anti-CE ont été mis en évidence dans la ScS avec une prévalence très variable selon les études et les techniques utilisées [42]. La cible de ces anticorps n'est pas encore bien définie, et leur rôle pathogène n'est pas encore clairement établi. Une étude suggère qu'ils induiraient une surexpression de molécules d'adhésion telles qu'ICAM-1 et favoriseraient l'adhésion des leucocytes aux CE [43], alors qu'une autre laisse penser qu'ils induiraient l'apoptose des CE via le système Fas [44]. Ces anticorps sont associés aux UD ainsi qu'à l'HTAP [42]. D'autres anticorps pouvant jouer un rôle dans la dysfonction des CE ont été décrits, comme les anticorps anti-récepteur de l'endothéline de type A [45] et les anticorps anti-récepteur de l'angiotensine de type 1 [46]. Leur rôle pathogène n'est cependant pas encore totalement éclairci. Ces anticorps sont associés à la survenue d'UD [45]. Outre l'immunité humorale via les auto-anticorps, l'immunité cellulaire via des lymphocytes T CD8+ pourraient également participer à la dysfonction des CE [47].

La dysfonction endothéliale semble étroitement liée à la dysfonction fibroblastique, et il est actuellement difficile de savoir quel type cellulaire est primitivement pathologique. Quoi qu'il en soit, les fibroblastes participent à la dysfonction endothéliale par plusieurs mécanismes, notamment par la synthèse de PTX3 [34] et de CTGF [48].

On observe chez les patients sclérodermiques des perturbations du bilan lipidique avec notamment une augmentation du LDL-cholestérol oxydé [49] par rapport aux patients sains. Ce dernier est pourvoyeur de stress oxydatif et pourrait participer à la dysfonction endothéliale [50].

3. Rôle des fibroblastes et impacts thérapeutiques possibles

L'un des points clés au cours de la sclérodermie est une fibrose du derme, débutant le plus souvent aux extrémités et d'extension variable. Cette fibrose peut également entraîner une défaillance d'organe. Cette fibrose est liée à une dérégulation des fibroblastes et un défaut de dégradation de la matrice extracellulaire.

Points clés cellules endothéliales

- dysfonctionnement et anomalies de l'homéostasie des CE précoces résultant de différents mécanismes : auto-anticorps, interactions avec les fibroblastes, stress oxydatif notamment ;
- anomalies précoces de régulation du tonus vasculaire et de l'angiogenèse avec rôle ambivalent du NO et du VEGF ;
- production excessive d'endothéline 1 et perturbation de la cascade rénine-angiotensine pouvant être des cibles thérapeutiques efficaces dans certaines complications telles que l'HTAP ou la microangiopathie rénale.

3.1. Anomalies actuellement mises en évidence au niveau des fibroblastes

Au cours de la ScS, il existe une synthèse accrue de collagène par les fibroblastes principalement au niveau du derme. L'extension de l'atteinte cutanée (définissant le phénotype diffus ou limité de la maladie) est proportionnelle à la synthèse de collagène. De plus, le dysfonctionnement des fibroblastes semble global, et non limité aux seules zones fibrosées [51].

Les fibroblastes de patients sclérodermiques acquièrent un phénotype particulier de myofibroblastes. Les myofibroblastes sont des cellules exprimant l'alpha-Smooth Muscle Actin (α-SMA) et produisant de grandes quantités de collagène [52]. Elles sont issues de la différenciation des fibroblastes, mais également d'autres cellules telles que des péricytes capillaires [53]. La transformation des fibroblastes en myofibroblastes pourrait être favorisée par le défaut d'expression du facteur de transcription Fli-1 [54] et par certains auto-anticorps anti-fibroblastes dirigés contre le récepteur du Platelet Derived Growth Factor (PDGF) [55]. La pertinence de ces auto-anticorps est néanmoins controversée dans cette pathologie.

Dans la ScS, il existe des anomalies de la cascade du Transforming Growth Factor-β (TGF-β). Le TGF-β est une cytokine stimulant la synthèse de collagène par les fibroblastes [56]. Dans la ScS, le TGF-β semble jouer un rôle surtout dans l'induction de la fibrose plutôt que dans son maintien, notamment via une sécrétion accrue de CTGF [48]. De nombreuses équipes ont mis en évidence une production excessive de TGF-β par les lymphocytes, les CE ainsi que les fibroblastes eux-mêmes chez les patients sclérodermiques [56]. D'autre part, les fibroblastes de ces patients présentent une expression accrue des récepteurs du TGF-β de type I et II sur leur membrane pouvant participer à la dérégulation de la synthèse de collagène [57]. La transduction du signal après liaison du TGF-β à ses récepteurs est également anormale. Cette transduction implique des protéines intra-cytoplasmiques smad. Mory et al. ont montré qu'il existait une accumulation nucléaire anormale de smad 3 dans les fibroblastes sclérodermiques et ce, même en l'absence de stimulation par le TGF-β [58]. Il existe également un défaut de régulation de la signalisation du TGF-β lié à un défaut d'expression de la protéine smad 7 et de Fli-1 [54]. Des études sont par ailleurs en cours pour évaluer l'efficacité de l'inhibition des récepteurs du TGF-β après de bons résultats observés dans un modèle murin de ScS [59,60].

L'accumulation de collagène au niveau de la matrice extracellulaire est également favorisée par l'expression accrue d'ARN messager du gène *PLOD2* qui entraîne une résistance à l'action des métalloprotéases [61]. De plus, les fibroblastes des patients sclérodermiques ont une résistance à l'apoptose par un défaut du système Fas/Fas-ligand participant au maintien de la fibrose [62].

Les cannabinoïdes endogènes exercent de nombreuses fonctions en se liant aux récepteurs *Cannabinoid Receptor 1* (CB1) et 2 (CB2) présents à la surface de nombreuses cellules et notamment des fibroblastes. Dans un modèle murin de ScS proche de la pathologie humaine, l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs CB2 permet de prévenir la survenue de la fibrose cutanée et pulmonaire [63]. Un agoniste des CB2, l'anabasum est en cours d'évaluation chez des patients avec des premiers résultats encourageants concernant la fibrose cutanée [64,65].

Comme vu précédemment, le TGF-β, le PDGF et le VEGF jouent un rôle clé dans la physiopathologie de la ScS. Leurs récepteurs sont des tyrosines kinases (TK) et le fonctionnement de ces derniers semble anormal dans la ScS [66]. Le nintedanib, un inhibiteur de TK, validé dans la fibrose pulmonaire idiopathique, ciblant les récepteurs du PDGF, VEGF et Fibroblast Growth Factor semble prometteur dans un modèle murin Fra2 de ScS [67], et est en cours d'évaluation chez l'homme via le protocole SENSCIS (NCT02597933) [68].

3.2. Facteurs pouvant participer aux dysfonctionnements des fibroblastes

Les cytokines jouent un rôle clé dans le dysfonctionnement des fibroblastes. Outre la dérégulation de la voie du TGF-β citée précédemment, l'interleukine-4 (IL-4) joue un rôle important dans la dysfonction fibroblastique. En effet, il a été démontré que l'IL-4 stimule la croissance des fibroblastes et augmente le dépôt de collagène dans la matrice extracellulaire. Il a été mis en évidence chez les patients une quantité accrue d'IL-4 au niveau du plasma, ainsi qu'une expression accrue par les fibroblastes, les cellules mononucléées du sang périphérique et par certains lymphocytes T présents dans le derme, exprimant à la fois la molécule CD4 et la molécules CD8 [69]. Dans les pneumopathies interstitielles diffuses (PID) compliquant la ScS, l'alvéolite lymphocytaire observée est constituée principalement de lymphocytes T CD8+ capables de sécréter une quantité accrue d'ARNm codant pour l'IL-4 [70].

L'immunité adaptative participe également aux dysfonctionnements des fibroblastes, notamment en influençant l'environnement cytokinique [71]. Certains anticorps anti-fibroblastes pourraient également jouer un rôle en induisant une production accrue de chimiokines pro-fibrotiques par les fibroblastes [72].

Les CE influent sur les fibroblastes notamment via la sécrétion de TGF-β [73] et de VEGF [74] stimulant la synthèse de collagène. Comme dit précédemment, les CE secrètent des chimiokines impliquées à la fois dans la vasculopathie et dans la fibrose [21]. De plus, via l'action de TGF-β et d'endothéline-1, certaines CE pourraient acquérir des propriétés fibroblastiques au cours d'une transition endothélio-mésenchymateuse et participer ainsi à la fibrose [75]. Par ailleurs le riociguat, une molécule activatrice de la guanylate cyclase utilisée dans l'HTAP, semble également pouvoir exercer un effet bénéfique sur la fibrose venant renforcer l'hypothèse d'un lien étroit entre fibroblaste et CE [76]. Ce traitement est actuellement évalué dans le protocole RISE (NCT02283762) mais les effets observés chez l'animal ne semblent pas retrouvés chez l'homme [77,78].

4. Rôle de l'immunité et impacts thérapeutiques possibles

La ScS est habituellement classée parmi les maladies auto-immunes systémiques compte-tenu de la présence chez la majorité des patients d'auto-anticorps anti-nucléaires reconnaissant différentes cibles antigéniques incomplètement identifiées. Cependant, le rôle de la plupart de ces auto-anticorps n'est pas établi dans la physiopathogénie de la maladie, l'auto-immunité semble plutôt être secondaire à des modifications antigéniques que directement à l'origine des lésions. Récemment certains auto-anticorps ciblant différents récepteurs ont été mis en évidence dans des

Points clés fibroblastes

- synthèse excessive de collagène et acquisition d'un phénotype de myofibroblaste ;
- dysfonctionnement des fibroblastes lié à des anomalies intrinsèques, mais aussi à des stimuli extrinsèques (cytokines, principalement IL-4 et TGF-β, stress oxydatif et auto-anticorps) ;
- rôle important du TGF-β dans la fibrose : production excessive de cette cytokine et anomalies intrinsèques de la cascade de signalisation fibroblastique ;
- synthèse d'une matrice extra-cellulaire résistante à l'action des métalloprotéases via PLOD-2 et résistance des fibroblastes à l'apoptose via le système Fas/Fas-ligand ;
- dysfonction des TK au niveau des récepteurs du PDGF et VEGF pouvant être des cibles thérapeutiques.

sous-groupes de patients et pourraient moduler la fonction des CE et/ou des fibroblastes. Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle du système immunitaire dans la ScS. Les lymphocytes B (LB) [79], mais aussi certaines populations de lymphocytes T et des acteurs de l'immunité innée pourraient être impliqués. Des immunosuppresseurs comme le cyclophosphamide ou le mycophénolate mofetil sont utilisés, principalement dans les PID, même si les effets observés sont plutôt modestes [80–82]. A l'heure actuelle, le seul traitement ayant montré une réduction de la morbi-mortalité dans la sclérodermie est la transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques [83–85]. Cependant cette option thérapeutique reste réservée aux patients rapidement progressifs avec complication(s) viscérale(s) relativement sévère(s) et n'est pas dénuée d'effets indésirables. La transplantation de cellules souches mésenchymateuses semblent également prometteuse avec comme principal avantage une bonne tolérance [86].

4.1. Anomalies des lymphocytes B

Il existe au cours de la sclérodermie un défaut de l'homéostasie des LB avec une expression accrue de CD19 (stimulant le signal de *B Cell Receptor* (BCR)) possiblement en rapport avec une sécrétion accrue de *B Cell Activating Factor of the TNF* (BAFF), et d'autre part, une expression diminuée de CD22, impliqué dans la régulation négative de CD19 [87]. La régulation de la survie des LB est altérée en raison d'un excès de production des facteurs de croissance BAFF et APRIL (*A Proliferation-Inducing Ligand*). La production de ces facteurs de croissance est corrélée à la concentration d'immunoglobulines sériques, à la sévérité de l'atteinte cutanée (pour BAFF) et à la survenue d'une atteinte pulmonaire (pour APRIL) [88,89]. Par ailleurs, la déplétion B précoce dans un modèle murin TSK de ScS est associée à une diminution de la fibrose cutanée et à la disparition d'auto-anticorps [90]. En conséquence, le belimumab, un anticorps monoclonal dirigé contre BAFF, et le rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, sont sources d'espoir thérapeutique [1,91].

La majorité des patients développent précocement des auto-anticorps. Certains sont assez spécifiques et connus de longue date mais ne semblent pas avoir de rôle pathogène direct comme les anticorps anti-centromères, anti-topoisomérase I (également appelés anti-Scl70), anti-ARN polymérase III, anti-Pm/Scl, anti-U1RNP, anti-U3RNP (également appelés anti-fibrillarine), anti-Ku et anti-Th/To [92]. D'autres anticorps pourraient avoir un rôle pathogène comme les anticorps anti-récepteur de l'angiotensine II de type 1 [46], anti-récepteur de l'endothéline de type A [45], anti-récepteur du PDGF [55], anti-fibroblastes [72] et anti-CE [42]. Comme dit précédemment, la voie endogène des cannabinoïdes est perturbée dans ScS et les récepteurs CB1 et CB2 sont présents sur les LB. Le fait d'inhiber cette voie permet de prévenir l'apparition d'anticorps spécifiques de la ScS dans un modèle murin proche de la pathologie humaine [63]. Il s'agit d'une nouvelle approche thérapeutique ciblant également le système immunitaire, actuellement en cours d'évaluation dans la ScS avec des résultats prometteurs [64,65].

4.2. Anomalies concernant l'immunité cellulaire et l'environnement cytokinique

Les LT semblent impliqués dès la phase précoce de la maladie. En effet, il a été mis en évidence une infiltration précoce des LT principalement de type CD4+ dans le derme des patients, dont l'importance semble corrélée à la durée d'évolution de la maladie et au score de fibrose (Rodnan) [93]. De plus, l'expansion lymphocytaire T αβ dans le derme des patients sclérodermiques est oligoclonale, et non polyclonale, laissant supposer l'implication d'antigènes particuliers à l'origine de cette infiltration dermique [94]. Ces antigènes ne sont pas identifiés à l'heure actuelle.

Certaines sous-populations dermiques de LT participent à l'excès de production d'IL-4 et d'IL-13 [95,96]. L'IL-4 semble également produite en excès par les LT CD8+ intra-alvéolaires en cas de PID [70]. Les concentrations d'IL-17 sont significativement plus élevées au niveau du sang périphérique, des lésions cutanées de fibrose et des lésions pulmonaires de patients sclérodermiques par rapport aux sujets sains [97–99]. Cette cytokine favorise la synthèse excessive de collagène par les fibroblastes, et participe aux dysfonctions de l'endothélium [98,100].

4.3. Implication des cellules de l'immunité innée

L'immunité innée, moins étudiée dans la ScS jusqu'à présent semble également jouer un rôle dans la physiopathologie de cette maladie. Une infiltration précoce de macrophages et de polynucléaires neutrophiles (PNN), au niveau du derme des patients a été mise en évidence, principalement dans les formes diffuses et au niveau des poumons lors de PID [101,102]. Les macrophages activés secrètent des formes réactives de l'oxygène (FRO) ainsi que différentes cytokines et expriment des marqueurs particuliers (à la fois de type M1 et M2) leur conférant un phénotype particulier qui semble assez spécifique à la maladie [103,104]. Des modifications qualitatives et fonctionnelles des mastocytes au niveau des lésions fibrosantes ont également été mises en évidence. Ces cellules pourraient jouer un rôle dans la pérennité du processus de fibrose [105].

L'implication exacte des PNN au cours de la sclérodermie reste encore à préciser. Ils pourraient participer au dysfonctionnement des CE et des fibroblastes via une production excessive de FRO et d'IL-6 [106]. Cette cytokine fait l'objet d'essai thérapeutique dans la ScS après des résultats encourageants sur la fibrose cutanée dans un modèle murin de ScS [107]. Malheureusement, ces résultats ne sont pas observés chez l'homme mais en revanche on retrouve une stabilisation des fonctions respiratoires sous tocilizumab [2,108].

5. Conclusion et perspectives thérapeutiques

Depuis plusieurs années, la compréhension de la physiopathologie de la ScS ne cesse de s'améliorer. Les cellules et médiateurs impliqués dans la physiopathologie sont récapitulés sur la Fig. 1 avec les principales cibles thérapeutiques qui en découlent. Cette maladie s'articule autour de 3 acteurs que sont les fibroblastes, les CE et les cellules immunitaires. Chacun de ces acteurs influence les autres notamment par le biais de cytokines, bien que l'on ignore toujours précisément le facteur déclenchant initial. De nombreux travaux chez l'homme et dans des modèles animaux

Points clés immunité

- rôle clé de plusieurs acteurs du système immunitaire à la fois dans les processus de vasculopathie et de fibrose ;
- anomalies précoces de la tolérance avec production d'auto-anticorps : potentiel intérêt du rituximab ;
- rôle important des cytokines BAFF et APRIL, pouvant être inhibées pas des anticorps monoclonaux (belimumab) ;
- implication de l'immunité cellulaire et production en excès de certaines cytokines : IL-4 et IL-13, IL-6, ainsi qu'IL-17 offrant des opportunités thérapeutiques ;
- rôle de l'immunité innée reste encore à éclaircir mais présence de macrophages et de polynucléaires neutrophiles dans les organes atteints ;
- transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques : seul traitement ayant montré une réduction de la morbi-mortalité.

pourraient suggérer un rôle clé du stress oxydatif dans le déclenchement et l'extension de la maladie. Une production endogène excessive de FRO, associée à un défaut d'origine génétique des systèmes anti-oxydants (notamment dépendant de nrf2) a été récemment mise en évidence dans un modèle animal [109]. Sur le plan thérapeutique, de nombreuses études semblent prometteuses en phase pré-clinique dans des modèles murins de ScS mais les essais chez l'homme s'avèrent la plupart du temps décevants ; et à l'heure actuelle le seul traitement ayant permis une amélioration de la morbi-mortalité dans la maladie humaine est la transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques. Cependant ce traitement ne peut être proposé à tous les patients et entraîne potentiellement des effets secondaires importants. Si le rôle central du stress oxydatif était confirmé dans la maladie humaine, cela pourrait être une cible thérapeutique particulièrement intéressante car impliqué précocement dans la dysfonction des fibroblastes, des CE et des cellules immunitaires.

Contribution des auteurs

Kévin Didier : conception du projet, rédaction du manuscrit initial, relecture/révisions du manuscript.

Ailsa Robbins : rédaction du manuscrit initial.

Frank Antonicelli : rédaction du manuscrit initial.

Bach Nga Pham : rédaction du manuscrit initial.

Delphine Giusti : rédaction du manuscrit initial.

Amélie Servettaz : conception du projet, rédaction du manuscrit initial, relecture/révisions du manuscrit.

Tous les auteurs ont relu et approuvé cette dernière version.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

[1] Thiebaut M, Launay D, Rivière S, Mahévas T, Bellakhal S, Hachulla E, et al. Efficacy and safety of rituximab in systemic sclerosis: French retrospective study and literature review. Autoimmun Rev 2018;17(6):582–7.

[2] Khanna D, Lin CJF, Kuwana M, Allanore Y, Batalov A, Butrimiene I, et al. Efficacy and Safety of Tocilizumab for the Treatment of Systemic Sclerosis: Results from a Phase 3 Randomized Controlled Trial. Arthritis Rheumatol 2018;70(suppl 10).

[3] Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. Autoimmun Rev 2010;9(5):A311–8.

[4] Ramos PS, Silver RM, Feghali-Bostwick CA. Genetics of systemic sclerosis: recent advances. Curr Opin Rheumatol 2015;27(6):521–9.

[5] Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. Arthritis Rheum 2003;48(7):1956–63.

[6] Altorok N, Kahaleh B. Epigenetics and systemic sclerosis. Semin Immunopathol 2015;37(5):453–62.

[7] Ahmadi M, Gharibi T, Dolati S, Rostamzadeh D, Aslani S, Baradaran B, et al. Epigenetic modifications and epigenetic based medication implementations of autoimmune diseases. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother 2017;87:596–608.

[8] Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. Free Radic Biol Med 2003;34(12):1507–16.

[9] Kettaneh A, Al Moufti O, Tiev KP, Chayet C, Tolédano C, Fabre B, et al. Occupational exposure to solvents and gender-related risk of systemic sclerosis: a metaanalysis of case-control studies. J Rheumatol 2007;34(1):97–103.

[10] Janowsky EC, Kupper LL, Hulka BS. Meta-analyses of the relation between silicone breast implants and the risk of connective-tissue diseases. N Engl J Med 2000;342(11):781–90.

[11] Muryoi T, Kasturi KN, Kafina MJ, Cram DS, Harrison LC, Sasaki T, et al. Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes. J Exp Med 1992;175(4):1103–9.

[12] 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 2000;6(10):1183–6.

[13] 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 2006;3(1):e2.

[14] Rosser EC, Mauri C. A clinical update on the significance of the gut microbiota in systemic autoimmunity. J Autoimmun 2016;74:85–93.

[15] Marie I, Ducrotté P, Denis P, Menard J-F, Levesque H. Small intestinal bacterial overgrowth in systemic sclerosis. Rheumatol Oxf Engl 2009;48(10):1314–9.

[16] Volkmann ER, Chang Y-L, Barroso N, Furst DE, Clements PJ, Gorn AH, et al. Association of systemic sclerosis with a unique colonic microbial consortium. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ 2016;68(6):1483–92.

[17] Andréasson K, Alrawi Z, Persson A, Jönsson G, Marsal J. Intestinal dysbiosis is common in systemic sclerosis and associated with gastrointestinal and extraintestinal features of disease. Arthritis Res Ther 2016;18(1):278.

[18] Launay D, Sobanski V. Dépistage de l'hypertension pulmonaire au cours de la sclérodermie systémique : une stratégie optimale encore à définir. Rev Med Interne 2017;38(8):499–501.

[19] Guillevin L, Mouthon L. Scleroderma renal crisis. Rheum Dis Clin North Am 2015;41(3):475–88.

[20] Chora I, Romano E, Manetti M, Mazzotta C, Costa R, Machado V, et al. Evidence for a derangement of the microvascular system in patients with a very early diagnosis of systemic sclerosis. J Rheumatol 2017;44(8):1190–7.

[21] Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, et al. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets–a marker of fibrosis or vascular dysfunction? J Rheumatol 1994;21(10):1838–44.

[22] 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 2005;24(2):111–6.

[23] Agard C, Carpentier PH, Mouthon L, Clerson P, Gressin V, Bérezné A, et al. Use of bosentan for digital ulcers related to systemic sclerosis: a real-life retrospective French study of 89 patients treated since specific approval. Scand J Rheumatol 2014;43(5):398–402.

[24] Galiè N, Barberà JA, Frost AE, Ghofrani H-A, Hoeper MM, McLaughlin VV, et al. Initial Use of Ambrisentan plus Tadalafil in Pulmonary Arterial Hypertension. N Engl J Med 2015;373(9):834–44.

[25] Pignone A, Rosso AD, Brosnihan KB, Perfetto F, Livi R, Fiori G, et al. Reduced circulating levels of angiotensin-(1-7) in systemic sclerosis: a new pathway in the dysregulation of endothelial-dependent vascular tone control. Ann Rheum Dis 2007;66(10):1305–10.

[26] Allanore Y, Borderie D, Hilliquin P, Hernvann A, Levacher M, Lemaréchal H, et al. Low levels of nitric oxide (NO) in systemic sclerosis: inducible NO synthase production is decreased in cultured peripheral blood monocyte/macrophage cells. Rheumatol Oxf Engl 2001;40(10):1089–96.

[27] Sinici I, Kalyoncu U, Karahan S, Kiraz S, Atalar E. Endothelial nitric oxide gene polymorphism and risk of systemic sclerosis: predisposition effect of T-786C promoter and protective effect of 27 bp repeats in Intron 4. Clin Exp Rheumatol 2010;28(2):169–75.

[28] Herrick AL, Matucci Cerinic M. The emerging problem of oxidative stress and the role of antioxidants in systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol 2001;19(1):4–8.

[29] Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A. et al., 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Heart J 2016;37(1):67–119.

[30] Distler JHW, Jüngel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, Gay RE, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102(8):2892–7.

[31] 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 2004;37(9):1423–7.
[32] Maugeri N, Capobianco A, Rovere-Querini P, Ramirez GA, Tombetti E, Valle PD, et al. Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis. Sci Transl Med 2018;10(451.).
[33] Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, Cipriani P, Conforti ML, Guiducci S, et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. Arthritis Res 2002;4(6):R11.
[34] Shirai Y, Okazaki Y, Inoue Y, Tamura Y, Yasuoka H, Takeuchi T, et al. Elevated levels of pentraxin 3 in systemic sclerosis: associations with vascular manifestations and defective vasculogenesis. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ 2015;67(2):498–507.
[35] Hebbar M, Peyrat JP, Hornez L, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B. Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2000;43(4):889–93.
[36] Macko RF, Gelber AC, Young BA, Lowitt MH, White B, Wigley FM, et al. Increased circulating concentrations of the counteradhesive proteins SPARC and thrombospondin-1 in systemic sclerosis (scleroderma). Relationship to platelet and endothelial cell activation. J Rheumatol 2002;29(12):2565–70.
[37] 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(5):433–43.
[38] Andrigueti FV, Arismendi MI, Ebbing PCC, Kayser C. Decreased numbers of endothelial progenitor cells in patients in the early stages of systemic sclerosis. Microvasc Res 2015;98:82–7.
[39] Avouac J, Juin F, Wipff J, Couraud PO, Chiocchia G, Kahan A, et al. Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity. Ann Rheum Dis 2008;67(10):1455–60.
[40] Zhu S, Evans S, Yan B, Povsic TJ, Tapson V, Goldschmidt-Clermont PJ, et al. Transcriptional regulation of Bim by FOXO3a and Akt mediates scleroderma serum-induced apoptosis in endothelial progenitor cells. Circulation 2008;118(21):2156–65.
[41] Avouac J, Cagnard N, Distler JH, Schoindre Y, Ruiz B, Couraud PO, et al. Insights into the pathogenesis of systemic sclerosis based on the gene expression profile of progenitor-derived endothelial cells. Arthritis Rheum 2011;63(11):3552–62.
[42] Negi VS, Tripathy NK, Misra R, Nityanand S. Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. J Rheumatol 1998;25(3):462–6.
[43] Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. J Clin Invest 1996;97(1):111–9.
[44] Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. Arthritis Rheum 2000;43(11):2550–62.
[45] Avouac J, Riemekasten G, Meune C, Ruiz B, Kahan A, Allanore Y. Autoantibodies against endothelin 1 type a receptor are strong predictors of digital ulcers in systemic sclerosis. J Rheumatol 2015;42(10):1801–7.
[46] Günther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, et al. Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. Arthritis Res Ther 2014;16(2):R65.
[47] Ayano M, Tsukamoto H, Kohno K, Ueda N, Tanaka A, Mitoma H, et al. Increased CD226 Expression on CD8+ T Cells Is Associated with Upregulated Cytokine Production and Endothelial Cell Injury in Patients with Systemic Sclerosis. J Immunol Baltim Md 1950 2015;195(3):892–900.
[48] Abraham D. Connective tissue growth factor: growth factor, matricellular organizer, fibrotic biomarker or molecular target for anti-fibrotic therapy in SSc? Rheumatol Oxf Engl 2008;47(Suppl 5):v8–9.
[49] Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Impaired angiogenesis in systemic sclerosis: the emerging role of the antiangiogenic VEGF(165)b splice variant. Trends Cardiovasc Med 2011;21(7):204–10.
[50] Manetti M, Guiducci S, Romano E, Ceccarelli C, Bellando-Randone S, Conforti ML, et al. Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. Circ Res 2011;109(3):e14–26.
[51] Claman HN, Giorno RC, Seibold JR. Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma. The myth of the « uninvolved skin ». Arthritis Rheum 1991;34(12):1495–501.
[52] Kirk TZ, Mark ME, Chua CC, Chua BH, Mayes MD. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. J Biol Chem 1995;270(7):3423–8.
[53] Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. Arthritis Res Ther 2005;7(5):R1113–23.
[54] Manetti M. Fli1 deficiency and beyond: a unique pathway linking peripheral vasculopathy and dermal fibrosis in systemic sclerosis. Exp Dermatol 2015;24(4):256–7.
[55] 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 2006;354(25):2667–76.
[56] Cotton SA, Herrick AL, Jayson MI, Freemont AJ. TGF beta – a role in systemic sclerosis? J Pathol 1998;184(1):4–6.
[57] Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. J Invest Dermatol 1998;110(1):47–51.
[58] Mori Y, Chen S-J, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. Arthritis Rheum 2003;48(7):1964–78.
[59] Rice LM, Padilla CM, McLaughlin SR, Mathes A, Ziemek J, Goummih S, et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. J Clin Invest 2015;125(7):2795–807.
[60] Lakos G, Takagawa S, Chen S-J, Ferreira AM, Han G, Masuda K, et al. Targeted disruption of TGF-beta/Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma. Am J Pathol 2004;165(1):203–17.
[61] van der Slot AJ, Zuurmond A-M, Bardoel AFJ, Wijmenga C, Pruijs HEH, Sillence DO, et al. Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. J Biol Chem 2003;278(42):40967–72.
[62] Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. Arthritis Rheum 2001;44(7):1667–76.
[63] Servettaz A, Kavian N, Nicco C, Deveaux V, Chéreau C, Wang A, et al. Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. Am J Pathol 2010;177(1):187–96.
[64] Spiera RF, Hummers LK, Chung L, Frech TM, Domsic RT, Hsu V, et al. A Phase 2 Study of Safety and Efficacy of Anabasum (JBT-101), a Cannabinoid Receptor Type 2 Agonist, in Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. Arthritis Rheumatol 2017;69(suppl 10).
[65] Spiera RF, Hummers LK, Chung L, Frech TM, Domsic RT, Hsu V, et al. Safety and Efficacy of Lenabasum in an Open-Label Extension of a Phase 2 Study in Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis Subjects. Arthritis Rheumatol 2018;70(suppl 10).
[66] Beyer C, Distler JHW, Distler O. Are tyrosine kinase inhibitors promising for the treatment of systemic sclerosis and other fibrotic diseases? Swiss Med Wkly 2010;140:w13050.
[67] Huang J, Maier C, Zhang Y, Soare A, Dees C, Beyer C, et al. Nintedanib inhibits macrophage activation and ameliorates vascular and fibrotic manifestations in the Fra2 mouse model of systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2017;76(11):1941–8.
[68] Distler O, Highland KB, Gahlemann M, Azuma A, Fischer A, Mayes M D, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. N Engl J Med 2019;380(26):2518–28.
[69] Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer J-M, Roosnek E, Chizzolini C. Presence of CD4+ CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2007;56(10):3459–67.
[70] Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, et al. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1999;42(6):1168–78.
[71] 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.
[72] Fineschi S, Goffin L, Rezzonico R, Cozzi F, Dayer J-M, Meroni PL, et al. Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. Arthritis Rheum 2008;58(12):3913–23.
[73] Wermuth PJ, Carney KR, Mendoza FA, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial cell-specific activation of transforming growth factor-β signaling in mice induces cutaneous, visceral, and microvascular fibrosis. Lab Investig J Tech Methods Pathol 2017;97(7):806–18.
[74] Maurer B, Distler A, Suliman YA, Gay RE, Michel BA, Gay S, et al. Vascular endothelial growth factor aggravates fibrosis and vasculopathy in experimental models of systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2014;73(10):1880–7.
[75] 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 2017;76(5):924–34.
[76] Beyer C, Reich N, Schindler SC, Akhmetshina A, Dees C, Tomcik M, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. Ann Rheum Dis 2012;71(6):1019–26.
[77] Khanna D, Allanore Y, Denton CP, Kuwana M, Matucci-Cerinic M, Pope JE, et al. The Effects of Riociguat on Raynaud's Phenomenon and Digital Ulcers in Patients with Diffuse Systemic Sclerosis: Results from the Phase IIb RISE-SSc Study. Arthritis Rheumatol 2018;70(suppl 10).
[78] Distler O, Allanore Y, Denton CP, Kuwana M, Matucci-Cerinic M, Pope JE, et al. Riociguat in Patients with Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase IIb Study (RISE-SSc). Arthritis Rheumatol 2018;70(suppl 10).
[79] Sanges S, Guerrier T, Launay D, Lefèvre G, Labalette M, Forestier A, et al. Role of B cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. Rev Med Interne 2017;38(2):113–24.

[80] Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. N Engl J Med 2006;354(25):2655–66.
[81] Namas R, Tashkin DP, Furst DE, Wilhalme H, Tseng C-H, Roth MD, et al. Efficacy of Mycophenolate Mofetil and Oral Cyclophosphamide on Skin Thickness: Post Hoc Analyses From Two Randomized Placebo-Controlled Trials. Arthritis Care Res 2018;70(3):439–44.
[82] Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, Furst DE, Khanna D, Kleerup EC, et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. Lancet Respir Med 2016;4(9):708–19.
[83] Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, McSweeney PA, Pinckney A, Welch B, et al. Myeloablative autologous stem-cell transplantation for severe scleroderma. N Engl J Med 2018;378(1):35–47.
[84] Burt RK, Shah SJ, Dill K, Grant T, Gheorghiade M, Schroeder J, et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial. Lancet Lond Engl 2011;378(9790):498–506.
[85] van Laar JM, Farge D, Sont JK, Naraghi K, Marjanovic Z, Larghero J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: A Randomized Clinical Trial. JAMA 2014;311(24):2490–8.
[86] Rozier P, Maria A, Goulabchand R, Jorgensen C, Guilpain P, Noël D. Mesenchymal stem cells in systemic sclerosis: allogenic or autologous approaches for therapeutic use? Front Immunol 2018;9:2938.
[87] Soto L, Ferrier A, Aravena O, Fonseca E, Berendsen J, Biere A, et al. Systemic Sclerosis patients present alterations in the expression of molecules involved in B-Cell regulation. Front Immunol 2015;6:496.
[88] Lanteri A, Sobanski V, Langlois C, Lefèvre G, Hauspie C, Sanges S, et al. Serum free light chains of immunoglobulins as biomarkers for systemic sclerosis characteristics, activity and severity. Autoimmun Rev 2014;13(9):974–80.
[89] Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, Tanaka C, Kumada S, Ogawa F, et al. Elevated serum APRIL levels in patients with systemic sclerosis: distinct profiles of systemic sclerosis categorized by APRIL and BAFF. J Rheumatol 2007;34(10):2056–62.
[90] Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, Bouaziz J-D, Uchida J, Fujimoto M, et al. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. Am J Pathol 2006;169(3):954–66.
[91] Gordon JK, Martyanov V, Franks JM, Bernstein EJ, Szymonifka J, Magro C, et al. Belimumab for the Treatment of Early Diffuse Systemic Sclerosis: Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Trial. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ 2018;70(2):308–16.
[92] Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F, et al. Autoantibodies associated with connective tissue diseases: what meaning for clinicians? Front Immunol 2018;9:541.
[93] Roumm AD, Whiteside TL. Medsger TA, Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. Arthritis Rheum 1984;27(6):645–53.
[94] Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD, Oligoclonal T. cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. J Immunol Baltim Md 1950 2002;168(7):3649–59.
[95] Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, et al. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. Am J Pathol 1997;151(6):1751–8.
[96] Sunderkötter C, Riemekasten G. Pathophysiology and clinical consequences of Raynaud's phenomenon related to systemic sclerosis. Rheumatol Oxf Engl 2006;45(Suppl 3):iii33–5.
[97] Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2000;43(11):2455–63.
[98] Xing X, Yang J, Yang X, Wei Y, Zhu L, Gao D, et al. IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway. PloS One 2013;8(12):e85032.
[99] Rodríguez-Reyna TS, Furuzawa-Carballeda J, Cabiedes J, Fajardo-Hermosillo LD, Martínez-Reyes C, Díaz-Zamudio M, et al. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. Rheumatol Int 2012;32(9):2653–60.
[100] Chizzolini C, Parel Y, De Luca C, Tyndall A, Akesson A, Scheja A, et al. Systemic sclerosis Th2 cells inhibit collagen production by dermal fibroblasts via membrane-associated tumor necrosis factor alpha. Arthritis Rheum 2003;48(9):2593–604.
[101] Ishikawa O, Ishikawa H. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. J Rheumatol 1992;19(8):1202–6.
[102] Rossi GA, Bitterman PB, Rennard SI, Ferrans VJ, Crystal RG. Evidence for chronic inflammation as a component of the interstitial lung disease associated with progressive systemic sclerosis. Am Rev Respir Dis 1985;131(4):612–7.
[103] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 2004;25(12):677–86.
[104] Lescoat A, Ballerie A, Jouneau S, Fardel O, Vernhet L, Jego P, et al. M1/M2 polarisation state of M-CSF blood-derived macrophages in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2018, http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214333 [Epub ahead of print].
[105] Yamamoto T, Takahashi Y, Takagawa S, Katayama I, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice. J Rheumatol 1999;26(12):2628–34.
[106] Barnes TC, Spiller DG, Anderson ME, Edwards SW, Moots RJ. Endothelial activation and apoptosis mediated by neutrophil-dependent interleukin 6 trans-signalling: a novel target for systemic sclerosis? Ann Rheum Dis 2011;70(2):366–72.
[107] Desallais L, Avouac J, Fréchet M, Elhai M, Ratsimandresey R, Montes M, et al. Targeting IL-6 by both passive or active immunization strategies prevents bleomycin-induced skin fibrosis. Arthritis Res Ther 2014;16(4):R157.
[108] Khanna D, Denton CP, Lin CJF, van Laar JM, Frech TM, Anderson ME, et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in systemic sclerosis: results from the open-label period of a phase II randomised controlled trial (faSScinate). Ann Rheum Dis 2018;77(2):212–20.
[109] Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galiè N, Ghofrani H-A, et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med 2013;369(9):809–18.
[110] Hachulla E, Hatron P-Y, Carpentier P, Agard C, Chatelus E, Jego P, et al. Efficacy of sildenafil on ischaemic digital ulcer healing in systemic sclerosis: the placebo-controlled SEDUCE study. Ann Rheum Dis 2016;75(6):1009–15.
[111] Badesch DB, Tapson VF, McGoon MD, Brundage BH, Rubin LJ, Wigley FM, et al. Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A Randomized, Controlled Trial. Ann Intern Med 2000;132(6):425–34.
[112] Ingegnoli F, Schioppo T, Allanore Y, Caporali R, Colaci M, Distler O, et al. Practical suggestions on intravenous iloprost in Raynaud's phenomenon and digital ulcer secondary to systemic sclerosis: Systematic literature review and expert consensus. Semin Arthritis Rheum 2019;48(4):686–93.
[113] Denton CP, Hachulla É, Riemekasten G, Schwarting A, Frenoux J-M, Frey A, et al. Efficacy and Safety of Selexipag in Adults With Raynaud's Phenomenon Secondary to Systemic Sclerosis: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase II Study. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ 2017;69(12):2370–9.
[114] Gaine S, Chin K, Coghlan G, Channick R, Di Scala L, Galiè N, et al. Selexipag for the treatment of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. Eur Respir J 2017;50(2).
[115] Humbert M, Coghlan JG, Ghofrani H-A, Grimminger F, He J-G, Riemekasten G, et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease: results from PATENT-1 and PATENT-2. Ann Rheum Dis 2017;76(2):422–6.

frontiers in Immunology

REVIEW
published: 26 March 2018
doi: 10.3389/fimmu.2018.00541

Autoantibodies Associated With Connective Tissue Diseases: What Meaning for Clinicians?

Kevin Didier[1], Loïs Bolko[2], Delphine Giusti[3,4], Segolene Toquet[5], Ailsa Robbins[1], Frank Antonicelli[3,6] and Amelie Servettaz[1,3]*

[1] Department of Internal Medicine, Infectious Diseases, and Clinical Immunology, Reims Teaching Hospitals, Robert Debré Hospital, Reims, France, [2] Rheumatology Department, Maison Blanche Hospital, Reims University Hospitals, Reims, France, [3] Laboratory of Dermatology, Faculty of Medicine, EA7319, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, France, [4] Laboratory of Immunology, Reims University Hospital, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, France, [5] Department of Internal Medicine, CHU de Reims, Reims, France, [6] Department of Biological Sciences, Immunology, UFR Odontology, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Ralf J. Ludwig, University of Lübeck, Germany

Reviewed by:
Kayo Masuko, Sanno Medical Center, Japan
Maurizio Acampa, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Italy
Cheng-De Yang, Ruijin Hospital, China

***Correspondence:**
Frank Antonicelli
frank.antonicelli@univ-reims.fr

Specialty section:
This article was submitted to Immunological Tolerance and Regulation, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: *15 January 2018*
Accepted: *02 March 2018*
Published: *26 March 2018*

Citation:
Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F and Servettaz A (2018) Autoantibodies Associated With Connective Tissue Diseases: What Meaning for Clinicians? Front. Immunol. 9:541. doi: 10.3389/fimmu.2018.00541

Connective tissue diseases (CTDs) such as systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, myositis, Sjögren's syndrome, and rheumatoid arthritis are systemic diseases which are often associated with a challenge in diagnosis. Autoantibodies (AAbs) can be detected in these diseases and help clinicians in their diagnosis. Actually, pathophysiology of these diseases is associated with the presence of antinuclear antibodies. In the last decades, many new antibodies were discovered, but their implication in pathogenesis of CTDs remains unclear. Furthermore, the classification of these AAbs is nowadays misused, as their targets can be localized outside of the nuclear compartment. Interestingly, in most cases, each antibody is associated with a specific phenotype in CTDs and therefore help in better defining either the disease subtypes or diseases activity and outcome. Because of recent progresses in their detection and in the comprehension of their pathogenesis implication in CTD-associated antibodies, clinicians should pay attention to the presence of these different AAbs to improve patient's management. In this review, we propose to focus on the different phenotypes and features associated with each autoantibody used in clinical practice in those CTDs.

Keywords: antibody, systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome, systemic sclerosis, antisynthetase syndrome, dermatomyositis, necrotizing myopathy, rheumatoid arthritis

Abbreviations: AAb, autoantibody; ACPA, anti-citrullinated protein/peptide antibody; ACR, American College of Rheumatology; ANA, antinuclear antibody; anti-dsDNA, anti-double-stranded DNA; AQP4, aquaporin 4; APL, antiphospholipid; APS, antiphospholipid syndrome; ASS, antisynthetase syndrome; CCP, cyclic citrullinated peptide; CHB, congenital heart block; CN1a, cytosolic 5′-nucleotidase 1A; CTD, connective tissue disease; DM, dermatomyositis; dSSc, diffuse systemic sclerosis; EULAR, European League Against Rheumatism; GAPSS, global antiphospholipid score; HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; IBM, inclusion body myositis; IIF, indirect immunofluorescence; ILD, interstitial lung disease; lSSc, limited systemic sclerosis; MCTD, mixed connective tissue disease; MDA5, melanoma differentiation-associated gene 5; NM, necrotizing myopathy; NMO, neuromyelitis optica; NOR, nucleolus organizer region; NuRD, nucleosome remodeling histone deacetylase protein complex; NXP2, nuclear matrix protein 2; PAH, pulmonary arterial hypertension; PF, pulmonary fibrosis; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; SAE, small ubiquitin-like modifier activating enzyme; SLE, systemic lupus erythematosus; SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics; SRP, signal recognition particle; SS, Sjögren's syndrome; SSc, systemic sclerosis; TdP, torsade de pointes; TIF1-γ, transcription intermediary factor 1 gamma.

INTRODUCTION

Connective tissue diseases (CTDs) are autoimmune diseases characterized by the involvement of several organs and the presence of various autoantibodies (AAbs). Their implication in the pathogenesis of these CTD remains partly unclear; nevertheless, we know that some of these AAbs are directly involved in tissue damages whereas some are just markers of disease development.

During the last decades, many improvements were made in the comprehension of CTD pathogenesis, and a lot of new AAb were described. The presence of AAb can help the clinician in his approach to search an autoimmune disease (1), as sometimes the production of specific AAb precedes the symptoms and the diagnosis of the CTD (2, 3). Indeed, in most cases, those AAbs are detected in a specific CTD, making the diagnosis easier. Actually, most studies recently published focused on the clinical impact of AAb in different CTD and found that some AAbs are clearly associated with a specific phenotype in one type of CTD, allowing the clinician to adapt the follow-up of his patient and to predict some complications. However, relationship between AAb presence and disease diagnosis is not always that simple, as some other AAbs can be associated with more than one disease. Furthermore, differences can exist for the same kind of CTD according to the population studied, strengthening the fact that genetical factors in CTD pathogenesis are probably more important than we actually know. A potential explanation to these variations may be related to genetic and environmental factors, which may play a key role in these diseases predisposition and outcome.

Indeed, pathogenesis of CTD seems associated with the presence of AAb. However, many new AAbs were discovered, but their implication in pathogenesis of connective tissue diseases (CTDs) remains unclear. Many of these AAbs are antinuclear antibody (ANA). Nevertheless, the classification of ANA is nowadays misused, as their targets can be localized outside of the nuclear compartment (cytoplasmic, membrane, or extracellular), even if the term ANA is still currently used in clinic.

Because of the new improvements in their detection and comprehension of their pathological implication in CTDs-associated antibodies, clinicians should pay attention to the presence of the different AAbs to improve patient's management. In this review, we propose to focus on the different phenotypes and features associated with each AAb used in clinical practice in CTD clearly defined such as systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS), systemic sclerosis (SSc), myositis, and rheumatoid arthritis (RA). Especially, we will highlight the usefulness of their clinical determination.

AAb IN HEALTHY POPULATION AND IN NON-AUTOIMMUNE DISEASES

Biological autoimmunity is not always pathological and can be observed in healthy people. The highlighting of ANA in the general population is common and estimated between 5.92 and 30.8% (4–13) with a lower prevalence in the Chinese population (4) and a higher prevalence in the Afro-American population (13) (**Table 1**). In addition, ANAs are more commonly detected in women than in men (4–8, 10–14), and the prevalence of such ANA increases with aging, as it reaches up to 24% in subjects older than 85 years (14). ANAs are commonly detected by indirect immunofluorescence (IIF) on HEp2 cells, a human HELA-derivative cell line. Importantly, the relevance of a positive ANA test is directly linked to its titration. Thus, in a normal population, ANAs were found positive in 31.7% of individuals at 1/40 serum dilution, 13.3% at 1/80, 5.0% at 1/160, and 3.3% at 1/320 (15). The most accepted threshold is often the dilution 1/160 for first screening dilution (15–17). In complement to IIF assay, which is a very sensitive technic and can now be automated (18, 19), screening fluorescence enzyme or chemiluminescence immunoassays have been proposed in the last few years as detection assays. These multiparametric immunoassays allow simultaneous testing for 13–17 of commonest pathogenic autoantibody specificities in systemic autoimmune diseases [i.e., SSA-52kD, SSA-60kD, SSB, U1RNP (RNP 70,A,C), CENP-B, Scl70, Jo1, Fibrillarin, RNA polymerase III, ribosomal proteins, PM-Scl, PCNA, Mi2 proteins, Sm, dsDNA, and chromatin]. These screening immunoassays showed relatively good concordance with IIF (75–83%) and demonstrated similar or improved specificity and positive predictive value depending on the studies and the assays (20–24). However, due to the limited number of represented antigens in some screening assays and the better sensitivity of IIF, the American College of Rheumatology (ACR) ANA Task Force recommended that IIF should remain the gold standard for ANA testing (25).

In most healthy individuals with ANA, the antigenic target(s) remain(s) unknown with standard tests used to identify ANA

TABLE 1 | Presence of antinuclear antibody (ANA) in different populations considered as healthy people.

Reference	Population	Number	ANA positivity (%)	1/40 Nb (%)	1/80 Nb (%)	1/160 Nb (%)	1/320 Nb (%)	1/640 Nb (%)	1/1,280 Nb (%)	1/2,560 Nb (%)
Wang et al. (4)	Chinese	20,970	5.92	886 (4.23)	105 (0.50)	77 (0.37)	55 (0.26)	29 (0.14)	36 (0.17)	53 (0.25)
Minz et al. (5)	Indian	36,310	12.3	–	–	–	–	–	–	–
Selmi et al. (6)	Italian	2,690	18.1	–	–	–	–	–	–	–
Fernandez et al. (7)	Brazilian	500	22.6	73 (14.6)	23 (4.6)	10 (2.0)	1 (0.2)	–	2 (0.4)	2 (0.4)
Peene et al. (8)	Belgian	10,550	23.5	–	–	–	–	–	–	–
Hayashi et al. (10)	Japanese	2,181	25.9	–	–	–	–	–	–	–
Racoubian et al. (11)	Lebanese	10,814	26.4	–	2,162 (20.0)	–	400 (3.7)	183 (1.7)	119 (1.1)	–
Roberts-Thomson et al. (12)	Australian	20,205	28.3	–	–	–	–	–	–	–
Wandstrat et al. (13)	Afro-American	1,827	30.8	–	–	–	–	–	–	–

ANA positivity was defined as the first titer seen in this table for each study.

subtypes. Nevertheless, in a minority of cases, AAbs from healthy people recognize the same autoantigens as AAb from patients with autoimmune disease, especially anti-SSa in up to 3% and anti-DFS70 AAb (also called LEDGF for "lens epithelium-derived growth factor") (4, 10, 11). Anti-SSa AAbs are frequently detected in the sera from patients with SLE and SS, whereas anti-DFS70 AAbs have mostly been evidenced in healthy people, but also in the sera from patients with benign and common diseases such as atopic dermatitis (26–29). In general population, anti-Ro/SSa AAbs are associated with torsade de pointes (TdP) and arrhythmia, representing a clinically silent novel risk factor for TdP development *via* an autoimmune-mediated electrophysiological interference with the hERG channel (30).

Antinuclear antibody and other AAbs can also be observed in association with drugs (such as hydralazine and procainamide) or in non-autoimmune diseases associated with a process of tolerance breakdown such as infectious or lymphoproliferative diseases.

SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS-ASSOCIATED AAb

Systemic lupus erythematosus is a CTD with a great variability in its clinical presentation and its prognosis. Two main classification criteria are available, based on the presence of both clinical and immunological parameters [1997 ACR classification criteria and Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) classification criteria (31, 32)]. The different AAbs associated with SLE and their main features are recapitulated in **Table 2**.

ANA in SLE

Antinuclear antibody is one of the immunological criteria present in the two SLE classifications criteria as an ANA titer detected by IIF on HEP2 cells >1/160 is observed in nearly all SLE patients [between 94 and 100% (33–35)]. The quantity of ANA progressively increases during the 3–5 years preceding SLE clinical expression and diagnosis (2). Consequently, ANA testing represents an essential screening tool because their negativity (titer less than 1/160) makes the diagnosis of SLE extremely unlikely (36). By contrast, their presence, even at higher titer is not SLE-specific as ANA can be produced in a lot of other circumstances such as other CTD, hematologic and hepatic diseases, virus infections, drugs uptake, and in healthy people as previously mentioned. In case of positivity, ANA antigen target(s) must be determined by additional tests with nuclear autoantigens.

Clinical Usefulness of ANA Testing

- In case of SLE suspicion given clinical symptoms
- Importantly, ANAs are useless in SLE follow-up as they remain positive whatever disease activity.

Antigen Targets of ANA in SLE

Anti-Double-Stranded DNA (Anti-dsDNA) AAb

Anti-double-stranded DNA AAbs are present in 43–92% of cases (37–39) with a specificity between 89 and 99% but with variable clinical sensitivities from 8 to 54% (40–46). The methods used for anti-dsDNA AAb detection are numerous, which explains the variability observed in terms of sensitivity. Anti-dsDNA AAbs are quite well identified by nuclear homogeneous IFI pattern (47), but their presence may also be evaluated by quantitative assays such as Farr radioimmunoassay (45), chemiluminescence immunoassay (42, 43), ELISA (46), and fluoro-enzyme immunoassay or by qualitative assays such as immunofluorescence test on *Crithidia luciliae* (CLIFT) (44, 46). For each method, performances will vary according to the manufacturer and the source of the dsDNA (synthetic or purified ds DNA from human or calf origin). Globally, ELISA methods to detect anti-dsDNA antibodies are highly sensitive, but are less specific for the diagnosis of SLE than the immunofluorescence test on CLIFT and the Farr assay as they also detect low-avidity antibodies (48).

Anti-double-stranded DNA AAb positivity is one criteria present in both ACR and SLICC classifications (49). As for the majority of AAb, the specificity of anti-dsDNA AAb in SLE is not of 100% [specificity between 96 and 99% according to the type of test and the published series (40, 41)]. Indeed, they can also be evidenced in the setting of infection, elevation of C reactive protein and in healthy individuals (50). In SLE, the serum level of this AAb is generally correlated with disease activity (51). Moreover, high level of such AAb and their association with anti-Sm antibodies (defined below) are associated with kidney involvement in patients with SLE (52, 53).

TABLE 2 | AAb associated with systemic lupus erythematosus (SLE).

AAb	Prevalence	Sensitivity	Specificity	Clinical features
Anti-dsDNA	43–92% (37–39)	8–54% (40–46)	89–99% (40–46)	Correlation with disease activity
Anti-nucleosome	59.8–61.9% (53–57)	52–61% (53–57)	87.5–95.7% (53–57)	Correlation with disease activity
Anti-Sm	15–55.5% (37–39, 61)	10–55% (62)	98–100% (62)	Most specific antibody in SLE often associated with anti-RNP AAb
Anti-histone	50–81% >90% in induced SLE (37, 71, 72)	–	–	Drug-induced SLE
Anti-C1q	4–60% (90–93)	28% (94–97)	92% (94–97)	Associated with glomerulonephritis
Anti-ribosomal P	12–60% (37, 103, 104)	36% (103, 104, 109)	97–100% (103, 104, 109)	Neuropsychiatric manifestations
Anti-Ro/SSa	36–64% (37, 38, 61, 75, 76)	–	–	Skin involvement+++ CHB
Anti-La/SSb	8–33.6% (37, 38, 61, 75, 76)	25.7% (85)	96.7% (85)	Skin involvement+++ CHB (less than anti-Ro AAb)
Anti-RNP	23.3–49% (37–39)	8–69% (62)	25–82% (62)	–

CHB, congenital heart block; anti-dsDNA, anti-double-stranded DNA; AAb, autoantibody.

Clinical Usefulness of Anti-dsDNA AAb Testing

- In case of SLE suspicion and ANA > 1/160
- In the follow-up of SLE patients when positive at time of diagnosis (the same test in the same laboratory should always be used in this setting).

Anti-Nucleosome AAb

The nucleosome is a basic unit of DNA packaging, implicated in the formation of repeating units of chromatin. The anti-nucleosome AAbs are detected in 59.8 and 61.9% of SLE patients' sera with a sensitivity between 52 and 61% (the highest sensitivity in SLE) and a specificity between 87.5 and 95.7% (54–57). Although, presenting the same nuclear homogenous pattern on Hep2 cells (47), they can be present in the absence of anti-dsDNA AAb and consequently may be helpful for clinicians at diagnosis. In SLE murine models, serum anti-nucleosome AAbs are produced before anti-dsDNA AAb (58). Consequently, the detection of these AAbs may be helpful to establish diagnosis. It is noteworthy that the level of anti-nucleosome AAb (especially IgG3 subtype) is correlated with SLE activity (59). The simultaneous presence of anti-dsDNA, anti-nucleosome, and anti-histone (defined below) AAb has been shown to be associated with severe kidney involvement (54, 60). However, such AAbs have also been detected in patients with mixed connective tissue disease (MCTD) and SSc (56).

Clinical Usefulness of Anti-Nucleosome AAb Testing

- In case of SLE suspicion and ANA > 1/160 and negative anti-dsDNA AAb
- In the follow-up of SLE patients when positive at time of diagnosis (the same test in the same laboratory should always be used in this setting)

Anti-Sm AAb

Sm proteins are linked to RNA in the nuclear compartment. Characterized by nuclear coarse speckled pattern on Hep2 cells (47), anti-Sm AAbs are present in 15–55.5% of SLE patients (37–39, 61). These AAbs have a low sensitivity (10–55%) but are very specific for SLE (98–100% according to the test used and to the studied population) and are therefore used in the classification criteria (31, 49, 62).

The main usefulness of anti-Sm AAb detection seems to be in the subset of patients with SLE but without anti-dsDNA AAb, for whom they are present in 14.8% of cases (63). The anti-Sm AAb highlighting in SLE seems to be associated with lupus nephritis (52, 64) and with a poorer prognosis if they are present at the onset of kidney disease (65) and with a higher clinical relevance if they are associated with anti-dsDNA AAb (52, 53). In this line, a recent study showed that the association of a low concentration of complement fraction C3 and signs of complement activity (CH50), together with a high rate of anti-Sm AAb is predictive of lupus nephritis (66). Furthermore, anti-Sm AAbs are mostly expressed in association with anti-RNP (see below) AAb (67). In contrast to anti-dsDNA and anti-nucleosome AAb, anti-Sm AAb level does not correlate with disease activity (68, 69).

Clinical Usefulness of Anti-Sm AAb Testing

- In case of SLE suspicion and ANA > 1/160 and negative anti-DNA AAb
- Not useful in the follow-up of SLE patients
- Association with lupus nephritis

Anti-Histone AAb

Histones are proteins strongly linked to DNA allowing its compaction, thus forming the nucleosome structure. AAb directed against histone are associated with nuclear homogenous pattern on Hep2 cells (47). In drug-induced SLE such as procainamide, hydralazine, and quinine (70), about 95% of these patients develop anti-histone AAb, whereas these AAbs are only detected in 50–81% of cases of primary SLE (37, 71, 72).

Generally, drug-induced SLE regresses with treatment interruption, and the production of anti-histone AAb decreases alongside the activity of the disease (70, 73, 74).

Clinical Usefulness of Anti-Histone AAb Testing

- In case of drug-induced SLE
- Decreased rate associated with regression of drug-induced SLE

Anti-Ro and Anti-La AAb

Anti-Ro (also called anti-SSa) and anti-La (also called anti-SSb) AAbs are often associated with SS but can also occur in SLE with a prevalence between 36 and 64% and between 8 and 33.6% for anti-Ro AAb and anti-La AAb, respectively (37, 38, 61, 75, 76). These antibodies are detected in sera about 3.6 years before SLE diagnosis (2) and commonly give a nuclear fine-speckled pattern on Hep2 cells (47).

In SLE, they are associated with skin (75, 77) and hematologic manifestations such as cytopenia (78). Furthermore, these AAbs are responsible for neonatal lupus by transplacental passage with cardiac, cutaneous, hematologic, hepatobiliary, and neurologic involvement (79). Neonatal lupus occurs in only 2% of female patients with anti-Ro/SSa or anti-La/SSb (80, 81). Maternal autoimmune disease associated with neonatal lupus development is not always SLE, since maternal SLE is responsible for only 15–50% of neonatal lupus cases (79, 82). AAbs directed against the subunit 52 kDa of Ro are associated with a higher risk of congenital heart block (CHB) (41). In more than 90% of neonatal lupus cases, AAb regress within 9 months (82) and only few infants will develop authentic SLE (80, 81). The risk of CHB in these infants may be prevented by maternal treatment with hydroxychloroquine during pregnancy (83, 84). The sensitivity of anti-SSb for SLE is lower than in SS, about 25% and the specificity about 97% (85).

Adult patients with anti-Ro/SSa-positive CTD show a high prevalence of QTc interval prolongation (86), with a direct correlation between anti-Ro52 kDa level and QTc duration (87). In fact, anti-Ro/SSa-positive patients have a particularly high risk of developing complex ventricular arrhythmias (88).

Clinical Usefulness of Anti-Ro and Anti-La AAb Testing

- In case of skin and hematologic manifestations
- Association with CHB

Anti-RNP AAb

Anti-RNP AAbs are found in serum from patients with MCTD. In SLE, these AAbs are detected in 23.3–49% of cases (37–39). These AAbs are frequently associated with nuclear coarse speckled pattern on Hep2 cells (47). Clinical sensitivity in SLE is between 8 and 69%, with a specificity between 25 and 82% (62). In contrast with other SLE AAb, anti-RNP AAbs are detected within the year preceding SLE diagnosis (2). However, up to now, correlation with SLE phenotype remains to be clarified.

Clinical Usefulness of Anti-RNP AAb Testing

- No specific phenotype in SLE
- Useless for follow-up

Non-Antinuclear AAb Frequently Observed in SLE

Anti-C1q AAb

Patients with genetic defect in C1q expression have an increased risk to develop a lupus-like disease (89). Anti-C1q AAbs are found in 4–60% of SLE patients, and their prevalence increase with aging (90–93).

High production of anti-C1q AAb is associated with membranoproliferative glomerulonephritis development with 28 and 92% of sensitivity and specificity, respectively (94–97).

These AAbs are detected 2–6 months before lupus nephritis onset (98–100). By contrast, the absence of anti-C1q AAb is associated with less kidney involvement during SLE course (101). These AAbs are also observed in hypocomplementemic urticarial vasculitis associated or not with SLE (also called McDuffie syndrome) (102).

Clinical Usefulness of Anti-C1q AAb Testing

- In case of lupus nephritis
- Also seen in hypocomplementemic urticarial vasculitis

Anti-Ribosomal P AAb

Substance P is a neuropeptide that acts as a neurotransmitter and a neuromodulator. Anti-ribosomal P AAb may be detected by very dense fine granular cytoplasmic pattern when testing for ANA on Hep2 cells (47). These AAbs are detected in 12–20% of SLE patients (37, 103, 104) and are associated with disease activity and with neuropsychiatric involvement (105–108). The specificity is between 97 and 100%, and the sensitivity is about 36% (103, 104, 109).

Clinical Usefulness of Anti-Ribosomal P AAb Testing

- In case of neuropsychiatric lupus
- Useless for follow-up

Antiphospholipid (APL) AAb

The antiphospholipid syndrome (APS) is observed in 29–46% of SLE patients (110). APS is defined by pregnancy morbidity (mainly fetal losses) and thromboses (arterial and/or venous) in association with the presence of at least one APL AAb [lupus anticoagulant, anticardiolipin (IgM or IgG), and anti-β2 glycoprotein I (IgM or IgG) AAb] on two or more occasions at least 12 weeks apart (111). Some non-thrombotic manifestations such as thrombocytopenia, livedo reticularis, renal microangiopathy, and myelitis can occur in APS but do not belong to classification criteria (112). In SLE, lupus anticoagulant and anticardiolipin are present, respectively, in about 40 and 30% of cases (with or without APS in the same proportion) (113, 114).

Patients having SLE with APS have a threefold higher risk than those without APL to develop a Libman–Sacks endocarditis (115, 116), an increased risk of vascular events (such as thrombosis) and death (113, 114, 117), and a higher risk to develop pulmonary hypertension (118). A global antiphospholipid score is currently developed in SLE to predict thrombotic risk (119).

Clinical Usefulness of Anti-APL AAb Testing

- In all SLE patients at diagnosis
- In all SLE patients regularly during the follow-up and in case of vascular thrombosis, and/or pregnancy morbidity

Anti-Aquaporin 4 (AQP4) AAb

Aquaporin 4 is the main water channel in the brain and is also responsible for glutamate and potassium regulation in the blood–brain barrier, synapses, and paranodes adjacent to the nodes of Ranvier. Anti-AQP4 AAb is well known to be specific to neuromyelitis optica (NMO), also called Devic's syndrome (120).

These AAbs can be detected in SLE and are associated with authentic NMO or atypical NMO (myelitis alone or optic neuritis alone) (121, 122). Anti-AQP4 AAb seem to be strongly associated with anti-Ro/SSa AAb and also, to a lesser extent, anti-dsDNA AAb (122, 123). Nevertheless, these AAbs can also be detected in SLE and persist for years without concurrent clinical or radiological NMO signs (124). These AAbs can be evidenced in the serum, but their detection in the cerebrospinal fluid from patients allows a higher sensitivity and specificity of the test (125).

Clinical Usefulness of Anti-AQP4 AAb Testing

- Useless for diagnosis
- Only if NMO signs

SJÖGREN'S SYNDROME-ASSOCIATED AAb

Sjögren's syndrome is a CTD affecting mainly women, and whose main feature is sicca syndrome. Various organs can be involved in severe forms. Classification criteria include both clinical and immunological parameters (126). Two different forms are observed: primary SS and secondary SS, which is associated with other CTD. The different AAbs observed in patients' sera and their main features are summarized in **Table 3**.

TABLE 3 | AAb associated with Sjögren's syndrome.

AAb	Prevalence	Sensitivity	Specificity	Features
Anti-Ro52	33–77.1% (130–134)	42% (130)	100% (130)	CHB++
Anti-Ro60	33–77.1% (130–134)	51% (130)	98% (130)	CHB
Anti-La/SSb	23–47.8% (130–134)	29% (130)	99% (130)	Doubt on pathogenicity
Anti-α-fodrin	98% (141–143)	40% (141–143)	80% (141–143)	–

CHB, congenital heart block; AAb, autoantibody.

ANA in SS

Antinuclear antibody prevalence is estimated between 41.9 and 64% in this disease (127–130). Nevertheless, important discrepancies are observed in the immunological presentation of these patients because the detection of AAb is not mandatory for diagnosis (126). Patients producing high level of ANA with anti-Ro/SSa and/or anti-La/SSb AAb display a more severe disease with various organ involvements.

Clinical Usefulness of ANA Testing

- Distribution disparity because of classification criteria of SS (immunologic criteria not always required in presence of sicca syndrome and histopathology)
- Importantly, ANAs are useless in SS follow-up.

Targets of ANA in SS

The two main antigens recognized by AAb in SS patients are the Ro/SSa (with two subunits, one of 52 kDa and one of 60 kDa) and the La/SSb antigens. The detection of either anti-Ro/SSa and/or anti-La/SSb AAb constitutes one of the classification criteria but their presence is not mandatory for diagnosis (126). These AAbs are evidenced 4–7 years before SS diagnosis (3, 130).

The sensitivity of anti-Ro52, anti-Ro60, and anti-La is estimated at about 42, 51, and 29%, respectively, whereas the specificity is estimated at about 100, 98, and 99%, respectively (130).

Anti-Ro/SSa AAbs are detected in 33–77.1% of primary SS, whereas anti-La/SSb AAbs are present in 23–47.8% of primary SS (130–134). Anti-Ro/SSa AAb can be observed without anti-La/SSb AAb in patients' sera, conversely anti-La/SSb alone are rarely evidenced (133). Of note, a recent study reported that the diagnosis of SS was unlikely in patients who had only anti-La/SSb AAb without any anti-Ro/SSa AAb (135).

Concerning disease features, patients displaying both anti-Ro/SSa and anti-La/SSb AAbs are more at risk to develop a non-Hodgkin lymphoma, whereas the absence of those AAbs seems to be associated with a better prognosis (136). In pregnant women, anti-Ro/SSa AAb can induce a high-degree atrioventricular block in fetus in 1–2% of pregnancies (137, 138). This conduction defect seems to be mainly due to anti-52 kDa Ro/SSa AAb (41, 139). Infants of mothers with SS represent 20–30% of neonatal lupus cases (79, 82). Except for cardiac involvement, neonatal lupus signs are completely solved in most of these infants at 9 months of life (82).

In primary SS, anti-Ro/SSa and anti-La/SSb AAbs are associated with earlier disease onset, longer disease duration, greater severity of glandular symptoms, and higher prevalence of extraglandular manifestations (140).

As described previously, adult patients with anti-Ro/SSa-positive CTD show a high prevalence of QTc interval prolongation (86), with a direct correlation between anti-Ro52 kDa level and QTc duration (87). These findings suggest that anti-Ro/SSa-positive patients may have a particularly high risk of developing life-threatening arrhythmias. In fact, anti-Ro/SSa-positive patients have a particularly high risk of developing complex ventricular arrhythmias (88).

Clinical Usefulness of Anti-Ro and Anti-La AAb Testing

- Association with disease severity (risk of non-Hodgkin lymphoma)
- Association with CHB (mostly anti-Ro52) and neonatal lupus by transplacental passage, necessity of screening test and cardiac fetal follow-up in pregnant women at risk
- Useless for follow-up

Non-Antinuclear AAb Observed in SS

Anti-Alpha-Fodrin AAb

Alpha-fodrin is an intracellular, actin-binding, organ-specific protein of the cytoskeleton. AAb directed against α-fodrin can be detected in SS in 98% of cases with a sensitivity of about 40% and a specificity of about 80% (141–143). This kind of AAb can also be detected in SLE patients' sera (141, 144).

These AAbs do not seem to be associated with disease activity or clinical manifestation (145). Anti-α-fodrin AAb could be useful in SS diagnosis when both anti-Ro/SSa and anti-La/SSb were not detected (146).

Clinical Usefulness Anti-α-Fodrin AAb Testing

- Useful for diagnosis in absence of anti-Ro/SSa and anti-La/SSb AAb
- Useless for follow-up

Anti-AQP4 AAb

As shown previously, anti-AQP4 AAbs are associated with NMO, also called Devic's syndrome (120) but can also be detected in SS in association with anti-Ro/SSa AAb in most of cases (122, 123). These AAbs in SS are associated with cranial/peripheral neuropathy, authentic NMO or atypical NMO (myelitis alone or optic neuritis alone) (121, 122). These AAbs can be evidenced both in the serum and in the cerebrospinal fluid (125).

Clinical Usefulness of Anti-AQP4 AAb Testing

- Useless for diagnosis
- Only if NMO signs

SYSTEMIC SCLEROSIS-ASSOCIATED AAb

Systemic sclerosis is a CTD characterized by fibrosis, vasculopathy, and autoimmunity. Clinical and immunological expressions of the disease are highly heterogeneous since a large

variety of organs can be involved, and various AAbs may be detected in the sera of patients with SSc. Some correlations have been observed between clinical expression and AAb type. In addition, some AAbs are listed in the European League Against Rheumatism (EULAR) classification criteria (147). The association of the different antibodies with the SSc variants is detailed in **Table 4**.

ANA in SSc

Antinuclear antibody prevalence is high in SSc, since about 95% of patients' sera display such AAb (148–150). Various nuclear proteins can be targeted in SSc. Topoisomerase I, centromeric proteins, and RNA polymerase III represent the three most frequent autoantigens recognized in SSc, but numerous other antigens can be identified. Surprisingly and unexplainedly, the production of two different AAbs by a single patient is exceptional (151).

Clinical Usefulness of ANA Testing

- In case of SSc suspicion given clinical symptoms, negative ANA in suspicion of SSc makes the diagnosis unlikely.
- Importantly, ANAs are useless in SSc follow-up as they remain positive whatever disease activity.

Targets of ANA in SSc

Anti-DNA Topoisomerase I AAb (Anti-Scl70 AAb)

Type I DNA topoisomerases are enzymes that cut one of the two strands of double-stranded-DNA, relax the strand and reanneal the strand. Anti-DNA topoisomerase I AAbs are detected in 30.1–41.2% of SSc sera (150, 152, 153) with a sensitivity estimated about 43% and a specificity about 90% (154). Classically, the associated immunofluorescence pattern on Hep2 cells is speckled and nucleolar (155, 156).

These AAbs are associated with diffuse systemic sclerosis (dSSc) and with a higher risk of pulmonary fibrosis (PF) (157, 158). Two studies reported that anti-Scl70 (a topoisomerase I protein) AAb levels were correlated with disease activity (159) and that negativation of their detection was associated with a better prognosis (160). Nevertheless, these results remain controversial, and their follow-up during disease evolution is not anymore recommended nowadays. Survival rate at 10 years after diagnosis in patients producing those AAbs is estimated at 66% (161).

Clinical Usefulness of Anti-Scl70 AAb Testing

- Association with diffuse SSc and PF
- Not recommended for follow-up nowadays

Anti-Centromere AAb

The centromere is a part of the chromosomal structure that links a pair of sister chromatids. Anti-centromere AAbs are detected in 28.2–36.9% of SSc patients (150, 152, 153) with a sensitivity estimated about 44% and a specificity about 93% (154).

These AAbs are associated with limited systemic sclerosis (lSSc) and with a higher risk to develop pulmonary arterial hypertension (PAH) (157, 158, 162). Survival rate at 10 years of patients with anti-centromere AAb, about 93%, is better the one those from patients with anti-Scl70 AAb (161).

Clinical Usefulness of Anti-Centromere AAb Testing

- Association with limited SSc with a good prognosis
- Association with PAH
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

TABLE 4 | AAb associated with systemic sclerosis (SSc).

AAb	Prevalence	Sensitivity	Specificity	Clinical features
Anti-Scl70/DNA topoisomerase I	30.1–41.2% (150, 152, 153)	43% (154)	90% (154)	Diffuse SSc PF
Anti-centromere	28.2–36.9% (150, 152, 153)	44% (154)	93% (154)	Limited SSc PAH
Anti-RNA polymerase III	3.8–19.4% (152, 153, 163, 164)	38% (154)	94% (154)	Diffuse SSc Scleroderma renal crisis
Anti-U1-RNP	4.8–4.9% (152, 153)	–	–	Limited SSc PAH Overlap with SLE or MCTD
Anti-U3-RNP	1.4–8% 16–18.5 in AA (152, 153, 181–183)	12% (154)	97% (154)	Diffuse SSc PAH
Anti-Pm/Scl	3.1–13% (150, 152, 173)	12.5% (154, 174)	98% (154, 174)	Limited SSc Overlap with myositis PF Digital ulcers
Anti-Ku	1.1–4.6% (150, 152, 176, 177)	–	–	Limited SSc Overlap with myositis
Anti-Th/To	0.2–3.4% (152, 153)	–	–	Limited SSc PAH
Anti-NOR90	6% (150)	–	–	Limited SSc PF

PAH, pulmonary arterial hypertension; AA, Afro-American population; SLE, systemic lupus erythematosus; MCTD, mixed connective tissue disease; PF, pulmonary fibrosis; AAb, autoantibody.

Anti-RNA Polymerase AAb

RNA polymerase III is used to transcribe DNA into small RNA. Characterized by fine-speckled nucleoplasmic stain with additional occasional bright dots on Hep2 cells (47), anti-RNA polymerase III AAbs are detected in 3.8–19.4% of SSc sera, depending on ethnic group (152, 153, 163, 164) with a sensitivity about 38% and a specificity about 94% (154).

These AAbs are associated with dSSc and with a higher risk of scleroderma renal crisis, gastric antral vascular ectasia (also called watermelon stomach), and cancer (mainly synchronous breast cancer) (157, 165–167). Patients with anti-RNA polymerase III have a higher Rodnan skin score (used for skin fibrosis graduation) than patients with other AAbs and also are more likely to be rapid progressor (167, 168). Survival rate at 10 years in patients producing these AAbs is low, about 30% (161).

Other polymerases can be targeted by self-reactive lymphocytes. Anti-RNA polymerase I AAb may also be produced by SSc patients, mainly in association with anti-RNA polymerase III AAb production. Of note, the detection of isolated anti-RNA polymerase I AAb is not associated with SSc (169). The presence of both anti-RNA polymerase I/III AAb is also associated with cancer and scleroderma renal crisis (170, 171). Furthermore, the concomitant production of anti-RNA polymerase II and III AAb seems to increase the risk of scleroderma renal crisis as compare to the production of anti-RNA polymerase III AAb alone (172).

Clinical Usefulness of Anti-RNA Polymerase AAb Testing

- Mostly concerning anti-RNA polymerase III AAb in clinical practice
- Association with risk of scleroderma renal crisis
- Cancer must be search (mostly breast cancer)
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-Pm/Scl AAb

Anti-Pm/Scl AAbs are detected in 3.1–13% of SSc patients (150, 152, 173) with a sensitivity about 12.5% and a specificity about 98% (154, 174). Anti-Pm/Scl AAbs are distinguished by homogeneous nucleolar pattern by IFI (47).

These AAbs are associated with lSSc, overlap syndrome with myositis, PF, and digital ulcers (157, 174, 175). By contrast, PAH is less frequent in patients producing those AAbs (174).

Clinical Usefulness of Anti-Pm/Scl AAb Testing

- Mostly seen in overlap syndrome with myositis
- Less likely to be associated with PAH
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-Ku AAb

Anti-Ku AAbs are detected in 1.1–4.6% of SSc sera (150, 152, 176, 177), frequently associated with nuclear fine-speckled pattern on Hep2 cells (47). They are associated with lSSc and with a higher risk of myositis and interstitial lung disease (ILD) (150, 157, 177), the absence of digital ulcers and telangiectasia (176).

Clinical Usefulness of Anti-Ku AAb Testing

- Rarely seen in practice
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-Th/To AAb

Anti-Th/To AAb can be detected in 0.2–3.4% of SSc patients (152, 153) with homogeneous nucleolar fluorescence such as anti-Pm/Scl AAb (47). These AAbs are associated with lSSc and a higher risk of PAH (157, 162). A recent long-term follow-up study evidenced that patients with anti-Th/To AAbs are more likely to develop pulmonary hypertension (PAH or pulmonary hypertension secondary to ILD) with a better prognosis and less joint involvement than other SSc patients with other AAbs (178).

Clinical Usefulness of Anti-Th/To AAb Testing

- Rarely seen in practice
- Association with pulmonary hypertension (PAH or pulmonary hypertension secondary to ILD)
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-RNP AAb

Anti-U1-RNP AAbs, distinguished by nuclear coarse speckled pattern by IFI (47), are found in 4.8–4.9% of SSc patients (152, 153). They are associated with lSSc and with a higher risk to develop PAH (157). Patients with anti-U1-RNP AAb-associated PAH seems to have a better prognosis than SSc related-PAH associated with other antibodies (179). The presence of this kind of AAb evokes an overlap syndrome with other autoimmune diseases, mostly SLE and MCTD (180).

Anti-U3-RNP AAbs (also called anti-fibrillarin AAb), distinguished by clumpy nucleolar pattern on Hep 2 cells (47), are globally detected in 1.4 and 8% of SSc cases, with important differences between the populations studied (150, 152, 153, 181–183) with a sensitivity about 12% and a specificity about 97% (154). However, these AAbs are more frequently detected in Afro-American people (16–18.5%) (183, 184). Fibrillarin is a component of several ribonucleoproteins including a nucleolar small nuclear ribonucleoprotein. These AAbs are frequently associated with rapidly progressive dSSc (with a Rodnan skin score lower than in other dSSc), muscular involvement, and a higher risk of PAH (182). The presence of anti-fibrillarin AAb in Afro-American population is associated with a higher risk of digital ulcers, pericarditis, and gastrointestinal involvement, but in contrast, with less pulmonary involvement (184).

Clinical Usefulness of Anti-RNP AAb Testing

- In practice, always ask for both U1 and U3-RNP AAb because of clinical differences
- Anti-U1-RNP AAb associated with PAH
- Anti-U3-RNP AAb frequent in Afro-American people and associated with diffuse SSc
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-Ro/SSa AAb

Anti-Ro/SSa AAbs, also evidenced in SLE and in the SS, are detected in 15–19% of SSc patients, especially AAb directed against the 52 kDa subunit (185). Conversely, anti-SSb AAbs are rarely observed in SSc.

Patients with anti-Ro/SSa AAb show a high prevalence of QTc interval prolongation correlated with anti-Ro52 kDa level and with a higher risk to develop complex ventricular arrhythmias (86–88).

Clinical Usefulness of Anti-Ro and Anti-La AAb Testing

- Not associated with clinical phenotype
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-NOR90 AAb

Nucleolus organizer regions (NORs) are chromosomal regions crucial for the formation of the nucleolus. Anti-NOR90 AAbs are directed against a 90 kDa component of NOR and are found in about 6% of SSc patients (150). These AAbs are associated with punctate nucleolar fluorescence on Hep2 cells (47). Anti-NOR90 AAbs seem to be associated with lSSc and PF (150). These AAbs can also be detected in patients with SLE, SS, and RA (186).

Clinical Usefulness of Anti-NOR90 AAb Testing

- Rarely seen in practice and not specific to SSc
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-Histone AAb

Anti-histone AAbs are evidenced in some SSc sera and seem to be associated with critical internal organ involvement such as cardiac, pulmonary, and renal involvement, and with a decreased survival rate (187, 188).

Clinical Usefulness of Anti-Histone AAb Testing

- Rarely seen in practice
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Non-Antinuclear AAb Frequently Observed in SSc

Anti-Citrullinated Protein/Peptide AAb (ACPA)

These AAbs are commonly observed in patients with RA but can also be detected in 10% of SSc patients (189). In a recent meta-analysis, the presence of this kind of AAb in the setting of SSc was associated with dSSc, erosive arthritis, and PF (189).

Clinical Usefulness of ACPA Testing

- Association with erosive arthritis (means overlap syndrome with RA?)
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

MYOSITIS-ASSOCIATED AAb

Myositis are characterized by a high phenotypic heterogeneity ranging from isolated muscle involvement to various organs manifestations such as ILD, arthritis, or overlap syndrome with other autoimmune diseases. AAbs are currently evidenced in 60–80% of these patients (190, 191). AAbs observed in myositis can be divided in two different groups: myositis-specific AAb (mostly non-ANA) and AAb that can be also observed in other CTD. Four distinct forms of myositis with specific AAbs are currently recognized depending on their clinical and histological features: polymyositis [mainly the antisynthetase syndrome (ASS)], necrotizing myopathy (NM), dermatomyositis (DM), and inclusion body myositis (IBM) (192, 193). In all of these myositis manifestations, only one AAb is detectable in each patient (194). The different myositis-specific AAbs are recapitulated in **Table 5**.

TABLE 5 | AAb associated with myositis [antisynthetase syndrome (ASS), necrotizing myopathy (NM), dermatomyositis (DM), and inclusion body myositis (IBM)].

Kind of myositis	AAb	Prevalence	Clinical and therapeutical features
Anti-synthetase syndrome	Anti-Jo1	70% (194, 197)	Better prognosis More likely associated with myositis than ILD
	Anti-PL7	10% (194, 197)	Poor prognosis
	Anti-PL12	15% (194, 197)	More likely associated with ILD than myositis
	Anti-EJ Anti-OJ Anti-KS Anti-ZO Anti-HA	<2% (194, 197)	–
Necrotizing myopathy	Anti-HMGCR	12–34% (63% with statin history) (202, 205, 206)	Present in statin-associated myopathies Associated with cancer Correlated with disease activity Good response to immunosuppressive treatment (except for statin naïve patients)
	Anti-SRP	18–24% (202, 205)	Correlate with disease activity Associated with ILD Poor response to immunosuppressive treatment
Dermatomyositis	Anti-TIF1-γ	13–38% (212, 213)	Strongly associated with cancer
	Anti-NXP2	17% (212, 216)	Associated with cancer Calcinosis and muscle atrophy in juvenile DM
	Anti-MDA5	10% (40% Asian population) (219, 220)	Associated with severe ILD and skin ulcerations Correlate with disease activity Poor prognosis
	Anti-SAE	7–8% (225, 226)	Severe dysphagia
	Anti-Mi2	18–35% (228, 229)	Good response to immunosuppressive treatments
Inclusion body myositis	Anti-CN1a	30% (231)	Single AAb described in IBM up to now

ILD, interstitial lung disease; AAb, autoantibody.

Anti-Synthetase Syndrome-Associated AAb

Antisynthetase syndrome is characterized clinically by myositis, ILD, arthritis, Raynaud's phenomenon, mechanic's hands, fever, and immunologically by the presence of an anti-tRNA synthetase AAb (195). In contrast with other groups of myositis, no correlation with cancer was made in ASS. Amino-acyl-tRNA-synthetases are enzymes that attach the appropriate amino acid onto its tRNA.

The different AAbs describe up to now are the anti-Jo1, anti-PL7, anti-PL12, anti-EJ, anti-OJ, anti-KS, anti-Zo, and anti-Ha AAb. Such AAb, associated with cytoplasmic speckled or fine-speckled fluorescence (47), are detected in about 30% of ASS cases (196). Anti-Jo1 AAb is the most frequently evidenced in about 70% of ASS, followed by anti-PL12 AAb in 15%, anti-PL7 AAb in 10%, whereas other ASS-associated AAbs are observed in less than 2% of the cases (194, 197).

The phenotype and the survival rate depend on the protein targeted by the AAb. Anti-PL7 and anti-PL12 AAbs are mostly associated with ILD and with a worst outcome than anti-Jo1 AAb (198). A long-term follow-up study demonstrated that anti-Jo1 AAb-associated myositis preceded the development of ILD, whereas ILD started before anti-PL7 and PL12 AAb-associated myositis (199). Patients with anti-Jo1 AAb less frequently develop sclerodactyly and ILD but display more frequently myositis than patients producing other types of anti-tRNA synthetase AAb (194). Furthermore, the level of anti-Jo1 AAb seems to be modestly correlated with muscle (in particular serum creatine kinase) and joint activity (200).

Clinical Usefulness of ASS AAb Testing

- In cases of ASS, mostly anti-Jo1, anti-PL7, and PL12 are detected
- Development of myositis first in anti-Jo1 ASS, development of ILD first in anti-PL7 and PL12 ASS
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity (except for anti-Jo1)

Necrotizing Myopathy-Associated AAb

Necrotizing myopathy is characterized by subacute proximal limb muscle weakness, strongly elevated creatine kinase levels, muscle fiber necrosis, and regeneration, phenomenon that can be observed on muscle biopsy specimens (201). The two main AAbs in NM are directed against the signal recognition particle (anti-SRP AAb) and the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (anti-HMGCR AAb). These AAbs are present in about 60% of cases (202), and both probably play a pathogenic role in the disease (203, 204).

Anti-HMGCR AAb

The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase is the rate-limiting enzyme for cholesterol synthesis. The prevalence of anti-HMGCR AAb is of 12–34% (202, 205) and can reach up to 63% in patients with a past history of treatment by statin (206).

Necrotizing myopathy may be associated with cancer, especially when associated with anti-HMGCR AAb (202). Anti-HMGCR antibody serum level seems to be correlated with disease activity and with serum creatine kinase level (207). Generally, NM patients with anti-HMGCR AAb have a good response to immunosuppressive treatments but have a tendency to relapse (208). The presence of anti-HMGCR AAb in statin-naive patients is associated with a lower response to treatment (209).

Clinical Usefulness of Anti-HMGCR AAb Testing

- Strongly associated with NM with past history of statin treatment
- Cancer must be sought for in presence of one of these AAb
- Good response to immunosuppressive treatment
- Useful for follow-up, correlated with disease activity (and serum creatine kinase level)

Anti-SRP AAb

SRP is a complex of six proteins permitting the translocation of nascent proteins to the endoplasmic reticulum. The prevalence of anti-SRP AAb in NM is of 18–24% (202, 205). Like anti-HMGCR, the level of anti-SRP antibody is correlated with disease activity and with serum creatine kinase level (210). Anti-SRP AAbs share also with anti-HMGCR AAb a cytoplasmic dense fine granular pattern by IFI on HEP2 cells (47).

Patients with anti-SRP AAb seem to have more severe muscle weakness and ILD than patients with anti-HMGCR AAb (211). Finally, NM patients with anti-SRP AAb seem to have a reduced response to usual immunosuppressive treatments than other myopathies (208).

Clinical Usefulness of Anti-SRP AAb Testing

- Association with severe muscle weakness and ILD
- Poor response to immunosuppressive treatment
- Useful for follow-up, correlated with disease activity (and serum creatine kinase level)

Dermatomyositis-Associated AAb

Dermatomyositis is an inflammatory disease characterized by proximal muscle weakness and skin involvement. Muscle histology is typical with perifascicular atrophy, vasculopathy, and inflammatory infiltrations. In DM, five AAbs have been described. They are directed against transcription intermediary factor 1 gamma (anti-TIF1-γ AAb), nuclear matrix protein 2 (anti-NXP2 AAb), melanoma differentiation-associated gene 5 (anti-MDA5 AAb), and small ubiquitin-like modifier activating enzyme (anti-SAE AAb), while anti-Mi2 AAbs recognize the nucleosome remodeling histone deacetylase protein complex (NuRD).

Anti-TIF1-γ AAb

The TIF1-γ protein (also called TRIM 33 for Tripartite motif-containing 33) is a transcriptional corepressor that acts as a tumor suppressor protein. The anti-TIF1-γ AAb may be detected by nuclear fine-speckled fluorescence on Hep2 cells with a prevalence in DM of 13–38% (47, 212, 213).

The production of AAb directed against this protein is strongly associated with cancer occurrence with a sensitivity of 78%, a specificity of 89%, and positive and negative predictive values of 58 and 95%, respectively (212, 214). These patients are also more frequently diagnosed with dysphagia (215).

Clinical Usefulness of Anti-TIF1-γ AAb Testing

- Cancer must be sought for in presence of these AAb
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-NXP2 AAb

The prevalence of anti-NXP2 in DM is of 17% (212, 216). These AAbs are distinguished by multiple nuclear dots on the nucleoplasm of Hep2 cells by IFI (47). As for anti-TIF1-γ, anti-NXP2 AAb production is associated with a higher risk of cancer development (212). These AAbs are also associated with calcinosis and muscle atrophy, especially in juvenile DM (217, 218).

Clinical Usefulness of Anti-NXP2 AAb Testing

- Cancer must be sought for in presence of these AAbs
- Association with calcinosis, mostly in juvenile DM
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-MDA5 AAb

MDA5 is an RIG-I-like receptor functioning as a viral-sensing pattern recognition receptor. The prevalence of anti-MDA5 AAb in DM is of 10% (219) and seems to be higher (about 40%) in Asian population (220).

The presence of anti-MDA5 AAb is associated with a higher risk of developing an ILD (221). Subsequently, patients with this kind of AAb display poorer prognosis, with approximately 50% of death by respiratory failure within the first 6 months following diagnosis (222). Clinically, these patients also present with hand swelling, skin ulceration, panniculitis, and palmar papules (219). Serum level of AAb is correlated with disease activity, and it disappears with its remission (223, 224).

Clinical Usefulness of Anti-MDA5 AAb Testing

- Poor prognosis with respiratory failure
- Mostly, myositis not at the forefront
- Useful for follow-up, correlated with disease activity

Anti-SAE AAb

SAE is implicated in the nuclear-cytosolic transport and in the transcriptional regulation. The prevalence of anti-SAE AAb in DM is of 7–8% (225, 226) but, in contrast to the anti-MDA5 AAb, the anti-SAE AAbs are less common (about 2%) in the Asian population (227). Clinically, the presence of these AAbs is associated with severe dysphagia (226).

Clinical Usefulness of Anti-SAE AAb Testing

- Association with severe dysphagia
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Anti-Mi2 AAb

Anti-Mi2 AAbs target NuRD, a nuclear proteic complex implicated in multiple transcriptional regulatory processes such as histone demethylation, histone deacetylation, and nucleosome mobilization. They are found in 18–35% of patients with DM (228, 229) and are associated with nuclear fine-speckled fluorescence by IFI on Hep2 cells (47).

Patients with anti-Mi2 AAb seem to have better response to immunosuppressive treatment (229).

Clinical Usefulness of Anti-Mi2 AAb Testing

- Not associated with a specific clinical phenotype
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

Inclusion Body Myositis-Associated AAb

Inclusion body myositis is a myopathy observed in middle-aged patients that leads to a progressive, asymmetric muscle weakness with swallowing troubles (230). Muscle biopsy evidences vacuolated muscle fibers, inflammatory infiltrates, and intracellular deposits of amyloid protein.

Recently, a novel AAb has been identified (231) in one-third of these IBM patients, which recognizes the cytosolic 5′-nucleotidase 1A (anti-CN1a). Nevertheless, these antibodies are also detected in SLE and in SS patients (232). Its presence or absence does not seem to affect disease prognosis nor evolution (233). This myopathy is poorly responsive to immunosuppressive treatment.

Clinical Usefulness of Anti-CN1a AAb Testing

- Single AAb described in IBM up to now
- Useless for follow-up, not correlated with disease activity

RHEUMATOÏD ARTHRITIS-ASSOCIATED AAb

Rheumatoid arthritis is the most common inflammatory rheumatoid disease with a world prevalence of approximatively 0.5–1% (234). The disease typically affects small and medium-sized joints symmetrically. The primary lesion is synovitis. Systemic involvement is often observed, with respiratory, cardiovascular, and hematopoietic systems being the more damaging lesioned sites.

Antinuclear AAb in RA

Antinuclear antibody is not the main type of AAb detected in RA but they are present in about 20% of cases (128). The ANA detection has no clinical relevance in RA but is useful for treatments. The highlighting of ANA under infliximab is associated with poorer response to treatment (developing antibody directed against infliximab) and a risk to develop induced lupus (235, 236).

Clinical Usefulness of ANA Testing

- Useless for diagnosis
- Useful in treatment to predict response and complications (induced lupus)

Non-Antinuclear AAb Frequently Observed in RA

The two main AAb associated with RA (recapitulated in **Table 6**) are chronologically rheumatoid factor (RF) and ACPA. Other AAbs [anti-CarP (237) and anti-NOR9 0 (186) AAb] are not available in routine practice nowadays. Two main classification criteria are available, based on the presence of both clinical and immunological parameters: the ACR 87 classification (238) and the 2010 classification criteria of the ACR/EULAR (239) collaborative initiative. RF or ACPA measurements between one and three times the upper limit of normal are designated "low"; higher measurements are designated "high." The high measurement increases the probability of positive diagnosis (238, 239). RA is typically divided into two subtypes designated "seropositive" and "seronegative" disease, with seropositivity being defined as the presence of AAb. The heritability of RA is currently estimated as 40–65% for seropositive RA, but lower (20%) for seronegative disease (240, 241).

TABLE 6 | AAb associated with rheumatoid arthritis.

AAb	Prevalence	Sensitivity	Specificity	Features
Rheumatoid factor	50–70% (243)	–	50–95% (245)	Associated with disease activity
ACPA	60–70% (249)	–	95% (243)	Associated with disease activity Erosive arthritis

ACPA, anti-citrullinated peptide AAb; AAb, autoantibody.
The term ACPA regroups anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) and also anti-non-cyclic citrullinated peptides AAb.

Rheumatoid Factor

Rheumatoid factor is the first well-known RA immunologic marker discover in 1957 (242) that targets the Fc part of human IgG. RFs are present in 50–70% (243) of patients at diagnosis, with little increase throughout disease course (234, 243). There is a correlation between RF titer and radiographic progression (244). The specificity of RF for RA diagnosis depends on clinical context: strong with an articular involvement and low without articular involvement (50–95%) (245).

Rheumatoid factor can also be found in healthy (elderly) individuals and patients with other autoimmune and infectious diseases (245). Despite this lack of specificity, the presence of RF was one of the seven diagnostic criteria for RA put forward by the ACR in 1987 and is also included in the ACR/EULAR 2010 classification criteria for RA.

Clinical Usefulness of RF Testing

- Useful for diagnosis
- Useful in follow-up to predict disease activity

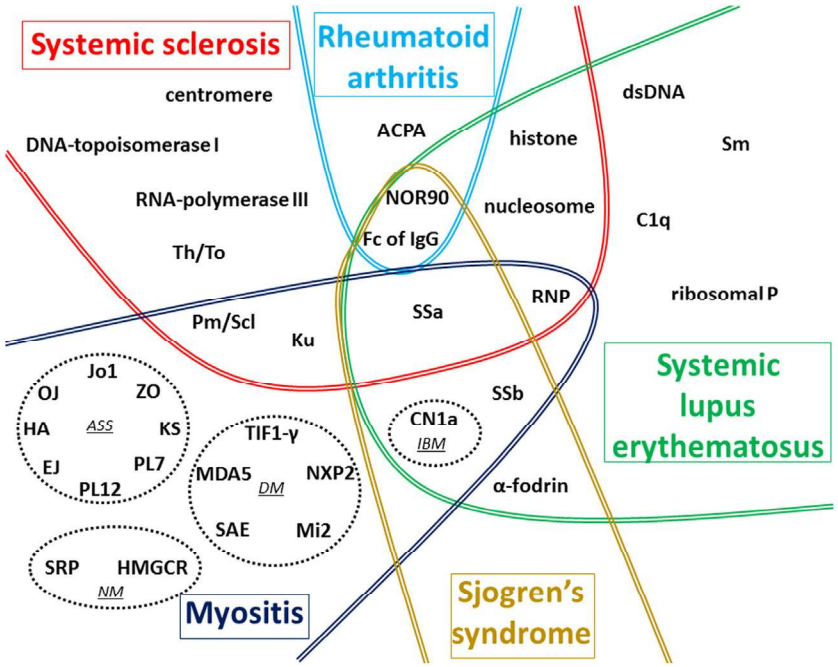


FIGURE 1 | Global vision of autoantigens targeted by autoantibody (AAb) according to the type of connective tissue diseases (CTDs). The main targets of AAb associated with the five CTDs detailed in this review are recapitulated on this figure. In myositis, four distinct forms associated with distinct AAbs are represented in dotted circles: antisynthetase syndrome (ASS), dermatomyositis (DM), necrotizing myopathy (NM), and inclusion body myositis (IBM). In systemic sclerosis (SSc), most AAbs are preferentially associated with one of the two cutaneous forms described: anti-centromere, anti-Th/To, anti-Pm/Scl, anti-Ku, and anti-U1-RNP AAbs are generally associated with limited form of SSc whereas anti-DNA-topoisomerase I, anti-RNA-polymerase III, and anti-U3-RNP AAbs are mostly associated with diffuse cutaneous SSc. The term ACPA regroups anti-cyclic citrullinated peptide and also anti-non-cyclic citrullinated peptides AAb. Fc of IgG corresponds to target of rheumatoid factor. Some AAbs are associated with more than one CTD as shown in the different overlap areas on the figure.

Anti-Citrullinated Protein/Peptide AAb

Citrullination is a process by which arginine residues in a given protein are post-translationally modified ("deiminated") in the presence of high calcium concentrations by an enzyme called PAD (peptidylarginine deiminase) (234, 246). In 1998, two AAbs present in serum samples from patients with RA that had already been described years earlier (antiperinuclear factor and anti-keratin antibodies) were found to share a common specificity for citrullinated filaggrin (247). First, a cyclic citrullinated peptide (CCP) was developed to improve antigen composition and antibody recognition. Then, new assays were developed to detect non-CCPs, and now the term anti-citrullinated protein/peptide AAb (ACPA) has thus replaced anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) AAb (248).

Using CCPs as antigens, ACPA are detected in 60–70% of RA patients (249). ACPA appear more specific for RA than RF. The specificity of ACPA is almost of 95% in RA (243). ACPA can also be detected in patients with SSc (189), psoriatic arthritis, SS, SLE, and MCTD (250).

ACPA are linked to erosive form of RA, and the likelihood of radiographic progression after 5 years is significantly greater among RA patients with ACPA (OR = 2.5) (251, 252). Moreover, detection of both RF and ACPA is associated with a more important radiographic progression and a poorer prognostic factor in patients with RA (252). ACPA can be detected in sera several years before clinical onset of arthritis (253). Recently, a new study showed that serological status (ACPA positivity) is a risk factor of serious infusion-related reactions in RA treated by non-TNF-targeted biologics (254).

Clinical Usefulness of Anti-ACPA Testing

- Useful for diagnosis
- Association with erosive arthritis
- Useful in follow-up to predict disease activity

CONCLUSION

Numerous AAbs can be evidenced in the sera of patients with CTD (**Figure 1**), and new autoantigens are regularly identified in this field of diseases. In the majority of cases, these AAbs are produced before clinical symptoms, but only a minority of these AAbs has been clearly demonstrated to be involved in the pathogenesis of these diseases. The understanding of the implication in pathogenesis of these AAbs still needs to be investigated, notably using animal models, to be able to find new therapeutic targets.

Evidence of these AAbs can help clinicians for disease diagnosis and is therefore frequently mentioned in international classification criteria. Moreover, since some AAbs are correlated with disease activity and/or specific organ involvement, their detection and in some cases their level follow-up can also be a helpful tool in the long-term management of patients with CTD. The final aim of such investigations would be to personalize medical care according to the CTD and AAb identified.

In conclusion, choice in the type of AAb tested should be carefully evaluated according to clinical context for each patient. Importantly, to properly handle the clinical usefulness of AAb detection, clinician should also be aware of both the advantages and the limits of the methods used to test AAb, to support the clinical evaluation, which remains the essential cornerstone for disease diagnosis and patients' management.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KD and AS designed the review. KD, LB, DG, ST, AR, FA, and AS wrote the manuscript. All the authors critically evaluated the data and approved the final version for publication.

REFERENCES

1. Bizzaro N, Tozzoli R, Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Rheum* (2007) 56(6):1736–44. doi:10.1002/art.22708
2. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* (2003) 349(16):1526–33. doi:10.1056/NEJMoa021933
3. Jonsson R, Theander E, Sjöström B, Brokstad K, Henriksson G. Autoantibodies present before symptom onset in primary Sjögren syndrome. *JAMA* (2013) 310(17):1854–5. doi:10.1001/jama.2013.278448
4. Wang K-Y, Yang Y-H, Chuang Y-H, Chan P-J, Yu H-H, Lee J-H, et al. The initial manifestations and final diagnosis of patients with high and low titers of antinuclear antibodies after 6 months of follow-up. *J Microbiol Immunol Infect* (2011) 44(3):222–8. doi:10.1016/j.jmii.2011.01.019
5. Minz RW, Kumar Y, Anand S, Singh S, Bamberi P, Verma S, et al. Antinuclear antibody positive autoimmune disorders in North India: an appraisal. *Rheumatol Int* (2012) 32(9):2883–8. doi:10.1007/s00296-011-2134-1
6. Selmi C, Ceribelli A, Generali E, Scirè CA, Alborghetti F, Colloredo G, et al. Serum antinuclear and extractable nuclear antigen antibody prevalence and associated morbidity and mortality in the general population over 15 years. *Autoimmun Rev* (2016) 15(2):162–6. doi:10.1016/j.autrev.2015.10.007
7. Fernandez SAV, Lobo AZC, de Oliveira ZNP, Fukumori LMI, Prigo AM, Rivitti EA. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood dornors. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* (2003) 58(6):315–9. doi:10.1590/S0041-87812003000600005
8. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis* (2001) 60(12):1131–6. doi:10.1136/ard.60.12.1131
9. Li Q-Z, Karp DR, Quan J, Branch VK, Zhou J, Lian Y, et al. Risk factors for ANA positivity in healthy persons. *Arthritis Res Ther* (2011) 13(2):R38. doi:10.1186/ar3271
10. Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, Sugiyama D, Nakamura T, Morinobu S, et al. Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Mod Rheumatol* (2008) 18(2):153–60. doi:10.1007/s10165-008-0028-1
11. Racoubian E, Zubaid RM, Shareef MA, Almawi WY. Prevalence of antinuclear antibodies in healthy Lebanese subjects, 2008-2015: a cross-sectional study involving 10,814 subjects. *Rheumatol Int* (2016) 36(9):1231–6. doi:10.1007/s00296-016-3533-0
12. Roberts-Thomson PJ, Nikoloutsopoulos T, Cox S, Walker JG, Gordon TP. Antinuclear antibody testing in a regional immunopathology laboratory. *Immunol Cell Biol* (2003) 81(5):409–12. doi:10.1046/j.1440-1711.2003.01181.x
13. Wandstrat AE, Carr-Johnson F, Branch V, Gray H, Fairhurst A-M, Reimold A, et al. Autoantibody profiling to identify individuals at risk for systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* (2006) 27(3):153–60. doi:10.1016/j.jaut.2006.09.001

14. Nilsson B-O, Skogh T, Ernerudh J, Johansson B, Löfgren S, Wikby A, et al. Antinuclear antibodies in the oldest-old women and men. *J Autoimmun* (2006) 27(4):281–8. doi:10.1016/j.jaut.2006.10.002
15. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* (1997) 40(9):1601–11. doi:10.1002/art.1780400909
16. Hayashi N, Kawamoto T, Mukai M, Morinobu A, Koshiba M, Kondo S, et al. Detection of antinuclear antibodies by use of an enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant antigens: comparison with immunofluorescence assay in 307 patients. *Clin Chem* (2001) 47(9):1649–59.
17. Marin GG, Cardiel MH, Cornejo H, Viveros ME. Prevalence of antinuclear antibodies in 3 groups of healthy individuals: blood donors, hospital personnel, and relatives of patients with autoimmune diseases. *J Clin Rheumatol* (2009) 15(7):325–9. doi:10.1097/RHU.0b013e3181bb971b
18. Depincé-Berger AE, Moreau A, Bossy V, Genin C, Rinaudo M, Paul S. Comparison of screening dilution and automated reading for antinuclear antibody detection on HEP2 cells in the monitoring of connective tissue diseases. *J Clin Lab Anal* (2016) 30(5):471–8. doi:10.1002/jcla.21881
19. Bossuyt X, Cooreman S, De Baere H, Verschueren P, Westhovens R, Blockmans D, et al. Detection of antinuclear antibodies by automated indirect immunofluorescence analysis. *Clin Chim Acta* (2013) 415:101–6. doi:10.1016/j.cca.2012.09.021
20. Willems P, De Langhe E, Claessens J, Westhovens R, Van Hoeyveld E, Poesen K, et al. Screening for connective tissue disease-associated antibodies by automated immunoassay. *Clin Chem Lab Med* (2018). doi:10.1515/cclm-2017-0905
21. van der Pol P, Bakker-Jonges LE, Kuijpers JHSAM, Schreurs MWJ. Analytical and clinical comparison of two fully automated immunoassay systems for the detection of autoantibodies to extractable nuclear antigens. *Clin Chim Acta* (2018) 476:154–9. doi:10.1016/j.cca.2017.11.014
22. Robier C, Amouzadeh-Ghadikolai O, Stettin M, Reicht G. Comparison of the clinical utility of the Elia CTD Screen to indirect immunofluorescence on Hep-2 cells. *Clin Chem Lab Med* (2016) 54(8):1365–70. doi:10.1515/cclm-2015-1051
23. Op De Beéck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun Rev* (2012) 12(2):137–43. doi:10.1016/j.autrev.2012.02.013
24. Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev* (2011) 10(12):801–8. doi:10.1016/j.autrev.2011.06.005
25. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* (2010) 69(8):1420–2. doi:10.1136/ard.2009.127100
26. Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EK, Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J Allergy Clin Immunol* (2000) 105(6 Pt 1):1211–20. doi:10.1067/mai.2000.107039
27. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, Usuda T, Tan EM, Takasaki Y, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum* (2004) 50(3):892–900. doi:10.1002/art.20096
28. Mahler M, Parker T, Peebles CL, Andrade LE, Swart A, Carbone Y, et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* (2012) 39(11):2104–10. doi:10.3899/jrheum.120598
29. Shovman O, Gilburd B, Chayat C, Amital H, Langevitz P, Watad A, et al. Prevalence of anti-DFS70 antibodies in patients with and without systemic autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* (2018) 36(1):121–6.
30. Lazzerini PE, Yue Y, Srivastava U, Fabris F, Capecchi PL, Bertolozzi I, et al. Arrhythmogenicity of anti-Ro/SSA antibodies in patients with torsades de pointes. *Circ Arrhythm Electrophysiol* (2016) 9(4):e003419. doi:10.1161/CIRCEP.115.003419
31. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (1997) 40(9):1725. doi:10.1002/art.1780400928
32. Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2012) 64(8):2677–86. doi:10.1002/art.34473
33. Hochberg MC, Boyd RE, Ahearn JM, Arnett FC, Bias WB, Provost TT, et al. Systemic lupus erythematosus: a review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. *Medicine (Baltimore)* (1985) 64(5):285–95. doi:10.1097/00005792-198509000-00001
34. Koh WH, Fong KY, Boey ML, Feng PH. Systemic lupus erythematosus in 61 Oriental males. A study of clinical and laboratory manifestations. *Br J Rheumatol* (1994) 33(4):339–42. doi:10.1093/rheumatology/33.4.339
35. Ginsburg WW, Conn DL, Bunch TW, McDuffie FC. Comparison of clinical and serologic markers in systemic lupus erythematosus and overlap syndrome: a review of 247 patients. *J Rheumatol* (1983) 10(2):235–41.
36. Maddison PJ, Provost TT, Reichlin M. Serological findings in patients with "ANA-negative" systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)* (1981) 60(2):87–94. doi:10.1097/00005792-198103000-00002
37. Boey ML, Peebles CL, Tsay G, Feng PH, Tan EM. Clinical and autoantibody correlations in Orientals with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* (1988) 47(11):918–23. doi:10.1136/ard.47.11.918
38. Ghedira I, Sakly W, Jeddi M. [Clinical and serological characteristics of systemic lupus erythematosus: 128 cases]. *Pathol Biol (Paris)* (2002) 50(1):18–24. doi:10.1016/S0369-8114(01)00262-0
39. Al-Maini MH, El-Ageb EM, Al-Wahaibi SS, Al-Farsi Y, Richens ER. Demographic, autoimmune, and clinical profiles of patients with systemic lupus erythematosus in Oman. *Rheumatol Int* (2003) 23(4):186–91. doi:10.1007/s00296-003-0303-6
40. Cortés-Hernández J, Ordi-Ros J, Labrador M, Buján S, Balada E, Segarra A, et al. Antihistone and anti-double-stranded deoxyribonucleic acid antibodies are associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* (2004) 116(3):165–73. doi:10.1016/j.amjmed.2003.08.034
41. Sawalha AH, Harley JB. Antinuclear autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* (2004) 16(5):534–40. doi:10.1097/01.bor.0000135452.62800.8f
42. Bentow C, Lakos G, Martis P, Wahl E, Garcia M, Viñas O, et al. International multi-center evaluation of a novel chemiluminescence assay for the detection of anti-dsDNA antibodies. *Lupus* (2016) 25(8):864–72. doi:10.1177/0961203316640917
43. Infantino M, Meacci F, Bentow C, Martis P, Benucci M, Afeltra A, et al. Clinical comparison of QUANTA Flash dsDNA chemiluminescent immunoassay with four current assays for the detection of anti-dsDNA autoantibodies. *J Immunol Res* (2015) 2015:902821. doi:10.1155/2015/902821
44. Zigon P, Lakota K, Cucnik S, Svec T, Ambrozic A, Sodin-Semrl S, et al. Comparison and evaluation of different methodologies and tests for detection of anti-dsDNA antibodies on 889 Slovenian patients' and blood donors' sera. *Croat Med J* (2011) 52(6):694–702. doi:10.3325/cmj.2011.52.694
45. Derksen RHWM, Bast EJEG, Strooisma T, Jacobs JWG. A comparison between the Farr radioimmunoassay and a new automated fluorescence immunoassay for the detection of antibodies against double stranded DNA in serum. *Ann Rheum Dis* (2002) 61(12):1099–102. doi:10.1136/ard.61.12.1099
46. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni F, Ghirardello A, et al. Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J Immunol Methods* (1998) 219(1–2):99–107. doi:10.1016/S0022-1759(98)00140-9
47. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015. *Front Immunol* (2015) 6:412. doi:10.3389/fimmu.2015.00412
48. Villalta D, Bizzaro N, Corazza D, Tozzoli R, Tonutti E. Evaluation of a new automated enzyme fluoroimmunoassay using recombinant plasmid dsDNA for the detection of anti-dsDNA antibodies in SLE. *J Clin Lab Anal* (2002) 16(5):227–32. doi:10.1002/jcla.10045
49. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (1982) 25(11):1271–7. doi:10.1002/art.1780251101
50. Albani S, Massa M, Viola S, Pellegrini G, Martini A. Antibody reactivity against single stranded DNA of various species in normal children and

in children with diffuse connective tissue diseases. *Autoimmunity* (1990) 8(1):77–80. doi:10.3109/08916939008998436
51. Schur PH, Sandson J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* (1968) 278(10):533–8. doi:10.1056/NEJM196803072781004
52. Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I, et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* (2003) 62(6):556–60. doi:10.1136/ard.62.6.556
53. Homma M, Mimori T, Takeda Y, Akama H, Yoshida T, Ogasawara T, et al. Autoantibodies to the Sm antigen: immunological approach to clinical aspects of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol Suppl* (1987) 14(Suppl 13):188–93.
54. Yang J, Xu Z, Sui M, Han J, Sun L, Jia X, et al. Co-positivity for anti-dsDNA, -nucleosome and -histone antibodies in lupus nephritis is indicative of high serum levels and severe nephropathy. *PLoS One* (2015) 10(10):e0140441. doi:10.1371/journal.pone.0140441
55. Sardeto GA, Simas LM, Skare TS, Nisihara RM, Utiyama SRR. Antinucleosome in systemic lupus erythematosus. A study in a Brazilian population. *Clin Rheumatol* (2012) 31(3):553–6. doi:10.1007/s10067-011-1889-9
56. Bizzaro N, Villalta D, Giavarina D, Tozzoli R. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis. *Autoimmun Rev* (2012) 12(2):97–106. doi:10.1016/j.autrev.2012.07.002
57. Saisoong S, Eiam-Ong S, Hanvivatvong O. Correlations between antinucleosome antibodies and anti-double-stranded DNA antibodies, C3, C4, and clinical activity in lupus patients. *Clin Exp Rheumatol* (2006) 24(1):51–8.
58. Licht R, van Bruggen MC, Oppers-Walgreen B, Rijke TP, Berden JH. Plasma levels of nucleosomes and nucleosome-autoantibody complexes in murine lupus: effects of disease progression and lipopolyssacharide administration. *Arthritis Rheum* (2001) 44(6):1320–30. doi:10.1002/1529-0131(200106)44:6<1320::AID-ART224>3.0.CO;2-X
59. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, et al. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2000) 43(1):76–84. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<76::AID-ANR10>3.0.CO;2-I
60. Sui M, Sui M, Lin Q, Xu Z, Han X, Xie R, et al. Simultaneous positivity for anti-DNA, anti-nucleosome and anti-histone antibodies is a marker for more severe lupus nephritis. *J Clin Immunol* (2013) 33(2):378–87. doi:10.1007/s10875-012-9825-6
61. Wang CL, Ooi L, Wang F. Prevalence and clinical significance of antibodies to ribonucleoproteins in systemic lupus erythematosus in Malaysia. *Br J Rheumatol* (1996) 35(2):129–32. doi:10.1093/rheumatology/35.2.129
62. Benito-Garcia E, Schur PH, Lahita R; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-Sm and anti-RNP antibody tests. *Arthritis Rheum* (2004) 51(6):1030–44. doi:10.1002/art.20836
63. Flechsig A, Rose T, Barkhudarova F, Strauss R, Klotsche J, Dähnrich C, et al. What is the clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus? A comparison with anti-dsDNA antibodies and C3. *Clin Exp Rheumatol* (2017) 35(4):598–606.
64. Jaekel HP, Klopsch T, Benkenstein B, Grobe N, Baldauf A, Schoessler W, et al. Reactivities to the Sm autoantigenic complex and the synthetic SmD1-aa83-119 peptide in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *J Autoimmun* (2001) 17(4):347–54. doi:10.1006/jaut.2001.0545
65. Ahn SS, Yoo B-W, Song JJ, Park Y-B, Lee S-K, Lee S-W. Anti-Sm is associated with the early poor outcome of lupus nephritis. *Int J Rheum Dis* (2016) 19(9):897–902. doi:10.1111/1756-185X.12880
66. Ishizaki J, Saito K, Nawata M, Mizuno Y, Tokunaga M, Sawamukai N, et al. Low complements and high titre of anti-Sm antibody as predictors of histopathologically proven silent lupus nephritis without abnormal urinalysis in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* (2015) 54(3):405–12. doi:10.1093/rheumatology/keu343
67. Habets WJ, Hoet MH, Sillekens PT, De Rooij DJ, Van de Putte LB, Van Venrooij WJ. Detection of autoantibodies in a quantitative immunoassay using recombinant ribonucleoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* (1989) 76(2):172–7.
68. Gulko PS, Reveille JD, Koopman WJ, Burgard SL, Bartolucci AA, Alarcón GS. Survival impact of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* (1994) 21(2):224–8.
69. Kurien BT, Scofield RH. Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* (2006) 64(3):227–35. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01819.x
70. Vedove CD, Del Giglio M, Schena D, Girolomoni G. Drug-induced lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* (2009) 301(1):99–105. doi:10.1007/s00403-008-0895-5
71. Rubin RL, Waga S. Antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol Suppl* (1987) 14(Suppl 13):118–26.
72. Sun X-Y, Shi J, Han L, Su Y, Li Z-G. Anti-histones antibodies in systemic lupus erythematosus: prevalence and frequency in neuropsychiatric lupus. *J Clin Lab Anal* (2008) 22(4):271–7. doi:10.1002/jcla.20248
73. van Rijthoven AW, Bijlsma JWJ, Canninga-van Dijk M, Derksen RHWM, van Roon JA. Onset of systemic lupus erythematosus after conversion of infliximab to adalimumab treatment in rheumatoid arthritis with a pre-existing anti-dsDNA antibody level. *Rheumatology (Oxford)* (2006) 45(10):1317–9. doi:10.1093/rheumatology/kel227
74. Gisondi P, Girolomoni G. Biologic therapies in psoriasis: a new therapeutic approach. *Autoimmun Rev* (2007) 6(8):515–9. doi:10.1016/j.autrev.2006.12.002
75. Harley JB, Scofield RH, Reichlin M. Anti-Ro in Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* (1992) 18(2):337–58.
76. Tikly M, Burgin S, Mohanlal P, Bellingan A, George J. Autoantibodies in black South Africans with systemic lupus erythematosus: spectrum and clinical associations. *Clin Rheumatol* (1996) 15(3):261–5. doi:10.1007/BF02229704
77. Riemekasten G, Hahn BH. Key autoantigens in SLE. *Rheumatology (Oxford)* (2005) 44(8):975–82. doi:10.1093/rheumatology/keh688
78. Kurien BT, Newland J, Paczkowski C, Moore KL, Scofield RH. Association of neutropenia in systemic lupus erythematosus (SLE) with anti-Ro and binding of an immunologically cross-reactive neutrophil membrane antigen. *Clin Exp Immunol* (2000) 120(1):209–17. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01195.x
79. Vanoni F, Lava SAG, Fossali EF, Cavalli R, Simonetti GD, Bianchetti MG, et al. Neonatal systemic lupus erythematosus syndrome: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* (2017) 53(3):469–76. doi:10.1007/s12016-017-8653-0
80. Buyon JP, Clancy RM. Neonatal lupus: basic research and clinical perspectives. *Rheum Dis Clin North Am* (2005) 31(2):299–313,vii. doi:10.1016/j.rdc.2005.01.010
81. Lee LA. The clinical spectrum of neonatal lupus. *Arch Dermatol Res* (2009) 301(1):107–10. doi:10.1007/s00403-008-0896-4
82. Zuppa AA, Riccardi R, Frezza S, Gallini F, Luciano RMP, Alighieri G, et al. Neonatal lupus: follow-up in infants with anti-SSA/Ro antibodies and review of the literature. *Autoimmun Rev* (2017) 16(4):427–32. doi:10.1016/j.autrev.2017.02.010
83. Tunks RD, Clowse MEB, Miller SG, Brancazio LR, Barker PCA. Maternal autoantibody levels in congenital heart block and potential prophylaxis with antiinflammatory agents. *Am J Obstet Gynecol* (2013) 208(1):64.e1–7. doi:10.1016/j.ajog.2012.09.020
84. Izmirly PM, Costedoat-Chalumeau N, Pisoni CN, Khamashta MA, Kim MY, Saxena A, et al. Maternal use of hydroxychloroquine is associated with a reduced risk of recurrent anti-SSA/Ro-antibody-associated cardiac manifestations of neonatal lupus. *Circulation* (2012) 126(1):76–82. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.089268
85. Rao L, Liu G, Li C, Li Y, Wang Z, Zhou Z, et al. Specificity of anti-SSB as a diagnostic marker for the classification of systemic lupus erythematosus. *Exp Ther Med* (2013) 5(6):1710–4. doi:10.3892/etm.2013.1051
86. Lazzerini PE, Acampa M, Guideri F, Capecchi PL, Campanella V, Morozzi G, et al. Prolongation of the corrected QT interval in adult patients with anti-Ro/SSA-positive connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* (2004) 50(4):1248–52. doi:10.1002/art.20130
87. Lazzerini PE, Capecchi PL, Acampa M, Morozzi G, Bellisai F, Bacarelli MR, et al. Anti-Ro/SSA-associated corrected QT interval prolongation in adults: the role of antibody level and specificity. *Arthritis Care Res* (2011) 63(10):1463–70. doi:10.1002/acr.20540
88. Lazzerini PE, Capecchi PL, Guideri F, Bellisai F, Selvi E, Acampa M, et al. Comparison of frequency of complex ventricular arrhythmias in patients

with positive versus negative anti-Ro/SSA and connective tissue disease. *Am J Cardiol* (2007) 100(6):1029–34. doi:10.1016/j.amjcard.2007.04.048
89. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol* (2000) 76:227–324. doi:10.1016/S0065-2776(01)76021-X
90. Siegert CE, Daha MR, Swaak AJ, van der Voort EA, Breedveld FC. The relationship between serum titers of autoantibodies to C1q and age in the general population and in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* (1993) 67(3 Pt 1):204–9. doi:10.1006/clin.1993.1066
91. Trendelenburg M, Lopez-Trascasa M, Potlukova E, Moll S, Regenass S, Frémeaux-Bacchi V, et al. High prevalence of anti-C1q antibodies in biopsy-proven active lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* (2006) 21(11):3115–21. doi:10.1093/ndt/gfl436
92. Siegert CE, Daha MR, Halma C, van der Voort EA, Breedveld FC. IgG and IgA autoantibodies to C1q in systemic and renal diseases. *Clin Exp Rheumatol* (1992) 10(1):19–23.
93. Sinico RA, Radice A, Ikehata M, Giammarresi G, Corace C, Arrigo G, et al. Anti-C1q autoantibodies in lupus nephritis: prevalence and clinical significance. *Ann N Y Acad Sci* (2005) 1050:193–200. doi:10.1196/annals.1313.020
94. Siegert C, Daha M, Westedt ML, van der Voort E, Breedveld F. IgG autoantibodies against C1q are correlated with nephritis, hypocomplementemia, and dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* (1991) 18(2):230–4.
95. Gunnarsson I, Rönnelid J, Huang YH, Rogberg S, Nilsson B, Lundberg I, et al. Association between ongoing anti-C1q antibody production in peripheral blood and proliferative nephritis in patients with active systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* (1997) 36(1):32–7. doi:10.1093/rheumatology/36.1.32
96. Moroni G, Trendelenburg M, Del Papa N, Quaglini S, Raschi E, Panzeri P, et al. Anti-C1q antibodies may help in diagnosing a renal flare in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* (2001) 37(3):490–8. doi:10.1053/ajkd.2001.22071
97. Orbai A-M, Truedsson L, Sturfelt G, Nived O, Fang H, Alarcón GS, et al. Anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus* (2015) 24(1):42–9. doi:10.1177/0961203314547791
98. Coremans IE, Spronk PE, Bootsma H, Daha MR, van der Voort EA, Kater L, et al. Changes in antibodies to C1q predict renal relapses in systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis* (1995) 26(4):595–601. doi:10.1016/0272-6386(95)90595-2
99. Siegert CE, Daha MR, Tseng CM, Coremans IE, van Es LA, Breedveld FC. Predictive value of IgG autoantibodies against C1q for nephritis in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* (1993) 52(12):851–6. doi:10.1136/ard.52.12.851
100. Siegert CE, Kazatchkine MD, Sjöholm A, Würzner R, Loos M, Daha MR. Autoantibodies against C1q: view on clinical relevance and pathogenic role. *Clin Exp Immunol* (1999) 116(1):4–8. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00867.x
101. Frémeaux-Bacchi V, Noël LH, Schifferli JA. No lupus nephritis in the absence of antiC1q autoantibodies? *Nephrol Dial Transplant* (2002) 17(12):2041–3. doi:10.1093/ndt/17.12.2041
102. Jachiet M, Flageul B, Deroux A, Le Quellec A, Maurier F, Cordoliani F, et al. The clinical spectrum and therapeutic management of hypocomplementemic urticarial vasculitis: data from a French nationwide study of fifty-seven patients. *Arthritis Rheumatol* (2015) 67(2):527–34. doi:10.1002/art.38956
103. Bonfa E, Elkon KB. Clinical and serologic associations of the antiribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum* (1986) 29(8):981–5. doi:10.1002/art.1780290806
104. Ghirardello A, Caponi L, Franceschini F, Zampieri S, Quinzanini M, Bendo R, et al. Diagnostic tests for antiribosomal p protein antibodies: a comparative evaluation of immunoblotting and ELISA assays. *J Autoimmun* (2002) 19(1–2):71–7. doi:10.1006/jaut.2002.0595
105. Borchers AT, Aoki CA, Naguwa SM, Keen CL, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Neuropsychiatric features of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* (2005) 4(6):329–44. doi:10.1016/j.autrev.2005.01.008
106. Eber T, Chapman J, Shoenfeld Y. Anti-ribosomal P-protein and its role in psychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: myth or reality? *Lupus* (2005) 14(8):571–5. doi:10.1191/0961203305lu2150rr
107. Sato T, Uchiumi T, Ozawa T, Kikuchi M, Nakano M, Kominami R, et al. Autoantibodies against ribosomal proteins found with high frequency in patients with systemic lupus erythematosus with active disease. *J Rheumatol* (1991) 18(11):1681–4.
108. Reichlin M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Med* (2006) 6(2):49–52. doi:10.1007/s10238-006-0094-7
109. Mei Y-J, Wang P, Jiang C, Wang T, Chen L-J, Li Z-J, et al. Clinical and serological associations of anti-ribosomal P0 protein antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* (2018) 37(3):703–7. doi:10.1007/s10067-017-3886-0
110. Mok CC, Tang SSK, To CH, Petri M. Incidence and risk factors of thromboembolism in systemic lupus erythematosus: a comparison of three ethnic groups. *Arthritis Rheum* (2005) 52(9):2774–82. doi:10.1002/art.21224
111. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* (1999) 42(7):1309–11. doi:10.1002/1529-0131(199907)42:7<1309::AID-ANR1>3.0.CO;2-F
112. Abreu MM, Danowski A, Wahl DG, Amigo M-C, Tektonidou M, Pacheco MS, et al. The relevance of "non-criteria" clinical manifestations of antiphospholipid syndrome: 14th international congress on antiphospholipid antibodies technical task force report on antiphospholipid syndrome clinical features. *Autoimmun Rev* (2015) 14(5):401–14. doi:10.1016/j.autrev.2015.01.002
113. Ruiz-Irastorza G, Egurbide M-V, Ugalde J, Aguirre C. High impact of antiphospholipid syndrome on irreversible organ damage and survival of patients with systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* (2004) 164(1):77–82. doi:10.1001/archinte.164.1.77
114. Danowski A, de Azevedo MNL, de Souza Papi JA, Petri M. Determinants of risk for venous and arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome and in antiphospholipid syndrome with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* (2009) 36(6):1195–9. doi:10.3899/jrheum.081194
115. Lee JL, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. Revisiting Libman-Sacks endocarditis: a historical review and update. *Clin Rev Allergy Immunol* (2009) 36(2–3):126–30. doi:10.1007/s12016-008-8113-y
116. Zuily S, Regnault V, Selton-Suty C, Eschwège V, Bruntz J-F, Bode-Dotto E, et al. Increased risk for heart valve disease associated with antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: meta-analysis of echocardiographic studies. *Circulation* (2011) 124(2):215–24. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.028522
117. Petri M. Detection of coronary artery disease and the role of traditional risk factors in the Hopkins Lupus Cohort. *Lupus* (2000) 9(3):170–5. doi:10.1191/096120300678828226
118. Zuily S, Domingues V, Suty-Selton C, Eschwège V, Bertoletti L, Chaouat A, et al. Antiphospholipid antibodies can identify lupus patients at risk of pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* (2017) 16(6):576–86. doi:10.1016/j.autrev.2017.04.003
119. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: the global anti-phospholipid syndrome score. *Rheumatology (Oxford)* (2013) 52(8):1397–403. doi:10.1093/rheumatology/kes388
120. Pereira WL, Reiche EMV, Kallaur AP, Kaimen-Maciel DR. Epidemiological, clinical, and immunological characteristics of neuromyelitis optica: a review. *J Neurol Sci* (2015) 355(1–2):7–17. doi:10.1016/j.jns.2015.05.034
121. Dellavance A, Alvarenga RR, Rodrigues SH, Kok F, de Souza AWS, Andrade LEC. Anti-aquaporin-4 antibodies in the context of assorted immune-mediated diseases. *Eur J Neurol* (2012) 19(2):248–52. doi:10.1111/j.1468-1331.2011.03479.x
122. Li H, Wang Y, Xu Q, Zhang A, Zhou H, Zhao S, et al. Features of anti-aquaporin 4 antibody-seropositive Chinese patients with neuromyelitis optica spectrum optic neuritis. *J Neurol* (2015) 262(10):2293–304. doi:10.1007/s00415-015-7844-y
123. Park J-H, Hwang J, Min J-H, Kim BJ, Kang E-S, Lee KH. Presence of anti-Ro/SSA antibody may be associated with anti-aquaporin-4 antibody positivity in neuromyelitis optica spectrum disorder. *J Neurol Sci* (2015) 348(1–2):132–5. doi:10.1016/j.jns.2014.11.020
124. Alexopoulos H, Kampylafka EI, Fouka P, Tatouli I, Akrivou S, Politis PK, et al. Anti-aquaporin-4 autoantibodies in systemic lupus erythematosus persist for years and induce astrocytic cytotoxicity but not CNS disease. *J Neuroimmunol* (2015) 289:8–11. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.10.007

125. Long Y, Qiu W, Lu Z, Bao J, Wu A, Wang Y, et al. Aquaporin 4 antibodies in the cerebrospinal fluid are helpful in diagnosing Chinese patients with neuromyelitis optica. *Neuroimmunomodulation* (2012) 19(2):96–102. doi:10.1159/000330240
126. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: a consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis* (2017) 76(1):9–16. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210571
127. Mulli JC, Cruchaud A. Immunoreactivity to nuclear antigens in systemic lupus erythematosus with or without nephritis, and in other connective tissue diseases, with particular reference to the RNA-protein antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (1977) 53(3):279–89. doi:10.1159/000231763
128. Sulcebe G, Morcka K. Diagnostic and prognostic significance of different antinuclear antibodies in more than 1000 consecutive Albanian patients with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* (1992) 10(3):255–61.
129. Schur PH, DeAngelis D, Jackson JM. Immunological detection of nucleic acids and antibodies to nucleic acids and nuclear antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Clin Exp Immunol* (1974) 17(1):209–18.
130. Theander E, Jonsson R, Sjöström B, Brokstad K, Olsson P, Henriksson G. Prediction of Sjögren's syndrome years before diagnosis and identification of patients with early onset and severe disease course by autoantibody profiling. *Arthritis Rheumatol* (2015) 67(9):2427–36. doi:10.1002/art.39214
131. Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* (2000) 29(5):296–304. doi:10.1016/S0049-0172(00)80016-5
132. Zhao Y, Li Y, Wang L, Li X-F, Huang C-B, Wang G-C, et al. Primary Sjögren syndrome in Han Chinese: clinical and immunological characteristics of 483 patients. *Medicine (Baltimore)* (2015) 94(16):e667. doi:10.1097/MD.0000000000000667
133. Fauchais AL, Martel C, Gondran G, Lambert M, Launay D, Jauberteau MO, et al. Immunological profile in primary Sjögren syndrome: clinical significance, prognosis and long-term evolution to other auto-immune disease. *Autoimmun Rev* (2010) 9(9):595–9. doi:10.1016/j.autrev.2010.05.004
134. Nardi N, Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Aguiló S, Cervera R, Ingelmo M, et al. Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients. *Clin Rheumatol* (2006) 25(3):341–6. doi:10.1007/s10067-005-0059-3
135. Baer AN, McAdams DeMarco M, Shiboski SC, Lam MY, Challacombe S, Daniels TE, et al. The SSB-positive/SSA-negative antibody profile is not associated with key phenotypic features of Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* (2015) 74(8):1557–61. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206683
136. Quartuccio L, Baldini C, Bartoloni E, Priori R, Carubbi F, Corazza L, et al. Anti-SSA/SSB-negative Sjögren's syndrome shows a lower prevalence of lymphoproliferative manifestations, and a lower risk of lymphoma evolution. *Autoimmun Rev* (2015) 14(11):1019–22. doi:10.1016/j.autrev.2015.07.002
137. Ambrosi A, Sonesson S-E, Wahren-Herlenius M. Molecular mechanisms of congenital heart block. *Exp Cell Res* (2014) 325(1):2–9. doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.003
138. Brucato A, Frassi M, Franceschini F, Cimaz R, Faden D, Pisoni MP, et al. Risk of congenital complete heart block in newborns of mothers with anti-Ro/SSA antibodies detected by counterimmunoelectrophoresis: a prospective study of 100 women. *Arthritis Rheum* (2001) 44(8):1832–5. doi:10.1002/1529-0131(200108)44:8<1832::AID-ART320>3.0.CO;2-C
139. Salomonsson S, Sonesson S-E, Ottosson L, Muhallab S, Olsson T, Sunnerhagen M, et al. Ro/SSA autoantibodies directly bind cardiomyocytes, disturb calcium homeostasis, and mediate congenital heart block. *J Exp Med* (2005) 201(1):11–7. doi:10.1084/jem.20041859
140. Bournia V-K, Vlachoyiannopoulos PG. Subgroups of Sjögren syndrome patients according to serological profiles. *J Autoimmun* (2012) 39(1–2):15–26. doi:10.1016/j.jaut.2012.03.001
141. Maruyama T, Saito I, Hayashi Y, Kompfner E, Fox RI, Burton DR, et al. Molecular analysis of the human autoantibody response to alpha-fodrin in Sjögren's syndrome reveals novel apoptosis-induced specificity. *Am J Pathol* (2004) 165(1):53–61. doi:10.1016/S0002-9440(10)63274-9
142. Qin Q, Wang H, Wang H-Z, Huang Y-L, Li H, Zhang W-W, et al. Diagnostic accuracy of anti-alpha-fodrin antibodies for primary Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol* (2014) 24(5):793–7. doi:10.3109/14397595.2013.865823
143. Hu Q, Wang D, Chen W. The accuracy of the anti-α-fodrin antibody test for diagnosis of Sjögren's syndrome: a meta-analysis. *Clin Biochem* (2013) 46(15):1372–6. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.04.020
144. Nordmark G, Rorsman F, Rönnblom L, Cajander S, Taussig MJ, Kämpe O, et al. Autoantibodies to alpha-fodrin in primary Sjögren's syndrome and SLE detected by an in vitro transcription and translation assay. *Clin Exp Rheumatol* (2003) 21(1):49–56.
145. Locht H, Pelck R, Manthorpe R. Diagnostic and prognostic significance of measuring antibodies to alpha-fodrin compared to anti-Ro-52, anti-Ro-60, and anti-La in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* (2008) 35(5):845–9.
146. Hernández-Molina G, Nuñez-Alvarez C, Avila-Casado C, Llorente L, Hernández-Hernández C, Calderillo ML, et al. Usefulness of IgA anti-α-fodrin antibodies in combination with rheumatoid factor and/or antinuclear antibodies as substitute immunological criterion in Sjögren syndrome with negative anti-SSA/SSB antibodies. *J Rheumatol* (2016) 43(10):1852–7. doi:10.3899/jrheum.151315
147. 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(11):2737–47. doi:10.1002/art.38098
148. Salazar GA, Assassi S, Wigley F, Hummers L, Varga J, Hinchcliff M, et al. Antinuclear antibody-negative systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* (2015) 44(6):680–6. doi:10.1016/j.semarthrit.2014.11.006
149. Schneeberger D, Tyndall A, Kay J, Søndergaard KH, Carreira PE, Morgiel E, et al. Systemic sclerosis without antinuclear antibodies or Raynaud's phenomenon: a multicentre study in the prospective EULAR scleroderma trials and research (EUSTAR) database. *Rheumatology (Oxford)* (2013) 52(3):560–7. doi:10.1093/rheumatology/kes315
150. Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, et al. Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* (2017) 50(7):414–21. doi:10.1080/08916934.2017.1357699
151. Heijnen IAFM, Foocharoen C, Bannert B, Carreira PE, Caporali R, Smith V, et al. Clinical significance of coexisting antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis: a EUSTAR group-based study. *Clin Exp Rheumatol* (2013) 31(2 Suppl 76):96–102.
152. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F, et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res Ther* (2011) 13(5):R172. doi:10.1186/ar3495
153. Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Komura K, Kaji K, et al. The clinical relevance of serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* (2008) 158(3):487–95. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08392.x
154. Reveille JD, Solomon DH; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* (2003) 49(3):399–412. doi:10.1002/art.11113
155. Dellavance A, Gallindo C, Soares MG, da Silva NP, Mortara RA, Andrade LEC. Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. *Rheumatology (Oxford)* (2009) 48(6):632–7. doi:10.1093/rheumatology/kep070
156. Jarzabek-Chorzelska M, Blaszczyk M, Jablonska S, Chorzelski T, Kumar V, Beutner EH. Scl 70 antibody – a specific marker of systemic sclerosis. *Br J Dermatol* (1986) 115(4):393–401. doi:10.1111/j.1365-2133.1986.tb06233.x
157. Graf SW, Hakendorf P, Lester S, Patterson K, Walker JG, Smith MD, et al. South Australian Scleroderma Register: autoantibodies as predictive biomarkers of phenotype and outcome. *Int J Rheum Dis* (2012) 15(1):102–9. doi:10.1111/j.1756-185X.2011.01688.x
158. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis* (2007) 66(6):754–63. doi:10.1136/ard.2006.062901
159. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* (2003) 48(5):1363–73. doi:10.1002/art.10977
160. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase

I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* (2000) 43(5):1074–84. doi:10.1002/1529-0131(200005)43:5<1074::AID-ANR18>3.0.CO;2-E
161. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* (1994) 37(1):75–83. doi:10.1002/art.1780370111
162. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* (2003) 48(1):203–9. doi:10.1002/art.10760
163. Santiago M, Baron M, Hudson M, Burlingame RW, Fritzler MJ. Antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis detected by ELISA. *J Rheumatol* (2007) 34(7):1528–34.
164. Sobanski V, Dauchet L, Lefèvre G, Lambert M, Morell-Dubois S, Sy T, et al. Prevalence of anti-RNA polymerase III antibodies in systemic sclerosis: new data from a French cohort and a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol* (2014) 66(2):407–17. doi:10.1002/art.38219
165. Phan TG, Cass A, Gillin A, Trew P, Fertig N, Sturgess A. Anti-RNA polymerase III antibodies in the diagnosis of scleroderma renal crisis sine scleroderma. *J Rheumatol* (1999) 26(11):2489–92.
166. Moinzadeh P, Fonseca C, Hellmich M, Shah AA, Chighizola C, Denton CP, et al. Association of anti-RNA polymerase III autoantibodies and cancer in scleroderma. *Arthritis Res Ther* (2014) 16(1):R53. doi:10.1186/ar4486
167. Lazzaroni M-G, Cavazzana I, Colombo E, Dobrota R, Hernandez J, Hesselstrand R, et al. Malignancies in patients with anti-RNA polymerase III antibodies and systemic sclerosis: analysis of the EULAR scleroderma trials and research cohort and possible recommendations for screening. *J Rheumatol* (2017) 44(5):639–47. doi:10.3899/jrheum.160817
168. Herrick AL, Peytrignet S, Lunt M, Pan X, Hesselstrand R, Mouthon L, et al. Patterns and predictors of skin score change in early diffuse systemic sclerosis from the European Scleroderma Observational Study. *Ann Rheum Dis* (2018). doi:10.1136/annrheumdis-2017-211912
169. Ceribelli A, Krzyszczak ME, Li Y, Ross SJ, Chan JYF, Chan EKL, et al. Atypical clinical presentation of a subset of patients with anti-RNA polymerase III – non-scleroderma cases associated with dominant RNA polymerase I reactivity and nucleolar staining. *Arthritis Res Ther* (2011) 13(4):R119. doi:10.1186/ar3422
170. 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* (2010) 62(9):2787–95. doi:10.1002/art.27549
171. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* (1993) 91(4):1399–404. doi:10.1172/JCI116343
172. Hamaguchi Y, Kodera M, Matsushita T, Hasegawa M, Inaba Y, Usuda T, et al. Clinical and immunologic predictors of scleroderma renal crisis in Japanese systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase III autoantibodies. *Arthritis Rheumatol* (2015) 67(4):1045–52. doi:10.1002/art.38994
173. Mahler M, Raijmakers R, Dähnrich C, Blüthner M, Fritzler MJ. Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen. *Arthritis Res Ther* (2005) 7(3):R704–13. doi:10.1186/ar1455
174. Hanke K, Brückner CS, Dähnrich C, Huscher D, Komorowski L, Meyer W, et al. Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* (2009) 11(1):R22. doi:10.1186/ar2614
175. Wodkowski M, Hudson M, Proudman S, Walker J, Stevens W, Nikpour M, et al. Clinical correlates of monospecific anti-PM75 and anti-PM100 antibodies in a tri-nation cohort of 1574 systemic sclerosis subjects. *Autoimmunity* (2015) 48(8):542–51. doi:10.3109/08916934.2015.1077231
176. Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S, Czirják L, Varjú C, Distler O, et al. Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multi-centre case-control study. *Ann Rheum Dis* (2008) 67(9):1282–6. doi:10.1136/ard.2007.073981
177. Hoa S, Hudson M, Troyanov Y, Proudman S, Walker J, Stevens W, et al. Single-specificity anti-Ku antibodies in an international cohort of 2140 systemic sclerosis subjects: clinical associations. *Medicine (Baltimore)* (2016) 95(35):e4713. doi:10.1097/MD.0000000000004713
178. Charlton D, Laffoon M, Medsger TA, Domsic R. Long-term survival and follow-up of anti-Th/to antibody positive systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheumatol* (2017) 69(Suppl 10):1–4426.
179. Sobanski V, Giovannelli J, Lynch BM, Schreiber BE, Nihtyanova SI, Harvey J, et al. Characteristics and survival of anti-U1 RNP antibody-positive patients with connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheumatol* (2016) 68(2):484–93. doi:10.1002/art.39432
180. Ihn H, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Fujimoto M, Sato S, et al. Distribution and antigen specificity of anti-U1RNP antibodies in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* (1999) 117(2):383–7. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00961.x
181. Tormey VJ, Bunn CC, Denton CP, Black CM. Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* (2001) 40(10):1157–62. doi:10.1093/rheumatology/40.10.1157
182. Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, Oddis CV, Medsger TA. Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* (2009) 60(4):1112–8. doi:10.1002/art.24409
183. Arnett FC, Reveille JD, Goldstein R, Pollard KM, Leaird K, Smith EA, et al. Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis. *Arthritis Rheum* (1996) 39(7):1151–60. doi:10.1002/art.1780390712
184. 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* (2011) 38(8):1622–30. doi:10.3899/jrheum.110071
185. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev* (2009) 8(7):632–7. doi:10.1016/j.autrev.2009.02.010
186. Fujii T, Mimori T, Akizuki M. Detection of autoantibodies to nucleolar transcription factor NOR 90/hUBF in sera of patients with rheumatic diseases, by recombinant autoantigen-based assays. *Arthritis Rheum* (1996) 39(8):1313–8. doi:10.1002/art.1780390808
187. Morozzi G, Bellisai F, Fineschi I, Scaccia F, Pucci G, Simpatico A, et al. Prevalence of anti-histone antibodies, their clinical significance and correlation with other autoantibodies in a cohort of Italian scleroderma patients. *Auto Immun Highlights* (2011) 2(1):29–33. doi:10.1007/s13317-011-0015-y
188. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* (2003) 42(4):534–40. doi:10.1093/rheumatology/keg170
189. Laustriat G, Ruyssen-Witrand A, Constantin A, Barnetche T, Adoue D, Cantagrel A, et al. Anti-citrullinated peptides antibodies in systemic sclerosis: meta-analysis of frequency and meaning. *Jt Bone Spine Rev Rhum* (2017) 85(2):147–53. doi:10.1016/j.jbspin.2017.11.006
190. Koenig M, Fritzler MJ, Targoff IN, Troyanov Y, Senécal J-L. Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes. *Arthritis Res Ther* (2007) 9(4):R78. doi:10.1186/ar2276
191. Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay J-L, Goulet J-R, Raymond Y, Senécal J-L. Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)* (2005) 84(4):231–49. doi:10.1097/01.md.0000173991.74008.b0
192. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* (2004) 14(5):337–45. doi:10.1016/j.nmd.2004.02.006
193. Lloyd TE, Mammen AL, Amato AA, Weiss MD, Needham M, Greenberg SA. Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. *Neurology* (2014) 83(5):426–33. doi:10.1212/WNL.0000000000000642
194. Lega J-C, Fabien N, Reynaud Q, Durieu I, Durupt S, Dutertre M, et al. The clinical phenotype associated with myositis-specific and associated autoantibodies: a meta-analysis revisiting the so-called antisynthetase syndrome. *Autoimmun Rev* (2014) 13(9):883–91. doi:10.1016/j.autrev.2014.03.004
195. Connors GR, Christopher-Stine L, Oddis CV, Danoff SK. Interstitial lung disease associated with the idiopathic inflammatory myopathies: what progress has been made in the past 35 years? *Chest* (2010) 138(6):1464–74. doi:10.1378/chest.10-0180

196. Yoshifuji H, Fujii T, Kobayashi S, Imura Y, Fujita Y, Kawabata D, et al. Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* (2006) 39(3):233–41. doi:10.1080/08916930600622884
197. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Huapaya JA, Albayda J, Paik JJ, Johnson C, et al. A longitudinal cohort study of the anti-synthetase syndrome: increased severity of interstitial lung disease in black patients and patients with anti-PL7 and anti-PL12 autoantibodies. *Rheumatology (Oxford)* (2017) 56(6):999–1007. doi:10.1093/rheumatology/kex021
198. Hervier B, Devilliers H, Stanciu R, Meyer A, Uzunhan Y, Masseau A, et al. Hierarchical cluster and survival analyses of antisynthetase syndrome: phenotype and outcome are correlated with anti-tRNA synthetase antibody specificity. *Autoimmun Rev* (2012) 12(2):210–7. doi:10.1016/j.autrev.2012.06.006
199. Marie I, Josse S, Decaux O, Dominique S, Diot E, Landron C, et al. Comparison of long-term outcome between anti-Jo1- and anti-PL7/PL12 positive patients with antisynthetase syndrome. *Autoimmun Rev* (2012) 11(10):739–45. doi:10.1016/j.autrev.2012.01.006
200. Stone KB, Oddis CV, Fertig N, Katsumata Y, Lucas M, Vogt M, et al. Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* (2007) 56(9):3125–31. doi:10.1002/art.22865
201. Milone M. Diagnosis and management of immune-mediated myopathies. *Mayo Clin Proc* (2017) 92(5):826–37. doi:10.1016/j.mayocp.2016.12.025
202. Kassardjian CD, Lennon VA, Alfugham NB, Mahler M, Milone M. Clinical features and treatment outcomes of necrotizing autoimmune myopathy. *JAMA Neurol* (2015) 72(9):996–1003. doi:10.1001/jamaneurol.2015.1207
203. Arouche-Delaperche L, Allenbach Y, Amelin D, Preusse C, Mouly V, Mauhin W, et al. Pathogenic role of anti-signal recognition protein and anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. *Ann Neurol* (2017) 81(4):538–48. doi:10.1002/ana.24902
204. Allenbach Y, Arouche-Delaperche L, Preusse C, Radbruch H, Butler-Browne G, Champtiaux N, et al. Necrosis in anti-SRP+ and anti-HMGCR+myopathies: role of autoantibodies and complement. *Neurology* (2018) 90(6):e507–17. doi:10.1212/WNL.0000000000004923
205. Watanabe Y, Uruha A, Suzuki S, Nakahara J, Hamanaka K, Takayama K, et al. Clinical features and prognosis in anti-SRP and anti-HMGCR necrotising myopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2016) 87(10):1038–44. doi:10.1136/jnnp-2016-313166
206. Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G, Chung T, Corse AM, Mammen AL. A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* (2010) 62(9):2757–66. doi:10.1002/art.27572
207. Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, Pak KS, Kus JE, Daya NR, et al. Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum* (2012) 64(12):4087–93. doi:10.1002/art.34673
208. Ashton C, Junckerstorff R, Bundell C, Hollingsworth P, Needham M. Treatment and outcomes in necrotising autoimmune myopathy: an Australian perspective. *Neuromuscul Disord* (2016) 26(11):734–40. doi:10.1016/j.nmd.2016.08.013
209. Mammen AL. Statin-associated autoimmune myopathy. *N Engl J Med* (2016) 374(7):664–9. doi:10.1056/NEJMra1515161
210. Benveniste O, Drouot L, Jouen F, Charuel J-L, Bloch-Queyrat C, Behin A, et al. Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* (2011) 63(7):1961–71. doi:10.1002/art.30344
211. Pinal-Fernandez I, Parks C, Werner JL, Albayda J, Paik J, Danoff SK, et al. Longitudinal course of disease in a large cohort of myositis patients with autoantibodies recognizing the signal recognition particle. *Arthritis Care Res* (2017) 69(2):263–70. doi:10.1002/acr.22920
212. Fiorentino DF, Chung LS, Christopher-Stine L, Zaba L, Li S, Mammen AL, et al. Most patients with cancer-associated dermatomyositis have antibodies to nuclear matrix protein NXP-2 or transcription intermediary factor 1γ. *Arthritis Rheum* (2013) 65(11):2954–62. doi:10.1002/art.38093
213. Kaji K, Fujimoto M, Hasegawa M, Kondo M, Saito Y, Komura K, et al. Identification of a novel autoantibody reactive with 155 and 140 kDa nuclear proteins in patients with dermatomyositis: an association with malignancy. *Rheumatology (Oxford)* (2007) 46(1):25–8. doi:10.1093/rheumatology/kel161
214. Trallero-Araguás E, Rodrigo-Pendás JÁ, Selva-O'Callaghan A, Martínez-Gómez X, Bosch X, Labrador-Horrillo M, et al. Usefulness of anti-p155 autoantibody for diagnosing cancer-associated dermatomyositis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* (2012) 64(2):523–32. doi:10.1002/art.33379
215. Mugii N, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Oohata S, Okita H, et al. Oropharyngeal dysphagia in dermatomyositis: associations with clinical and laboratory features including autoantibodies. *PLoS One* (2016) 11(5):e0154746. doi:10.1371/journal.pone.0154746
216. Ceribelli A, Fredi M, Taraborelli M, Cavazzana I, Franceschini F, Quinzanini M, et al. Anti-MJ/NXP-2 autoantibody specificity in a cohort of adult Italian patients with polymyositis/dermatomyositis. *Arthritis Res Ther* (2012) 14(2):R97. doi:10.1186/ar3822
217. Gunawardena H, Wedderburn LR, Chinoy H, Betteridge ZE, North J, Ollier WER, et al. Autoantibodies to a 140-kd protein in juvenile dermatomyositis are associated with calcinosis. *Arthritis Rheum* (2009) 60(6):1807–14. doi:10.1002/art.24547
218. Espada G, Maldonado Cocco JA, Fertig N, Oddis CV. Clinical and serologic characterization of an Argentine pediatric myositis cohort: identification of a novel autoantibody (anti-MJ) to a 142-kDa protein. *J Rheumatol* (2009) 36(11):2547–51. doi:10.3899/jrheum.090461
219. Fiorentino D, Chung L, Zwerner J, Rosen A, Casciola-Rosen L. The mucocutaneous and systemic phenotype of dermatomyositis patients with antibodies to MDA5 (CADM-140): a retrospective study. *J Am Acad Dermatol* (2011) 65(1):25–34. doi:10.1016/j.jaad.2010.09.016
220. Chen Z, Cao M, Plana MN, Liang J, Cai H, Kuwana M, et al. Utility of anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody measurement in identifying patients with dermatomyositis and a high risk for developing rapidly progressive interstitial lung disease: a review of the literature and a meta-analysis. *Arthritis Care Res* (2013) 65(8):1316–24. doi:10.1002/acr.21985
221. Zhang L, Wu G, Gao D, Liu G, Pan L, Ni L, et al. Factors associated with interstitial lung disease in patients with polymyositis and dermatomyositis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* (2016) 11(5):e0155381. doi:10.1371/journal.pone.0155381
222. Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, et al. The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)* (2010) 49(3):433–40. doi:10.1093/rheumatology/kep375
223. Muro Y, Sugiura K, Hoshino K, Akiyama M. Disappearance of anti-MDA-5 autoantibodies in clinically amyopathic DM/interstitial lung disease during disease remission. *Rheumatology (Oxford)* (2012) 51(5):800–4. doi:10.1093/rheumatology/ker408
224. Gono T, Sato S, Kawaguchi Y, Kuwana M, Hanaoka M, Katsumata Y, et al. Anti-MDA5 antibody, ferritin and IL-18 are useful for the evaluation of response to treatment in interstitial lung disease with anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* (2012) 51(9):1563–70. doi:10.1093/rheumatology/kes102
225. Tarricone E, Ghirardello A, Rampudda M, Bassi N, Punzi L, Doria A. Anti-SAE antibodies in autoimmune myositis: identification by unlabelled protein immunoprecipitation in an Italian patient cohort. *J Immunol Methods* (2012) 384(1–2):128–34. doi:10.1016/j.jim.2012.07.019
226. Betteridge ZE, Gunawardena H, Chinoy H, North J, Ollier WER, Cooper RG, et al. Clinical and human leucocyte antigen class II haplotype associations of autoantibodies to small ubiquitin-like modifier enzyme, a dermatomyositis-specific autoantigen target, in UK Caucasian adult-onset myositis. *Ann Rheum Dis* (2009) 68(10):1621–5. doi:10.1136/ard.2008.097162
227. Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. Low prevalence of anti-small ubiquitin-like modifier activating enzyme antibodies in dermatomyositis patients. *Autoimmunity* (2013) 46(4):279–84. doi:10.3109/08916934.2012.755958
228. Kang EH, Nakashima R, Mimori T, Kim J, Lee YJ, Lee EB, et al. Myositis autoantibodies in Korean patients with inflammatory myositis: anti-140-kDa polypeptide antibody is primarily associated with rapidly progressive interstitial lung disease independent of clinically amyopathic dermatomyositis. *BMC Musculoskelet Disord* (2010) 11:223. doi:10.1186/1471-2474-11-223

229. Petri MH, Satoh M, Martin-Marquez BT, Vargas-Ramírez R, Jara LJ, Saavedra MA, et al. Implications in the difference of anti-Mi-2 and -p155/140 autoantibody prevalence in two dermatomyositis cohorts from Mexico City and Guadalajara. *Arthritis Res Ther* (2013) 15(2):R48. doi:10.1186/ar4207
230. Schmidt K, Schmidt J. Inclusion body myositis: advancements in diagnosis, pathomechanisms, and treatment. *Curr Opin Rheumatol* (2017) 29(6):632–8. doi:10.1097/BOR.0000000000000436
231. Salajegheh M, Lam T, Greenberg SA. Autoantibodies against a 43 KDa muscle protein in inclusion body myositis. *PLoS One* (2011) 6(5):e20266. doi:10.1371/journal.pone.0020266
232. Herbert MK, Stammen-Vogelzangs J, Verbeek MM, Rietveld A, Lundberg IE, Chinoy H, et al. Disease specificity of autoantibodies to cytosolic 5′-nucleotidase 1A in sporadic inclusion body myositis versus known autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* (2016) 75(4):696–701. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206691
233. Benveniste O, Stenzel W, Allenbach Y. Advances in serological diagnostics of inflammatory myopathies. *Curr Opin Neurol* (2016) 29(5):662–73. doi:10.1097/WCO.0000000000000376
234. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet Lond Engl* (2016) 388(10055):2023–38. doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8
235. Kapetanovic MC, Larsson L, Truedsson L, Sturfelt G, Saxne T, Geborek P. Predictors of infusion reactions during infliximab treatment in patients with arthritis. *Arthritis Res Ther* (2006) 8(4):R131. doi:10.1186/ar2020
236. Yukawa N, Fujii T, Kondo-Ishikawa S, Yoshifuji H, Kawabata D, Nojima T, et al. Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. *Arthritis Res Ther* (2011) 13(6):R213. doi:10.1186/ar3546
237. Othman MA, Ghazali WSW, Hamid WZWA, Wong KK, Yahya NK. Anti-carbamylated protein antibodies in rheumatoid arthritis patients and their association with rheumatoid factor. *Saudi Med J* (2017) 38(9):934–41. doi:10.15537/smj.2017.9.20841
238. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (1988) 31(3):315–24. doi:10.1002/art.1780310302
239. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* (2010) 62(9):2569–81. doi:10.1002/art.27584
240. Jiang X, Frisell T, Askling J, Karlson EW, Klareskog L, Alfredsson L, et al. To what extent is the familial risk of rheumatoid arthritis explained by established rheumatoid arthritis risk factors? *Arthritis Rheumatol* (2015) 67(2):352–62. doi:10.1002/art.38927
241. Frisell T, Hellgren K, Alfredsson L, Raychaudhuri S, Klareskog L, Askling J. Familial aggregation of arthritis-related diseases in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: a register-based case-control study in Sweden. *Ann Rheum Dis* (2016) 75(1):183–9. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206133
242. Franklin EC, Holman HR, Muller-Eberhard HJ, Kunkel HG. An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* (1957) 105(5):425–38. doi:10.1084/jem.105.5.425
243. Taylor P, Gartemann J, Hsieh J, Creeden J. A systematic review of serum biomarkers anti-cyclic citrullinated Peptide and rheumatoid factor as tests for rheumatoid arthritis. *Autoimmune Dis* (2011) 2011:815038. doi:10.4061/2011/815038
244. Jónsson T, Thorsteinsson H, Arinbjarnarson S, Thorsteinsson J, Valdimarsson H. Clinical implications of IgA rheumatoid factor subclasses. *Ann Rheum Dis* (1995) 54(7):578–81. doi:10.1136/ard.54.7.578
245. Tan EM, Smolen JS. Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. *J Exp Med* (2016) 213(10):1937–50. doi:10.1084/jem.20160792
246. Farid SS, Azizi G, Mirshafiey A. Anti-citrullinated protein antibodies and their clinical utility in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* (2013) 16(4):379–86. doi:10.1111/1756-185X.12129
247. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* (1979) 2(6182):97–9. doi:10.1136/bmj.2.4670.97
248. Aggarwal R, Liao K, Nair R, Ringold S, Costenbader KH. Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2009) 61(11):1472–83. doi:10.1002/art.24827
249. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* (1998) 101(1):273–81. doi:10.1172/JCI1316
250. Payet J, Goulvestre C, Bialé L, Avouac J, Wipff J, Job-Deslandre C, et al. Anticyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid and nonrheumatoid rheumatic disorders: experience with 1162 patients. *J Rheumatol* (2014) 41(12):2395–402. doi:10.3899/jrheum.131375
251. Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* (2003) 62(2):120–6. doi:10.1136/ard.62.2.120
252. Syversen SW, Gaarder PI, Goll GL, Ødegård S, Haavardsholm EA, Mowinckel P, et al. High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis* (2008) 67(2):212–7. doi:10.1136/ard.2006.068247
253. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* (2004) 50(2):380–6. doi:10.1002/art.20018
254. Salmon J-H, Perotin J-M, Morel J, Dramé M, Cantagrel A, Ziegler LE, et al. Serious infusion-related reaction after rituximab, abatacept and tocilizumab in rheumatoid arthritis: prospective registry data. *Rheumatology (Oxford)* (2018) 57(1):134–9. doi:10.1093/rheumatology/kex403

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Didier, Bolko, Giusti, Toquet, Robbins, Antonicelli and Servettaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

REFERENCES

1. Chifflot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. Semin Arthritis Rheum. 2008 Feb;37(4):223–35.

2. 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. 2023 Mar;248:109267.

3. Arnett FC, Howard RF, Tan F, Moulds JM, Bias WB, Durban E, et al. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. Arthritis Rheum. 1996 Aug;39(8):1362–70.

4. Al-Sheikh H, Ahmad Z, Johnson SR. Ethnic Variations in Systemic Sclerosis Disease Manifestations, Internal Organ Involvement, and Mortality. J Rheumatol. 2019 Sep;46(9):1103–8.

5. Kuchinad KE, Kim JS, Woods A, Leatherman G, Gutierrez-Alamillo L, Mayes MD, et al. Racial variability in immune responses only partially explains differential systemic sclerosis disease severity. Ann Rheum Dis. 2024 Jul 17;ard-2023-225458.

6. Chairta P, Nicolaou P, Christodoulou K. Genomic and genetic studies of systemic sclerosis: A systematic review. Hum Immunol. 2017 Feb;78(2):153–65.

7. Rodriguez-Reyna TS, Mercado-Velázquez P, Yu N, Alosco S, Ohashi M, Lebedeva T, et al. HLA Class I and II Blocks Are Associated to Susceptibility, Clinical Subtypes and Autoantibodies in Mexican Systemic Sclerosis (SSc) Patients. PLoS ONE. 2015;10(5):e0126727.

8. Louthrenoo W, Kasitanon N, Wongthanee A, Okudaira Y, Takeuchi M, Nakajima F, et al. Association of HLA-DRB1*15:02:01, DQB1*05:01:24 and DPB1*13:01:01 in Thai patients with systemic sclerosis. HLA. 2022 Dec;100(6):563–81.

9. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. Arthritis Rheum. 2003 Jul;48(7):1956–63.

10. Zochling J, Newell F, Charlesworth JC, Leo P, Stankovich J, Cortes A, et al. An Immunochip-based interrogation of scleroderma susceptibility variants identifies a novel association at DNASE1L3. Arthritis Res Ther. 2014 Oct 21;16(5):438.

11. Mayes MD, Bossini-Castillo L, Gorlova O, Martin JE, Zhou X, Chen WV, et al. Immunochip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. Am J Hum Genet. 2014 Jan 2;94(1):47–61.

12. Zervou MI, Andreou A, Matalliotakis M, Spandidos DA, Goulielmos GN, Eliopoulos EE. Association of the DNASE1L3 rs35677470 polymorphism with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and systemic sclerosis: Structural biological insights. Mol Med Rep. 2020 Dec;22(6):4492–8.

13. Coke LN, Wen H, Comeau M, Ghanem MH, Shih A, Metz CN, et al. Arg206Cys substitution in DNASE1L3 causes a defect in DNASE1L3 protein secretion that confers risk of systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2021 Jun;80(6):782–7.

14. McCord JJ, Engavale M, Masoumzadeh E, Villarreal J, Mapp B, Latham MP, et al. Structural features of Dnase1L3 responsible for serum antigen clearance. Commun Biol. 2022 Aug 16;5(1):825.

15. Skaug B, Guo X, Li YJ, Charles J, Pham KT, Couturier J, et al. Reduced digestion of circulating genomic DNA in systemic sclerosis patients with the DNASE1L3 R206C variant. Rheumatology (Oxford). 2023 Sep 1;62(9):3197–204.

16. Medsger TA. Natural history of systemic sclerosis and the assessment of disease activity, severity, functional status, and psychologic well-being. Rheum Dis Clin North Am. 2003 May;29(2):255–73, vi.

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

18. Meier FMP, Frommer KW, Dinser R, Walker UA, Czirjak L, Denton CP, et al. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. Ann Rheum Dis. 2012 Aug;71(8):1355–60.

19. Hao Y, Hudson M, Baron M, Carreira P, Stevens W, Rabusa C, et al. Early Mortality in a Multinational Systemic Sclerosis Inception Cohort. Arthritis Rheumatol. 2017;69(5):1067–77.

20. Lescoat A, Huang S, Carreira PE, Siegert E, de Vries-Bouwstra J, Distler JHW, et al. Cutaneous Manifestations, Clinical Characteristics, and Prognosis of Patients With Systemic Sclerosis Sine Scleroderma: Data From the International EUSTAR Database. JAMA Dermatol. 2023 Aug 1;159(8):837–47.

21. De Angelis R, Ferri C, Giuggioli D, Bajocchi G, Dagna L, Bellando-Randone S, et al. Systemic sclerosis sine scleroderma: clinical and serological features and relationship with other cutaneous subsets in a large series of patients from the national registry "SPRING" of the Italian Society for Rheumatology. RMD Open. 2023 Mar;9(1):e002890.

22. Elhai M, Meune C, Boubaya M, Avouac J, Hachulla E, Balbir-Gurman A, et al. Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2017;76(11):1897–905.

23. Cottin V, Brown KK. Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD). Respir Res. 2019 Jan 18;20(1):13.

24. Didier K, Sobanski V, Robbins A, Truchetet ME, Barnetche T, Contin-Bordes C, et al. Impact of autoantibody status on stratifying the risk of organ involvement and mortality in SSc: experience from a multicentre French cohort of 1605 patients. RMD Open. 2024 Nov 20;10(4):e004580.

25. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Eur Respir J. 2023 Jan;61(1):2200879.

26. Cole A, Ong VH, Denton CP. Renal Disease and Systemic Sclerosis: an Update on Scleroderma Renal Crisis. Clin Rev Allergy Immunol. 2023 Jun;64(3):378–91.

27. Valentini G, Cuomo G, Abignano G, Petrillo A, Vettori S, Capasso A, et al. Early systemic sclerosis: assessment of clinical and pre-clinical organ involvement in patients with different disease features. Rheumatology (Oxford). 2011 Feb;50(2):317–23.

28. Thoua NM, Bunce C, Brough G, Forbes A, Emmanuel AV, Denton CP. Assessment of gastrointestinal symptoms in patients with systemic sclerosis in a UK tertiary referral centre. Rheumatology (Oxford). 2010 Sep;49(9):1770–5.

29. Valenzuela A, Li S, Becker L, Fernandez-Becker N, Khanna D, Nguyen L, et al. Intestinal pseudo-obstruction in patients with systemic sclerosis: an analysis of the Nationwide Inpatient Sample. Rheumatology (Oxford). 2016 Apr;55(4):654–8.

30. Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F, et al. Autoantibodies Associated With Connective Tissue Diseases: What Meaning for Clinicians? Front Immunol. 2018;9:541.

31. Burbelo PD, Gordon SM, Waldman M, Edison JD, Little DJ, Stitt RS, et al. Autoantibodies are present before the clinical diagnosis of systemic sclerosis. PLoS ONE. 2019;14(3):e0214202.

32. Arnett FC, Reveille JD, Goldstein R, Pollard KM, Leaird K, Smith EA, et al. Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis. Arthritis Rheum. 1996 Jul;39(7):1151–60.

33. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. Semin Arthritis Rheum. 2005 Aug;35(1):35–42.

34. Nihtyanova SI, Sari A, Harvey JC, Leslie A, Derrett-Smith EC, Fonseca C, et al. Using Autoantibodies and Cutaneous Subset to Develop Outcome-Based Disease Classification in Systemic Sclerosis. Arthritis Rheumatol. 2020;72(3):465–76.

35. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F, et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: correlation with characteristic clinical features. Arthritis Res Ther. 2011;13(5):R172.

36. Nunes JPL, Cunha AC, Meirinhos T, Nunes A, Araújo PM, Godinho AR, et al. Prevalence of auto-antibodies associated to pulmonary arterial hypertension in scleroderma - A review. Autoimmun Rev. 2018 Dec;17(12):1186–201.

37. Wodkowski M, Hudson M, Proudman S, Walker J, Stevens W, Nikpour M, et al. Clinical correlates of monospecific anti-PM75 and anti-PM100 antibodies in a tri-nation cohort of 1574 systemic sclerosis subjects. Autoimmunity. 2015;48(8):542–51.

38. Spielmann L, Nespola B, Séverac F, Andres E, Kessler R, Guffroy A, et al. Anti-Ku syndrome with elevated CK and anti-Ku syndrome with anti-dsDNA are two distinct entities with different outcomes. Ann Rheum Dis. 2019 Aug;78(8):1101–6.

39. Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, Oddis CV, Medsger TA. Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2009 Apr;60(4):1112–8.

40. Charlton D, Laffoon M, Medsger TA, Domsic R. Long-Term Survival and Follow-up of Anti-Th/to Antibody Positive Systemic Sclerosis Patients. Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ). 2017 Oct;69(suppl 10):1–4426.

41. Dima A, Vonk MC, Garaiman A, Kersten BE, Becvar R, Tomcik M, et al. Clinical significance of the anti-Nucleolar Organizer Region 90 antibodies (NOR90) in systemic sclerosis: Analysis of the European Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) cohort and a systematic literature review. Eur J Intern Med. 2024 Jul;125:104–10.

42. 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. 1980;23(5):581–90.

43. 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 Nov;65(11):2737–47.

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

45. Sobanski V, Giovannelli J, Allanore Y, Riemekasten G, Airò P, Vettori S, et al. Phenotypes Determined by Cluster Analysis and Their Survival in the Prospective European Scleroderma Trials and Research Cohort of Patients With Systemic Sclerosis. Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ). 2019 Sep;71(9):1553–70.

46. Pope JE, Denton CP, Johnson SR, Fernandez-Codina A, Hudson M, Nevskaya T. State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis. Nat Rev Rheumatol. 2023 Apr;19(4):212–26.

47. Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, McSweeney PA, Pinckney A, Welch B, et al. Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. N Engl J Med. 2018 04;378(1):35–47.

48. Auth J, Müller F, Völkl S, Bayerl N, Distler JHW, Tur C, et al. CD19-targeting CAR T-cell therapy in patients with diffuse systemic sclerosis: a case series. Lancet Rheumatol. 2025 Feb;7(2):e83–93.

49. PNDS Sclérodermie systémique [Internet]. 2021 [cited 2024 Jul 22]. Available from: https://www.fai2r.org/pnds/sclerodermie/

50. Campochiaro C, Allanore Y, Braun-Moscovici Y, Matucci-Cerinic M, Balbir-Gurman A. Is cyclophosphamide still the gold standard in early severe rapidly progressive systemic sclerosis? Autoimmun Rev. 2024 Jan;23(1):103439.

51. Hoeper MM, Badesch DB, Ghofrani HA, Gibbs JSR, Gomberg-Maitland M, McLaughlin VV, et al. Phase 3 Trial of Sotatercept for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. N Engl J Med. 2023 Apr 20;388(16):1478–90.

52. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. Ann Rheum Dis. 2007 Jul;66(7):940–4.

53. Hudson M, Baron M, Tatibouet S, Furst DE, Khanna D, International Scleroderma Renal Crisis Study Investigators. Exposure to ACE inhibitors prior to the onset of scleroderma renal crisis-results from the International Scleroderma Renal Crisis Survey. Semin Arthritis Rheum. 2014 Apr;43(5):666–72.

54. Rirash F, Tingey PC, Harding SE, Maxwell LJ, Tanjong Ghogomu E, Wells GA, et al. Calcium channel blockers for primary and secondary Raynaud's phenomenon. Cochrane Database Syst Rev. 2017 Dec 13;12(12):CD000467.

55. Pope J, Fenlon D, Thompson A, Shea B, Furst D, Wells G, et al. Iloprost and cisaprost for Raynaud's phenomenon in progressive systemic sclerosis. Cochrane Database Syst Rev. 2000;1998(2):CD000953.

56. Volkmann ER, Tashkin DP, Leng M, Kim GHJ, Goldin J, Roth MD. Association of Symptoms of Gastroesophageal Reflux, Esophageal Dilation, and Progression of Systemic Sclerosis-Related Interstitial Lung Disease. Arthritis Care Res (Hoboken). 2023 Aug;75(8):1690–7.

57. Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. Rheumatology (Oxford). 2012 Jun;51(6):1017–26.

58. Didier K, Robbins A, Antonicelli F, Pham BN, Giusti D, Servettaz A. [Updates in systemic sclerosis pathogenesis: Toward new therapeutic opportunities]. Rev Med Interne. 2019 Oct;40(10):654–63.

59. Claman HN, Giorno RC, Seibold JR. Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma. The myth of the "uninvolved skin." Arthritis Rheum. 1991 Dec;34(12):1495–501.

60. Cotton SA, Herrick AL, Jayson MI, Freemont AJ. TGF beta--a role in systemic sclerosis? J Pathol. 1998 Jan;184(1):4–6.

61. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. J Invest Dermatol. 1998 Jan;110(1):47–51.

62. Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. Arthritis Rheum. 2003 Jul;48(7):1964–78.

63. Chen SJ, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M, Varga J. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. J Invest Dermatol. 1999 Jan;112(1):49–57.

64. Bhattacharyya S, Ghosh AK, Pannu J, Mori Y, Takagawa S, Chen G, et al. Fibroblast expression of the coactivator p300 governs the intensity of profibrotic response to transforming growth factor beta. Arthritis Rheum. 2005 Apr;52(4):1248–58.

65. Manetti M. Fli1 deficiency and beyond: a unique pathway linking peripheral vasculopathy and dermal fibrosis in systemic sclerosis. Exp Dermatol. 2015 Apr;24(4):256–7.

66. Sacchetti C, Bai Y, Stanford SM, Di Benedetto P, Cipriani P, Santelli E, et al. PTP4A1 promotes TGFβ signaling and fibrosis in systemic sclerosis. Nat Commun. 2017 Oct 20;8(1):1060.

67. Rupérez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. Circulation. 2003 Sep 23;108(12):1499–505.

68. Higley H, Persichitte K, Chu S, Waegell W, Vancheeswaran R, Black C. Immunocytochemical localization and serologic detection of transforming growth factor beta 1. Association with type I procollagen and inflammatory cell markers in diffuse and limited systemic sclerosis, morphea, and Raynaud's phenomenon. Arthritis Rheum. 1994 Feb;37(2):278–88.

69. Abraham D. Connective tissue growth factor: growth factor, matricellular organizer, fibrotic biomarker or molecular target for anti-fibrotic therapy in SSc? Rheumatology (Oxford). 2008 Oct;47 Suppl 5:v8-9.

70. Kirk TZ, Mark ME, Chua CC, Chua BH, Mayes MD. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. J Biol Chem. 1995 Feb 17;270(7):3423–8.

71. 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. 2006 Jun 22;354(25):2667–76.

72. Svegliati S, Amico D, Spadoni T, Fischetti C, Finke D, Moroncini G, et al. Agonistic Anti-PDGF Receptor Autoantibodies from Patients with Systemic Sclerosis Impact Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Function In Vitro. Front Immunol. 2017;8:75.

73. Tsou PS, Talia NN, Pinney AJ, Kendzicky A, Piera-Velazquez S, Jimenez SA, et al. Effect of oxidative stress on protein tyrosine phosphatase 1B in scleroderma dermal fibroblasts. Arthritis Rheum. 2012 Jun;64(6):1978–89.

74. Svegliati S, Cancello R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G, et al. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. J Biol Chem. 2005 Oct 28;280(43):36474–82.

75. Dooley A, Shi-Wen X, Aden N, Tranah T, Desai N, Denton CP, et al. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. Rheumatology (Oxford). 2010 Nov;49(11):2024–36.

76. 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. 2007 Sep;66(9):1202–9.

77. van der Slot AJ, Zuurmond AM, Bardoel AFJ, Wijmenga C, Pruijs HEH, Sillence DO, et al. Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. J Biol Chem. 2003 Oct 17;278(42):40967–72.

78. Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. Arthritis Rheum. 2001 Jul;44(7):1667–76.

79. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol. 1997 Feb;24(2):328–32.

80. Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer JM, Roosnek E, Chizzolini C. Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2007 Oct;56(10):3459–67.

81. Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, et al. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 1999 Jun;42(6):1168–78.

82. Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. Cell Mol Biol. 1991;37(8):823–9.

83. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghow R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. J Clin Invest. 1992 Oct;90(4):1479–85.

84. 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.

85. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2002 Jun;46(6):1602–13.

86. Fineschi S, Goffin L, Rezzonico R, Cozzi F, Dayer JM, Meroni PL, et al. Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. Arthritis Rheum. 2008 Dec;58(12):3913–23.

87. Favoino E, Cipriani P, Liakouli V, Corrado A, Navarini L, Vomero M, et al. Clinical correlates of a subset of anti-fibroblast antibodies in systemic sclerosis. Clin Immunol. 2023 Oct;255:109740.

88. Wermuth PJ, Carney KR, Mendoza FA, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial cell-specific activation of transforming growth factor-β signaling in mice induces cutaneous, visceral, and microvascular fibrosis. Lab Invest. 2017;97(7):806–18.

89. Maurer B, Distler A, Suliman YA, Gay RE, Michel BA, Gay S, et al. Vascular endothelial growth factor aggravates fibrosis and vasculopathy in experimental models of systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2014 Oct;73(10):1880–7.

90. 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. 2017 May;76(5):924–34.

91. Di Benedetto P, Ruscitti P, Berardicurti O, Vomero M, Navarini L, Dolo V, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in systemic sclerosis. Clin Exp Immunol. 2021 Jul;205(1):12–27.

92. Chiu YH, Spierings J, van Laar JM, de Vries-Bouwstra JK, van Dijk M, Goldschmeding R. Association of endothelial to mesenchymal transition and cellular senescence with fibrosis in skin biopsies of systemic sclerosis patients: a cross-sectional study. Clin Exp Rheumatol. 2023 Aug;41(8):1612–7.

93. Corallo C, Cutolo M, Kahaleh B, Pecetti G, Montella A, Chirico C, et al. Bosentan and macitentan prevent the endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) in systemic sclerosis: in vitro study. Arthritis Res Ther. 2016 06;18(1):228.

94. Chora I, Romano E, Manetti M, Mazzotta C, Costa R, Machado V, et al. Evidence for a Derangement of the Microvascular System in Patients with a Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis. J Rheumatol. 2017;44(8):1190–7.

95. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, et al. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction? J Rheumatol. 1994 Oct;21(10):1838–44.

96. 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. 2005 Apr;24(2):111–6.

97. Kahaleh MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. Arthritis Rheum. 1991 Aug;34(8):978–83.

98. Cardillo C, Schinzari F, Melina D, Mores N, Bosello S, Peluso G, et al. Improved endothelial function after endothelin receptor blockade in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2009 Jun;60(6):1840–4.

99. Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, Fukasawa C, Sugiura T, Nishimagi E, et al. Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors. Arthritis Rheum. 2004 Jan;50(1):216–26.

100. Pignone A, Rosso AD, Brosnihan KB, Perfetto F, Livi R, Fiori G, et al. Reduced circulating levels of angiotensin-(1--7) in systemic sclerosis: a new pathway in the dysregulation of endothelial-dependent vascular tone control. Ann Rheum Dis. 2007 Oct;66(10):1305–10.

101. Mouthon L, Bussone G, Berezné A, Noël LH, Guillevin L. Scleroderma renal crisis. J Rheumatol. 2014 Jun;41(6):1040–8.

102. Allanore Y, Borderie D, Hilliquin P, Hernvann A, Levacher M, Lemaréchal H, et al. Low levels of nitric oxide (NO) in systemic sclerosis: inducible NO synthase production is decreased in cultured peripheral blood monocyte/macrophage cells. Rheumatology (Oxford). 2001 Oct;40(10):1089–96.

103. Sinici I, Kalyoncu U, Karahan S, Kiraz S, Atalar E. Endothelial nitric oxide gene polymorphism and risk of systemic sclerosis: predisposition effect of T-786C promoter and protective effect of 27 bp repeats in Intron 4. Clin Exp Rheumatol. 2010 Apr;28(2):169–75.

104. Takagi K, Kawaguchi Y, Hara M, Sugiura T, Harigai M, Kamatani N. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. Clin Exp Immunol. 2003 Dec;134(3):538–44.

105. Cotton SA, Herrick AL, Jayson MI, Freemont AJ. Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. J Pathol. 1999 Oct;189(2):273–8.

106. Distler JHW, Jüngel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, Gay RE, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Feb 22;102(8):2892–7.

107. 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. 2004 Sep;37(9):1423–7.

108. Koch AE, Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. Arthritis Res Ther. 2007;9 Suppl 2:S3.

109. Anderegg U, Saalbach A, Haustein UF. Chemokine release from activated human dermal microvascular endothelial cells--implications for the pathophysiology of scleroderma? Arch Dermatol Res. 2000 Jul;292(7):341–7.

110. Peterlana D, Puccetti A, Caramaschi P, Biasi D, Beri R, Simeoni S, et al. Endothelin-1 serum levels correlate with MCP-1 but not with homocysteine plasma concentration in patients with systemic sclerosis. Scand J Rheumatol. 2006 Apr;35(2):133–7.

111. Guiducci S, Distler JHW, Jüngel A, Huscher D, Huber LC, Michel BA, et al. The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2008 Sep;58(9):2845–53.

112. Dunne JV, Bankole J, Keen KJ. Systematic Review of the Role of Microparticles in Systemic Sclerosis. Curr Rheumatol Rev. 2013;9(4):279–300.

113. Jung C, Drummer K, Oelzner P, Figulla HR, Boettcher J, Franz M, et al. The association between endothelial microparticles and inflammation in patients with systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon as detected by functional imaging. Clin Hemorheol Microcirc. 2015;61(3):549–57.

114. Maugeri N, Capobianco A, Rovere-Querini P, Ramirez GA, Tombetti E, Valle PD, et al. Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis. Sci Transl Med. 2018 Jul 25;10(451).

115. Manfredi AA, Ramirez GA, Godino C, Capobianco A, Monno A, Franchini S, et al. Platelet Phagocytosis via P-selectin Glycoprotein Ligand 1 and Accumulation of Microparticles in Systemic Sclerosis. Arthritis Rheumatol. 2022 Feb;74(2):318–28.

116. Avouac J, Vallucci M, Smith V, Senet P, Ruiz B, Sulli A, et al. Correlations between angiogenic factors and capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. Arthritis Res Ther. 2013 Apr 19;15(2):R55.

117. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, Cipriani P, Conforti ML, Guiducci S, et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. Arthritis Res. 2002;4(6):R11.

118. Choi JJ, Min DJ, Cho ML, Min SY, Kim SJ, Lee SS, et al. Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis. J Rheumatol. 2003 Jul;30(7):1529–33.

119. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Impaired angiogenesis in systemic sclerosis: the emerging role of the antiangiogenic VEGF(165)b splice variant. Trends Cardiovasc Med. 2011 Oct;21(7):204–10.

120. 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. 2015 Nov 19;17:332.

121. Hebbar M, Peyrat JP, Hornez L, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B. Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2000 Apr;43(4):889–93.

122. Macko RF, Gelber AC, Young BA, Lowitt MH, White B, Wigley FM, et al. Increased circulating concentrations of the counteradhesive proteins SPARC and thrombospondin-1 in systemic sclerosis (scleroderma). Relationship to platelet and endothelial cell activation. J Rheumatol. 2002 Dec;29(12):2565–70.

123. 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 Jan 30;370(5):433–43.

124. Jiang Z, Chen C, Yang S, He H, Zhu X, Liang M. Contribution to the peripheral vasculopathy and endothelial cell dysfunction by CXCL4 in Systemic Sclerosis. J Dermatol Sci. 2021 Oct;104(1):63–73.

125. Andrigueti FV, Arismendi MI, Ebbing PCC, Kayser C. Decreased numbers of endothelial progenitor cells in patients in the early stages of systemic sclerosis. Microvasc Res. 2015 Mar;98:82–7.

126. Avouac J, Cagnard N, Distler JH, Schoindre Y, Ruiz B, Couraud PO, et al. Insights into the pathogenesis of systemic sclerosis based on the gene expression profile of progenitor-derived endothelial cells. Arthritis Rheum. 2011 Nov;63(11):3552–62.

127. Iwata Y, Yoshizaki A, Ogawa F, Komura K, Hara T, Muroi E, et al. Increased serum pentraxin 3 in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol. 2009 May;36(5):976–83.

128. Shirai Y, Okazaki Y, Inoue Y, Tamura Y, Yasuoka H, Takeuchi T, et al. Elevated levels of pentraxin 3 in systemic sclerosis: associations with vascular manifestations and defective vasculogenesis. Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ). 2015 Feb;67(2):498–507.

129. Luchetti MM, Sambo P, Majlingová P, Svegliati Baroni S, Peri G, Paroncini P, et al. Scleroderma fibroblasts constitutively express the long pentraxin PTX3. Clin Exp Rheumatol. 2004 Feb;22(3 Suppl 33):S66-72.

130. Negi VS, Tripathy NK, Misra R, Nityanand S. Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. J Rheumatol. 1998 Mar;25(3):462–6.

131. Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. J Clin Invest. 1996 Jan 1;97(1):111–9.

132. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. Arthritis Rheum. 2000 Nov;43(11):2550–62.

133. Avouac J, Riemekasten G, Meune C, Ruiz B, Kahan A, Allanore Y. Autoantibodies against Endothelin 1 Type A Receptor Are Strong Predictors of Digital Ulcers in Systemic Sclerosis. J Rheumatol. 2015 Oct;42(10):1801–7.

134. Günther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, et al. Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. Arthritis Res Ther. 2014 Mar 11;16(2):R65.

135. Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, et al. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. Am J Respir Crit Care Med. 2014 Oct 1;190(7):808–17.

136. Li L, Zuo X, Xiao Y, Liu D, Luo H, Zhu H. Neutrophil-derived exosome from systemic sclerosis inhibits the proliferation and migration of endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2020 May 28;526(2):334–40.

137. Cipriani P, Di Benedetto P, Ruscitti P, Capece D, Zazzeroni F, Liakouli V, et al. The Endothelial-mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis Is Induced by Endothelin-1 and Transforming Growth Factor-β and May Be Blocked by Macitentan, a Dual Endothelin-1 Receptor Antagonist. J Rheumatol. 2015 Oct;42(10):1808–16.

138. Derrett-Smith EC, Dooley A, Gilbane AJ, Trinder SL, Khan K, Baliga R, et al. Endothelial injury in a transforming growth factor β-dependent mouse model of scleroderma induces pulmonary arterial hypertension. Arthritis Rheum. 2013 Nov;65(11):2928–39.

139. Good RB, Gilbane AJ, Trinder SL, Denton CP, Coghlan G, Abraham DJ, et al. Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. Am J Pathol. 2015 Jul;185(7):1850–8.

140. Chepy A, Bourel L, Koether V, Launay D, Dubucquoi S, Sobanski V. Can Antinuclear Antibodies Have a Pathogenic Role in Systemic Sclerosis? Front Immunol. 2022;13:930970.

141. Glauzy S, Olson B, May CK, Parisi D, Massad C, Hansen JE, et al. Defective Early B Cell Tolerance Checkpoints in Patients With Systemic Sclerosis Allow the Production of Self Antigen-Specific Clones. Arthritis Rheumatol. 2022 Feb;74(2):307–17.

142. Fukasawa T, Yoshizaki A, Ebata S, Nakamura K, Saigusa R, Miura S, et al. Contribution of Soluble Forms of Programmed Death 1 and Programmed Death Ligand 2 to Disease Severity and Progression in Systemic Sclerosis. Arthritis Rheumatol. 2017 Sep;69(9):1879–90.

143. Arcand J, Robitaille G, Koenig M, Senécal JL, Raymond Y. The autoantigen DNA topoisomerase I interacts with chemokine receptor 7 and exerts cytokine-like effects on dermal fibroblasts. Arthritis Rheum. 2012 Mar;64(3):826–34.

144. Corallo C, Cheleschi S, Cutolo M, Soldano S, Fioravanti A, Volpi N, et al. Antibodies against specific extractable nuclear antigens (ENAs) as diagnostic and prognostic tools and inducers of a profibrotic phenotype in cultured human skin fibroblasts: are they functional? Arthritis Res Ther. 2019 Jun 24;21(1):152.

145. Luchetti MM, Moroncini G, Jose Escamez M, Svegliati Baroni S, Spadoni T, Grieco A, et al. Induction of Scleroderma Fibrosis in Skin-Humanized Mice by Administration of Anti-Platelet-Derived Growth Factor Receptor Agonistic Autoantibodies. Arthritis Rheumatol. 2016 Sep;68(9):2263–73.

146. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kühl AA, Günther J, Radic M, et al. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. Arthritis Res Ther. 2014 Jan 28;16(1):R29.

147. Ronda N, Gatti R, Giacosa R, Raschi E, Testoni C, Meroni PL, et al. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. Arthritis Rheum. 2002 Jun;46(6):1595–601.

148. Clark KEN, Xu S, Attah M, Ong VH, Buckley CD, Denton CP. Single-cell analysis reveals key differences between early-stage and late-stage systemic sclerosis skin across autoantibody subgroups. Ann Rheum Dis. 2023 Dec;82(12):1568–79.

149. Bosello S, Angelucci C, Lama G, Alivernini S, Proietti G, Tolusso B, et al. Characterization of inflammatory cell infiltrate of scleroderma skin: B cells and skin score progression. Arthritis Res Ther. 2018 Apr 18;20(1):75.

150. Harrison NK, Myers AR, Corrin B, Soosay G, Dewar A, Black CM, et al. Structural features of interstitial lung disease in systemic sclerosis. Am Rev Respir Dis. 1991 Sep;144(3 Pt 1):706–13.

151. Soto L, Ferrier A, Aravena O, Fonseca E, Berendsen J, Biere A, et al. Systemic Sclerosis Patients Present Alterations in the Expression of Molecules Involved in B-Cell Regulation. Front Immunol. 2015;6:496.

152. Mavropoulos A, Simopoulou T, Varna A, Liaskos C, Katsiari CG, Bogdanos DP, et al. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With Systemic Sclerosis. Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ). 2016 Feb;68(2):494–504.

153. Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, et al. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. Blood. 2004 Mar 15;103(6):2257–65.

154. Odaka M, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Ishiura N, Kumada S, Matsushita T, et al. Autoantibody-mediated regulation of B cell responses by functional anti-CD22 autoantibodies in patients with systemic sclerosis. Clin Exp Immunol. 2010 Feb;159(2):176–84.

155. Horii M, Fushida N, Ikeda T, Oishi K, Hamaguchi Y, Ikawa Y, et al. Cytokine-producing B-cell balance associates with skin fibrosis in patients with systemic sclerosis. J Dermatol. 2022 Oct;49(10):1012–9.

156. Aravena O, Ferrier A, Menon M, Mauri C, Aguillón JC, Soto L, et al. TIM-1 defines a human regulatory B cell population that is altered in frequency and function in systemic sclerosis patients. Arthritis Res Ther. 2017 Jan 19;19(1):8.

157. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. Arthritis Rheum. 1984 Jun;27(6):645–53.

158. Manetti M, Pratesi S, Romano E, Bellando-Randone S, Rosa I, Guiducci S, et al. Angiogenic T cell expansion correlates with severity of peripheral vascular damage in systemic sclerosis. PLoS One. 2017;12(8):e0183102.

159. Lv T, Yang F, Zhang K, Lv M, Zhang Y, Zhu P. The risk of circulating angiogenic T cells and subsets in patients with systemic sclerosis. Int Immunopharmacol. 2020 Apr;81:106282.

160. Maehara T, Kaneko N, Perugino CA, Mattoo H, Kers J, Allard-Chamard H, et al. Cytotoxic CD4+ T lymphocytes may induce endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. J Clin Invest. 2020 May 1;130(5):2451–64.

161. De Palma R, D'Aiuto E, Vettori S, Cuoppolo P, Abbate G, Valentini G. Peripheral T cells from patients with early systemic sclerosis kill autologous fibroblasts in co-culture: is T-cell response aimed to play a protective role? Rheumatology (Oxford). 2010 Jul;49(7):1257–66.

162. Guo RH, Cheng H, Zhang XY, Yu Z, Wang GH, Hao SY, et al. Changes in peripheral T-lymphocyte subsets and serum cytokines in patients with systemic sclerosis. Front Pharmacol. 2022;13:986199.

163. McGaha TL, Le M, Kodera T, Stoica C, Zhu J, Paul WE, et al. Molecular mechanisms of interleukin-4-induced up-regulation of type I collagen gene expression in murine fibroblasts. Arthritis Rheum. 2003 Aug;48(8):2275–84.

164. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2000 Nov;43(11):2455–63.

165. Rodríguez-Reyna TS, Furuzawa-Carballeda J, Cabiedes J, Fajardo-Hermosillo LD, Martínez-Reyes C, Díaz-Zamudio M, et al. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. Rheumatol Int. 2012 Sep;32(9):2653–60.

166. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? J Dermatol Sci. 2008 Jun;50(3):240–2.

167. 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. 2014 Jan 7;16(1):R4.

168. Xing X, Yang J, Yang X, Wei Y, Zhu L, Gao D, et al. IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway. PLoS ONE. 2013;8(12):e85032.

169. Liu M, Yang J, Xing X, Cui X, Li M. Interleukin-17A promotes functional activation of systemic sclerosis patient-derived dermal vascular smooth muscle cells by extracellular-regulated protein kinases signalling pathway. Arthritis Res Ther. 2014 Dec 31;16(6):4223.

170. Kuzumi A, Yoshizaki A, Matsuda KM, Kotani H, Norimatsu Y, Fukayama M, et al. Interleukin-31 promotes fibrosis and T helper 2 polarization in systemic sclerosis. Nat Commun. 2021 Oct 12;12(1):5947.

171. 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. 2017 Nov;184:54–62.

172. Choreño-Parra JA, Cervantes-Rosete D, Jiménez-Álvarez LA, Ramírez-Martínez G, Márquez-García JE, Cruz-Lagunas A, et al. Dendritic cells drive profibrotic inflammation and aberrant T cell polarization in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2023 Apr 3;62(4):1687–98.

173. Ross RL, Corinaldesi C, Migneco G, Carr IM, Antanaviciute A, Wasson CW, et al. Targeting human plasmacytoid dendritic cells through BDCA2 prevents skin inflammation and fibrosis in a novel xenotransplant mouse model of scleroderma. Ann Rheum Dis. 2021 Jul;80(7):920–9.

174. Ah Kioon MD, Tripodo C, Fernandez D, Kirou KA, Spiera RF, Crow MK, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. Sci Transl Med. 2018 Jan 10;10(423):eaam8458.

175. Lande R, Lee EY, Palazzo R, Marinari B, Pietraforte I, Santos GS, et al. CXCL4 assembles DNA into liquid crystalline complexes to amplify TLR9-mediated interferon-α production in systemic sclerosis. Nat Commun. 2019 01;10(1):1731.

176. van Bon L, Cossu M, Loof A, Gohar F, Wittkowski H, Vonk M, et al. Proteomic analysis of plasma identifies the Toll-like receptor agonists S100A8/A9 as a novel possible marker for systemic sclerosis phenotype. Ann Rheum Dis. 2014 Aug;73(8):1585–9.

177. Du Y, Faz-Lopez B, Ah Kioon MD, Cenac C, Pierides M, Lakin KS, et al. Altered X-chromosome inactivation of the TLR7/8 locus and heterogeneity of pDCs in systemic sclerosis. J Exp Med. 2025 Mar 3;222(3):e20231809.

178. Pietraforte I, Butera A, Gaddini L, Mennella A, Palazzo R, Campanile D, et al. CXCL4-RNA Complexes Circulate in Systemic Sclerosis and Amplify Inflammatory/Pro-Fibrotic Responses by Myeloid Dendritic Cells. Int J Mol Sci. 2022 Dec 30;24(1):653.

179. Higgs BW, Liu Z, White B, Zhu W, White WI, Morehouse C, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. Ann Rheum Dis. 2011 Nov;70(11):2029–36.

180. Brkic Z, van Bon L, Cossu M, van Helden-Meeuwsen CG, Vonk MC, Knaapen H, et al. The interferon type I signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. Ann Rheum Dis. 2016 Aug;75(8):1567–73.

181. Duan H, Fleming J, Pritchard DK, Amon LM, Xue J, Arnett HA, et al. Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma. Arthritis Rheum. 2008 May;58(5):1465–74.

182. Rudnik M, Rolski F, Jordan S, Mertelj T, Stellato M, Distler O, et al. Regulation of Monocyte Adhesion and Type I Interferon Signaling by CD52 in Patients With Systemic Sclerosis. Arthritis Rheumatol. 2021 Sep;73(9):1720–30.

183. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis

and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. Arthritis Rheum. 2007 Mar;56(3):1010–20.

184. Eloranta ML, Franck-Larsson K, Lövgren T, Kalamajski S, Rönnblom A, Rubin K, et al. Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2010 Jul;69(7):1396–402.

185. Maillet F, Schmidt C, Bondet V, Bense A, Duffy D, Mouthon L, et al. Increased Mortality in Patients with Diffuse Systemic Sclerosis with High Circulating IFNα Levels. J Invest Dermatol. 2024 Nov 13;S0022-202X(24)02884-7.

186. Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, Gourh P, Agarwal SK, McNearney TA, et al. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. Arthritis Rheum. 2010 Feb;62(2):589–98.

187. Chrobak I, Lenna S, Stawski L, Trojanowska M. Interferon-γ promotes vascular remodeling in human microvascular endothelial cells by upregulating endothelin (ET)-1 and transforming growth factor (TGF) β2. J Cell Physiol. 2013 Aug;228(8):1774–83.

188. Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, et al. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. Am J Pathol. 2010 Apr;176(4):1983–98.

189. Skaug B, Assassi S. Type I interferon dysregulation in Systemic Sclerosis. Cytokine. 2020 Aug;132:154635.

190. Farina G, Lafyatis D, Lemaire R, Lafyatis R. A four-gene biomarker predicts skin disease in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2010 Feb;62(2):580–8.

191. Assassi S, Swindell WR, Wu M, Tan FD, Khanna D, Furst DE, et al. Dissecting the heterogeneity of skin gene expression patterns in systemic sclerosis. Arthritis Rheumatol. 2015 Nov;67(11):3016–26.

192. Christmann RB, Sampaio-Barros P, Stifano G, Borges CL, de Carvalho CR, Kairalla R, et al. Association of Interferon- and transforming growth factor β-regulated genes and macrophage activation with systemic sclerosis-related progressive lung fibrosis. Arthritis Rheumatol. 2014 Mar;66(3):714–25.

193. Lescoat A, Lecureur V, Roussel M, Sunnaram BL, Ballerie A, Coiffier G, et al. CD16-positive circulating monocytes and fibrotic manifestations of systemic sclerosis. Clin Rheumatol. 2017 Jul;36(7):1649–54.

194. Ballerie A, Lescoat A, Augagneur Y, Lelong M, Morzadec C, Cazalets C, et al. Efferocytosis capacities of blood monocyte-derived macrophages in systemic sclerosis. Immunol Cell Biol. 2019 Mar;97(3):340–7.

195. Le Tallec E, Bellamri N, Lelong M, Morzadec C, Frenger Q, Ballerie A, et al. Efferocytosis dysfunction in CXCL4-induced M4 macrophages: phenotypic insights in systemic sclerosis in vitro and in vivo. Front Immunol. 2024;15:1468821.

196. Ishikawa O, Ishikawa H. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. J Rheumatol. 1992 Aug;19(8):1202–6.

197. Rossi GA, Bitterman PB, Rennard SI, Ferrans VJ, Crystal RG. Evidence for chronic inflammation as a component of the interstitial lung disease associated with progressive systemic sclerosis. Am Rev Respir Dis. 1985 Apr;131(4):612–7.

198. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, et al. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. Arthritis Res Ther. 2010;12(4):R128.

199. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol. 2003 Feb;73(2):209–12.

200. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 2004 Dec;25(12):677–86.

201. Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH, De Baetselier P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. Curr Opin Immunol. 2007 Aug;19(4):454–9.

202. Lescoat A, Ballerie A, Jouneau S, Fardel O, Vernhet L, Jego P, et al. M1/M2 polarisation state of M-CSF blood-derived macrophages in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2018 Sep 29;

203. Mohamed ME, Gamal RM, El-Mokhtar MA, Hassan AT, Abozaid HSM, Ghandour AM, et al. Peripheral cells from patients with systemic sclerosis disease co-expressing M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers: Relation to the degree of skin involvement. Hum Immunol. 2021 Sep;82(9):634–9.

204. Trombetta AC, Soldano S, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Paolino S, et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. Respir Res. 2018 Sep 24;19(1):186.

205. Bhandari R, Ball MS, Martyanov V, Popovich D, Schaafsma E, Han S, et al. Profibrotic Activation of Human Macrophages in Systemic Sclerosis. Arthritis Rheumatol. 2020 Jul;72(7):1160–9.

206. Hügle T, Hogan V, White KE, van Laar JM. Mast cells are a source of transforming growth factor β in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2011 Mar;63(3):795–9.

207. Yukawa S, Yamaoka K, Sawamukai N, Shimajiri S, Kubo S, Miyagawa I, et al. Dermal mast cell density in fingers reflects severity of skin sclerosis in systemic sclerosis. Mod Rheumatol. 2013 Nov;23(6):1151–7.

208. Akimoto S, Ishikawa O, Igarashi Y, Kurosawa M, Miyachi Y. Dermal mast cells in scleroderma: their skin density, tryptase/chymase phenotypes and degranulation. Br J Dermatol. 1998 Mar;138(3):399–406.

209. Hügle T, White K, van Laar JM. Cell-to-cell contact of activated mast cells with fibroblasts and lymphocytes in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2012 Sep;71(9):1582.

210. Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, Gillery P, Reich R, Maquart FX, et al. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. Clin Exp Allergy. 2002 Feb;32(2):237–46.

211. Hussein MR, Hassan HI, Hofny ERM, Elkholy M, Fatehy NA, Abd Elmoniem AEA, et al. Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. J Clin Pathol. 2005 Feb;58(2):178–84.

212. Cailes JB, O'Connor C, Pantelidis P, Southcott AM, Fitzgerald MX, Black CM, et al. Neutrophil activation in fibrosing alveolitis: a comparison of lone cryptogenic fibrosing alveolitis and systemic sclerosis. Eur Respir J. 1996 May;9(5):992–9.

213. Crestani B, Seta N, Palazzo E, Rolland C, Venembre P, Dehoux M, et al. Interleukin-8 and neutrophils in systemic sclerosis with lung involvement. Am J Respir Crit Care Med. 1994 Nov;150(5 Pt 1):1363–7.

214. Impellizzieri D, Egholm C, Valaperti A, Distler O, Boyman O. Patients with systemic sclerosis show phenotypic and functional defects in neutrophils. Allergy. 2022 Apr;77(4):1274–84.

215. Gong P, Ding Y, Li W, Yang J, Su X, Tian R, et al. Neutrophil-Driven M2-Like Macrophages Are Critical for Skin Fibrosis in a Systemic Sclerosis Model. J Invest Dermatol. 2024 Apr 3;S0022-202X(24)00274-4.

216. Barnes TC, Spiller DG, Anderson ME, Edwards SW, Moots RJ. Endothelial activation and apoptosis mediated by neutrophil-dependent interleukin 6 trans-signalling: a novel target for systemic sclerosis? Ann Rheum Dis. 2011 Feb;70(2):366–72.

217. Xu X, Wu WY, Tu WZ, Chu HY, Zhu XX, Liang MR, et al. Increased expression of S100A8 and S100A9 in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. A correlation with organ involvement and immunological abnormalities. Clin Rheumatol. 2013 Oct;32(10):1501–10.

218. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. Front Immunol. 2018;9:1298.

219. Kuley R, Stultz RD, Duvvuri B, Wang T, Fritzler MJ, Hesselstrand R, et al. N-Formyl Methionine Peptide-Mediated Neutrophil Activation in Systemic Sclerosis. Front Immunol. 2021;12:785275.

220. Maslen CL, Hall ND, Woolf AD, Maddison PJ. Enhanced oxidative metabolism of neutrophils from patients with systemic sclerosis. Br J Rheumatol. 1987 Apr;26(2):113–7.

221. Barnes TC, Anderson ME, Edwards SW, Moots RJ. Neutrophil-derived reactive oxygen species in SSc. Rheumatology (Oxford). 2012 Jul;51(7):1166–9.

222. 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 Jan 25;101122.

223. Cruz-Domínguez MP, Montes-Cortes DH, Olivares-Corichi IM, Vera-Lastra O, Medina G, Jara LJ. Oxidative stress in Mexicans with diffuse cutaneous systemic sclerosis. Rheumatol Int. 2013 Sep;33(9):2261–7.

224. Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Sato S. Increasing levels of serum antioxidant status, total antioxidant power, in systemic sclerosis. Clin Rheumatol. 2011 Jul;30(7):921–5.

225. Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Hasegawa M, Takehara K, et al. Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2006 Jul;45(7):815–8.

226. Ogawa F, Shimizu K, Hara T, Muroi E, Hasegawa M, Takehara K, et al. Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. Clin Exp Rheumatol. 2008 Aug;26(4):659–62.

227. Dziedzic R, Wójcik K, Olchawa M, Sarna T, Pięta J, Jakieła B, et al. Increased oxidative stress response in circulating blood of systemic sclerosis patients - relation to disease characteristics and inflammatory blood biomarkers. Semin Arthritis Rheum. 2023 Oct;62:152228.

228. Bourji K, Meyer A, Chatelus E, Pincemail J, Pigatto E, Defraigne JO, et al. High reactive oxygen species in fibrotic and nonfibrotic skin of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. Free Radic Biol Med. 2015 Oct;87:282–9.

229. Volpe A, Biasi D, Caramaschi P, Mantovani W, Bambara LM, Canestrini S, et al. Levels of F2-isoprostanes in systemic sclerosis: correlation with clinical features. Rheumatology (Oxford). 2006 Mar;45(3):314–20.

230. 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 May 1;182(9):5855–64.

231. Zhang R, Kumar GS, Hansen U, Zoccheddu M, Sacchetti C, Holmes ZJ, et al. Oxidative stress promotes fibrosis in systemic sclerosis through stabilization of a kinase-phosphatase complex. JCI Insight. 2022 Apr 22;7(8):e155761.

232. Kizilay Mancini O, Acevedo M, Fazez N, Cuillerier A, Fernandez Ruiz A, Huynh DN, et al. Oxidative stress-induced senescence mediates inflammatory and fibrotic phenotypes in fibroblasts from systemic sclerosis patients. Rheumatology (Oxford). 2022 Mar 2;61(3):1265–75.

233. 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 Nov;44(11):2653–64.

234. Perera LMB, Sekiguchi A, Uchiyama A, Uehara A, Fujiwara C, Yamazaki S, et al. The Regulation of Skin Fibrosis in Systemic Sclerosis by Extracellular ATP via P2Y2 Purinergic Receptor. J Invest Dermatol. 2019 Apr;139(4):890–9.

235. Kokot A, Sindrilaru A, Schiller M, Sunderkötter C, Kerkhoff C, Eckes B, et al. alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses bleomycin-induced collagen synthesis and reduces tissue fibrosis in a mouse model of scleroderma: melanocortin peptides as a novel treatment strategy for scleroderma? Arthritis Rheum. 2009 Feb;60(2):592–603.

236. Hagiwara SI, Ishii Y, Kitamura S. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Jul;162(1):225–31.

237. Kavian N, Mehlal S, Jeljeli M, Saidu NEB, Nicco C, Cerles O, et al. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway Controls Fibrosis and Autoimmunity in Scleroderma. Front Immunol. 2018;9:1896.

238. Wei J, Zhu H, Lord G, Bhattachayya M, Jones BM, Allaway G, et al. Nrf2 exerts cell-autonomous antifibrotic effects: compromised function in systemic sclerosis and therapeutic rescue with a novel heterocyclic chalcone derivative. Transl Res. 2017 May;183:71-86.e1.

239. Xiao Y, Huang Z, Wang Y, Wang Y, Yu L, Yang J, et al. Xanthohumol attenuates collagen synthesis in scleroderma skin fibroblasts by ROS/Nrf2/TGFβ1/Smad3 pathway. Eur J Pharmacol. 2024 Jan 15;963:176227.

240. Posadino AM, Erre GL, Cossu A, Emanueli C, Eid AH, Zinellu A, et al. NADPH-derived ROS generation drives fibrosis and endothelial-to-mesenchymal transition in systemic sclerosis: Potential cross talk with circulating miRNAs. Biomol Concepts. 2022 Feb 21;13(1):11–24.

241. Xu H, Zaidi M, Struve J, Jones DW, Krolikowski JG, Nandedkar S, et al. Abnormal fibrillin-1 expression and chronic oxidative stress mediate endothelial mesenchymal transition in a murine model of systemic sclerosis. Am J Physiol Cell Physiol. 2011 Mar;300(3):C550-556.

242. Ross RL, Mavria G, Del Galdo F, Elies J. Downregulation of Vascular Hemeoxygenase-1 Leads to Vasculopathy in Systemic Sclerosis. Front Physiol. 2022;13:900631.

243. Chen Y, Yuan T, Zhang H, Yan Y, Wang D, Fang L, et al. Activation of Nrf2 Attenuates Pulmonary Vascular Remodeling via Inhibiting Endothelial-to-Mesenchymal Transition: an Insight from a Plant Polyphenol. Int J Biol Sci. 2017;13(8):1067–81.

244. Tsou PS, Amin MA, Campbell PL, Zakhem G, Balogh B, Edhayan G, et al. Activation of the Thromboxane A2 Receptor by 8-Isoprostane Inhibits the Pro-Angiogenic Effect of Vascular Endothelial Growth Factor in Scleroderma. J Invest Dermatol. 2015 Dec;135(12):3153–62.

245. Iwata Y, Ogawa F, Komura K, Muroi E, Hara T, Shimizu K, et al. Autoantibody against peroxiredoxin I, an antioxidant enzyme, in patients with systemic sclerosis: possible association with oxidative stress. Rheumatology (Oxford). 2007 May;46(5):790–5.

246. Margutti P, Matarrese P, Conti F, Colasanti T, Delunardo F, Capozzi A, et al. Autoantibodies to the C-terminal subunit of RLIP76 induce oxidative stress and endothelial cell apoptosis in immune-mediated vascular diseases and atherosclerosis. Blood. 2008 May 1;111(9):4559–70.

247. Chêne C, Rongvaux-Gaïda D, Thomas M, Rieger F, Nicco C, Batteux F. Optimal combination of arsenic trioxide and copper ions to prevent autoimmunity in a murine HOCl-induced model of systemic sclerosis. Front Immunol. 2023;14:1149869.

248. Lee SC, Huang CH, Oyang YJ, Huang HC, Juan HF. Macrophages as determinants and regulators of systemic sclerosis-related interstitial lung disease. J Transl Med. 2024 Jun 27;22(1):600.

249. Maugeri N, Rovere-Querini P, Baldini M, Baldissera E, Sabbadini MG, Bianchi ME, et al. Oxidative stress elicits platelet/leukocyte inflammatory interactions via HMGB1: a candidate for microvessel injury in sytemic sclerosis. Antioxid Redox Signal. 2014 Mar 1;20(7):1060–74.

250. Sambo P, Jannino L, Candela M, Salvi A, Donini M, Dusi S, et al. Monocytes of patients wiht systemic sclerosis (scleroderma spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. J Invest Dermatol. 1999 Jan;112(1):78–84.

251. Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The Neutrophil. Immunity. 2021 Jul 13;54(7):1377–91.

252. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.

253. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. J Leukoc Biol. 1996 Feb;59(2):229–40.

254. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. Biochemistry (Mosc). 2020 Oct;85(10):1178–90.

255. Pires RH, Felix SB, Delcea M. The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy. Nanoscale. 2016 Aug 7;8(29):14193–202.

256. Chapman EA, Lyon M, Simpson D, Mason D, Beynon RJ, Moots RJ, et al. Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. Front Immunol. 2019;10:423.

257. Petretto A, Bruschi M, Pratesi F, Croia C, Candiano G, Ghiggeri G, et al. Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. PLoS One. 2019;14(7):e0218946.

258. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans. PLoS Pathog. 2009 Oct;5(10):e1000639.

259. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2020 Oct 6;36:191–218.

260. Gupta AK, Giaglis S, Hasler P, Hahn S. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. PLoS One. 2014;9(5):e97088.

261. de Bont CM, Koopman WJH, Boelens WC, Pruijn GJM. Stimulus-dependent chromatin dynamics, citrullination, calcium signalling and ROS production during NET formation. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2018 Nov;1865(11 Pt A):1621–9.

262. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. J Cell Biol. 2009 Jan 26;184(2):205–13.

263. Wong SL, Wagner DD. Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging. FASEB J. 2018 Jun 20;32(12):fj201800691R.

264. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. J Exp Med. 2010 Aug 30;207(9):1853–62.

265. Kearney PL, Bhatia M, Jones NG, Yuan L, Glascock MC, Catchings KL, et al. Kinetic characterization of protein arginine deiminase 4: a transcriptional corepressor implicated in the onset and progression of rheumatoid arthritis. Biochemistry. 2005 Aug 9;44(31):10570–82.

266. van der Linden M, Westerlaken GHA, van der Vlist M, van Montfrans J, Meyaard L. Differential Signalling and Kinetics of Neutrophil Extracellular Trap Release Revealed by Quantitative Live Imaging. Sci Rep. 2017 Jul 26;7(1):6529.

267. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. Nat Chem Biol. 2011 Feb;7(2):75–7.

268. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 2010 Nov 1;191(3):677–91.

269. Hamam HJ, Khan MA, Palaniyar N. Histone Acetylation Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation. Biomolecules. 2019 Jan 18;9(1):32.

270. Smith BC, Denu JM. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. Biochim Biophys Acta. 2009 Jan;1789(1):45–57.

271. Martinod K, Demers M, Fuchs TA, Wong SL, Brill A, Gallant M, et al. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 May 21;110(21):8674–9.

272. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. Cell Rep. 2014 Aug 7;8(3):883–96.

273. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 2007 Jan 15;176(2):231–41.

274. Gößwein S, Lindemann A, Mahajan A, Maueröder C, Martini E, Patankar J, et al. Citrullination Licenses Calpain to Decondense Nuclei in Neutrophil Extracellular Trap Formation. Front Immunol. 2019;10:2481.

275. Neubert E, Meyer D, Rocca F, Günay G, Kwaczala-Tessmann A, Grandke J, et al. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. Nat Commun. 2018 Sep 14;9(1):3767.

276. Thiam HR, Wong SL, Qiu R, Kittisopikul M, Vahabikashi A, Goldman AE, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Mar 31;117(13):7326–37.

277. Li Y, Li M, Weigel B, Mall M, Werth VP, Liu ML. Nuclear envelope rupture and NET formation is driven by PKCα-mediated lamin B disassembly. EMBO Rep. 2020 Aug 5;21(8):e48779.

278. Amulic B, Knackstedt SL, Abu Abed U, Deigendesch N, Harbort CJ, Caffrey BE, et al. Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps. Dev Cell. 2017 Nov 20;43(4):449-462.e5.

279. Chen KW, Monteleone M, Boucher D, Sollberger G, Ramnath D, Condon ND, et al. Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. Sci Immunol. 2018 Aug 24;3(26):eaar6676.

280. Sollberger G, Choidas A, Burn GL, Habenberger P, Di Lucrezia R, Kordes S, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. Sci Immunol. 2018 Aug 24;3(26):eaar6689.

281. Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Mar 3;112(9):2817–22.

282. Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. Nat Med. 2016 Feb;22(2):146–53.

283. Caielli S, Athale S, Domic B, Murat E, Chandra M, Banchereau R, et al. Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. J Exp Med. 2016 May 2;213(5):697–713.

284. Wang H, Li T, Chen S, Gu Y, Ye S. Neutrophil Extracellular Trap Mitochondrial DNA and Its Autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus and a Proof-of-Concept Trial of Metformin. Arthritis Rheumatol. 2015 Dec;67(12):3190–200.

285. Zhong Z, Liang S, Sanchez-Lopez E, He F, Shalapour S, Lin XJ, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. Nature. 2018 Aug;560(7717):198–203.

286. Peng Y, Yang Y, Li Y, Shi T, Xu N, Liu R, et al. Mitochondrial (mt)DNA-cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) signaling promotes pyroptosis of macrophages via interferon regulatory factor (IRF)7/IRF3 activation to aggravate lung injury during severe acute pancreatitis. Cell Mol Biol Lett. 2024 Apr 27;29(1):61.

287. Lepelley A, Wai T, Crow YJ. Mitochondrial Nucleic Acid as a Driver of Pathogenic Type I Interferon Induction in Mendelian Disease. Front Immunol. 2021;12:729763.

288. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. Biomolecules. 2019 Aug 14;9(8).

289. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat Med. 2007 Apr;13(4):463–9.

290. Neeli I, Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. Front Immunol. 2013;4:38.

291. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. Elife. 2017 Jun 2;6:e24437.

292. Tatsiy O, McDonald PP. Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. Front Immunol. 2018;9:2036.

293. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. J Leukoc Biol. 2012 Oct;92(4):841–9.

294. Khan MA, Palaniyar N. Transcriptional firing helps to drive NETosis. Sci Rep. 2017 Feb 8;7:41749.

295. Douda DN, Yip L, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. Blood. 2014 Jan 23;123(4):597–600.

296. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. J Cell Biochem. 2013 Mar;114(3):532–40.

297. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. Cell Res. 2011 Feb;21(2):290–304.

298. Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. J Immunol. 2010 Dec 15;185(12):7413–25.

299. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. Nat Med. 2012 Sep;18(9):1386–93.

300. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? Blood. 2013 Oct 17;122(16):2784–94.

301. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ. 2009 Nov;16(11):1438–44.

302. Yousefi S, Simon D, Stojkov D, Karsonova A, Karaulov A, Simon HU. In vivo evidence for extracellular DNA trap formation. Cell Death Dis. 2020 Apr 30;11(4):300.

303. Meier A, Sakoulas G, Nizet V, Ulloa ER. Neutrophil Extracellular Traps: An Emerging Therapeutic Target to Improve Infectious Disease Outcomes. J Infect Dis. 2024 Aug 16;230(2):514–21.

304. Jiao Y, Li W, Wang W, Tong X, Xia R, Fan J, et al. Platelet-derived exosomes promote neutrophil extracellular trap formation during septic shock. Crit Care. 2020 Jun 29;24(1):380.

305. Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. Blood. 2015 Jul 9;126(2):242–6.

306. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VI, Pozner RG, Negrotto S, et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. J Leukoc Biol. 2016 Jan;99(1):153–62.

307. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. J Thromb Haemost. 2012 Jan;10(1):136–44.

308. Su M, Chen C, Li S, Li M, Zeng Z, Zhang Y, et al. Gasdermin D-dependent platelet pyroptosis exacerbates NET formation and inflammation in severe sepsis. Nat Cardiovasc Res. 2022;1(8):732–47.

309. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. J Thromb Haemost. 2014 Dec;12(12):2074–88.

310. Zhan Y, Ling Y, Deng Q, Qiu Y, Shen J, Lai H, et al. HMGB1-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Exacerbates Intestinal Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lung Injury. J Immunol. 2022 Feb 15;208(4):968–78.

311. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. PLoS One. 2012;7(10):e48111.

312. Rossaint J, Herter JM, Van Aken H, Napirei M, Döring Y, Weber C, et al. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. Blood. 2014 Apr 17;123(16):2573–84.

313. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. Cell Host Microbe. 2012 Jul 19;12(1):109–16.

314. Siler U, Romao S, Tejera E, Pastukhov O, Kuzmenko E, Valencia RG, et al. Severe glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency leads to susceptibility to infection and absent NETosis. J Allergy Clin Immunol. 2017 Jan;139(1):212-219.e3.

315. Amara N, Cooper MP, Voronkova MA, Webb BA, Lynch EM, Kollman JM, et al. Selective activation of PFKL suppresses the phagocytic oxidative burst. Cell. 2021 Aug 19;184(17):4480-4494.e15.

316. Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. J Immunol. 2013 Sep 1;191(5):2647–56.

317. Haider P, Kral-Pointner JB, Mayer J, Richter M, Kaun C, Brostjan C, et al. Neutrophil Extracellular Trap Degradation by Differently Polarized Macrophage Subsets. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020 Sep;40(9):2265–78.

318. Santa P, Garreau A, Serpas L, Ferriere A, Blanco P, Soni C, et al. The Role of Nucleases and Nucleic Acid Editing Enzymes in the Regulation of Self-Nucleic Acid Sensing. Front Immunol. 2021;12:629922.

319. Napirei M, Ludwig S, Mezrhab J, Klöckl T, Mannherz HG. Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase1l3). FEBS J. 2009 Feb;276(4):1059–73.

320. Kwak SB, Kim SJ, Kang YJ, Lee WW, Huh J, Park JW. Development of a rectally administrable Dnase1 to treat septic shock by targeting NETs. Life Sci. 2024 Apr 1;342:122526.

321. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. Proc Natl Acad Sci USA. 2010 May 25;107(21):9813–8.

322. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. Science. 2017 Dec 1;358(6367):1202–6.

323. Sisirak V, Sally B, D'Agati V, Martinez-Ortiz W, Özçakar ZB, David J, et al. Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. Cell. 2016 Jun 30;166(1):88–101.

324. Al-Mayouf SM, Sunker A, Abdwani R, Abrawi SA, Almurshedi F, Alhashmi N, et al. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. Nat Genet. 2011 Oct 23;43(12):1186–8.

325. Hartl J, Serpas L, Wang Y, Rashidfarrokhi A, Perez OA, Sally B, et al. Autoantibody-mediated impairment of DNASE1L3 activity in sporadic systemic lupus erythematosus. J Exp Med. 2021 May 3;218(5):e20201138.

326. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nat Rev Immunol. 2018 Feb;18(2):134–47.

327. Hoi A, Igel T, Mok CC, Arnaud L. Systemic lupus erythematosus. Lancet. 2024 May 25;403(10441):2326–38.

328. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. Arthritis Rheum. 2002 Apr;46(4):1019–27.

329. Cairns AP, Crockard AD, McConnell JR, Courtney PA, Bell AL. Reduced expression of CD44 on monocytes and neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with apoptotic neutrophils and disease activity. Ann Rheum Dis. 2001 Oct;60(10):950–5.

330. Alves CMOS, Marzocchi-Machado CM, Louzada-Junior P, Azzolini AECS, Polizello ACM, de Carvalho IF, et al. Superoxide anion production by neutrophils is associated with prevalent clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol. 2008 Jun;27(6):701–8.

331. Carlucci PM, Purmalek MM, Dey AK, Temesgen-Oyelakin Y, Sakhardande S, Joshi AA, et al. Neutrophil subsets and their gene signature associate with vascular inflammation and coronary atherosclerosis in lupus. JCI Insight. 2018 Apr 19;3(8):e99276, 99276.

332. Midgley A, Beresford MW. Increased expression of low density granulocytes in juvenile-onset systemic lupus erythematosus patients correlates with disease activity. Lupus. 2016 Apr;25(4):407–11.

333. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. Sci Transl Med. 2011 Mar 9;3(73):73ra20.

334. Gestermann N, Di Domizio J, Lande R, Demaria O, Frasca L, Feldmeyer L, et al. Netting Neutrophils Activate Autoreactive B Cells in Lupus. J Immunol. 2018 May 15;200(10):3364–71.

335. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgin JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2011 Jul 1;187(1):538–52.

336. Frangou E, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, Kambas K, Arelaki S, Angelidou I, et al. REDD1/autophagy pathway promotes thromboinflammation and fibrosis in human systemic lupus erythematosus (SLE) through NETs decorated with tissue factor (TF) and interleukin-17A (IL-17A). Ann Rheum Dis. 2019 Feb;78(2):238–48.

337. Tektonidou M, Verrou KM, Gakiopoulou H, Manoloukos M, Lembessis P, Hatzis P, et al. Kidney whole-transcriptome profiling in primary antiphospholipid syndrome reveals complement, interferons and NETs-related gene expression. Rheumatology (Oxford). 2024 Aug 6;keae397.

338. Lin H, Liu J, Li N, Zhang B, Nguyen VD, Yao P, et al. NETosis promotes chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus and COVID-19. Clin Immunol. 2023 Sep;254:109687.

339. Delabio Auer E, Bumiller-Bini Hoch V, Borges da Silva E, Ricci Zonta Y, Alarcão Dias-Melicio L, Larocca Skare T, et al. Association of neutrophil extracellular trap levels with Raynaud's phenomenon, glomerulonephritis and disease index score in SLE patients from Brazil. Immunobiology. 2024 May;229(3):152803.

340. Whittall-Garcia LP, Naderinabi F, Gladman DD, Urowitz M, Touma Z, Konvalinka A, et al. Circulating neutrophil extracellular trap remnants as a biomarker to predict outcomes in lupus nephritis. Lupus Sci Med. 2024 Jan 4;11(1):e001038.

341. Reshetnyak T, Nurbaeva K, Ptashnik I, Kudriaeva A, Belogurov A, Lila A, et al. Markers of NETosis in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Antiphospholipid Syndrome. Int J Mol Sci. 2023 May 24;24(11):9210.

342. Leffler J, Stojanovich L, Shoenfeld Y, Bogdanovic G, Hesselstrand R, Blom AM. Degradation of neutrophil extracellular traps is decreased in patients with antiphospholipid syndrome. Clin Exp Rheumatol. 2014;32(1):66–70.

343. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Núñez-Álvarez C, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ). 2015 Nov;67(11):2990–3003.

344. Zha C, Zhang W, Gao F, Xu J, Jia R, Cai J, et al. Anti-β2GPI/β2GPI induces neutrophil extracellular traps formation to promote thrombogenesis via the TLR4/MyD88/MAPKs axis activation. Neuropharmacology. 2018 Aug;138:140–50.

345. Marder W, Knight JS, Kaplan MJ, Somers EC, Zhang X, O'Dell AA, et al. Placental histology and neutrophil extracellular traps in lupus and pre-eclampsia pregnancies. Lupus Sci Med. 2016;3(1):e000134.

346. Kmeťová K, Lonina E, Yalavarthi S, Levine JS, Hoy CK, Sarosh C, et al. Interaction of the antiphospholipid syndrome autoantigen beta-2 glycoprotein I with DNA and neutrophil extracellular traps. Clin Immunol. 2023 Oct;255:109714.

347. Kitching AR, Anders HJ, Basu N, Brouwer E, Gordon J, Jayne DR, et al. ANCA-associated vasculitis. Nat Rev Dis Primers. 2020 Aug 27;6(1):71.

348. Land J, Rutgers A, Kallenberg CGM. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody pathogenicity revisited: pathogenic versus non-pathogenic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody. Nephrol Dial Transplant. 2014 Apr;29(4):739–45.

349. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nat Med. 2009 Jun;15(6):623–5.

350. Kusunoki Y, Nakazawa D, Shida H, Hattanda F, Miyoshi A, Masuda S, et al. Peptidylarginine Deiminase Inhibitor Suppresses Neutrophil Extracellular Trap Formation and MPO-ANCA Production. Front Immunol. 2016;7:227.

351. Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, et al. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. J Am Soc Nephrol. 2014 May;25(5):990–7.

352. Sha LL, Wang H, Wang C, Peng HY, Chen M, Zhao MH. Autophagy is induced by anti-neutrophil cytoplasmic Abs and promotes neutrophil extracellular traps formation. Innate Immun. 2016 Nov;22(8):658–65.

353. Morita S, Nakamaru Y, Fukuda A, Fujiwara K, Suzuki M, Hoshino K, et al. Neutrophil Extracellular Trap Formation and Deoxyribonuclease I Activity in Patients with Otitis Media with Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. Int Arch Allergy Immunol. 2024;185(8):810–9.

354. Söderberg D, Kurz T, Motamedi A, Hellmark T, Eriksson P, Segelmark M. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. Rheumatology (Oxford). 2015 Nov;54(11):2085–94.

355. Shiratori-Aso S, Nakazawa D, Kudo T, Kanda M, Ueda Y, Watanabe-Kusunoki K, et al. CD47 blockade ameliorates autoimmune vasculitis via efferocytosis of neutrophil extracellular traps. JCI Insight. 2023 Aug 8;8(15):e167486.

356. Lipka S, Ostendorf L, Schneider U, Hiepe F, Apel F, Alexander T. Increased levels of immature and activated low density granulocytes and altered degradation of neutrophil extracellular traps in granulomatosis with polyangiitis. PLoS One. 2023;18(3):e0282919.

357. Michailidou D, Kuley R, Wang T, Hermanson P, Grayson PC, Cuthbertson D, et al. Neutrophil extracellular trap formation in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated and large-vessel vasculitis. Clin Immunol. 2023 Apr;249:109274.

358. Kimura H, Mii A, Shoji J, Arakawa Y, Shimizu A. Immunohistochemical detection of citrullinated histone H3-positive neutrophils is useful for identifying active glomerular and interstitial lesions in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Histopathology. 2021 Mar;78(4):520–31.

359. Takeuchi H, Kawasaki T, Shigematsu K, Kawamura K, Oka N. Neutrophil extracellular traps in neuropathy with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated microscopic polyangiitis. Clin Rheumatol. 2017 Apr;36(4):913–7.

360. Menezes PI da SO, Veras FP, Cunha F de Q, Silva LM da, Louzada-Júnior P, Oliveira RDR. Measurement of Neutrophil Extracellular Traps as a Biomarker for the Differential Diagnosis Between Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Positive Individuals With Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis and Nonautoimmune Diseases. J Clin Rheumatol. 2024 Jan 25;

361. Aendekerk JP, Ysermans R, Busch MH, Theunissen ROMFIH, Bijnens N, Potjewijd J, et al. Assessment of longitudinal serum neutrophil extracellular trap-inducing activity in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and glomerulonephritis in a prospective cohort using a novel bio-impedance technique. Kidney Int. 2023 Jul;104(1):151–62.

362. Yoshida M, Sasaki M, Sugisaki K, Yamaguchi Y, Yamada M. Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis. Clin Kidney J. 2013 Jun;6(3):308–12.

363. Yoshida M, Yamada M, Sudo Y, Kojima T, Tomiyasu T, Yoshikawa N, et al. Myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody affinity is associated with the formation of neutrophil extracellular traps in the kidney and vasculitis activity in myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated microscopic polyangiitis. Nephrology (Carlton). 2016 Jul;21(7):624–9.

364. Lundberg IE, Fujimoto M, Vencovsky J, Aggarwal R, Holmqvist M, Christopher-Stine L, et al. Idiopathic inflammatory myopathies. Nat Rev Dis Primers. 2021 Dec 2;7(1):86.

365. Torres-Ruiz J, Carrillo-Vázquez DA, Leal-Alanis A, Zentella-Dehesa A, Tapia-Rodríguez M, Maravillas-Montero JL, et al. Low-Density Granulocytes and Neutrophil Extracellular Traps as Biomarkers of Disease Activity in Adult Inflammatory Myopathies. J Clin Rheumatol. 2022 Mar 1;28(2):e480–7.

366. Seto N, Torres-Ruiz JJ, Carmona-Rivera C, Pinal-Fernandez I, Pak K, Purmalek MM, et al. Neutrophil dysregulation is pathogenic in idiopathic inflammatory myopathies. JCI Insight. 2020 Feb 13;5(3):e134189, 134189.

367. Duvvuri B, Pachman LM, Morgan G, Khojah AM, Klein-Gitelman M, Curran ML, et al. Neutrophil Extracellular Traps in Tissue and Periphery in Juvenile Dermatomyositis. Arthritis Rheumatol. 2020 Feb;72(2):348–58.

368. Zhang S, Shen H, Shu X, Peng Q, Wang G. Abnormally increased low-density granulocytes in peripheral blood mononuclear cells are associated with interstitial lung disease in dermatomyositis. Mod Rheumatol. 2017 Jan;27(1):122–9.

369. Peng Y, Zhang S, Zhao Y, Liu Y, Yan B. Neutrophil extracellular traps may contribute to interstitial lung disease associated with anti-MDA5 autoantibody positive dermatomyositis. Clin Rheumatol. 2018 Jan;37(1):107–15.

370. Zhang S, Shu X, Tian X, Chen F, Lu X, Wang G. Enhanced formation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps in dermatomyositis and polymyositis: a potential contributor to interstitial lung disease complications. Clin Exp Immunol. 2014 Jul;177(1):134–41.

371. Zhang S, Jia X, Zhang Q, Zhang L, Yang J, Hu C, et al. Neutrophil extracellular traps activate lung fibroblast to induce polymyositis-related interstitial lung diseases via TLR9-miR-7-Smad2 pathway. J Cell Mol Med. 2020 Jan;24(2):1658–69.

372. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2016 Oct 22;388(10055):2023–38.

373. van Delft MAM, Huizinga TWJ. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. J Autoimmun. 2020 Jun;110:102392.

374. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. Arthritis Res Ther. 2014 Jun 13;16(3):R122.

375. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. Sci Transl Med. 2013 Mar 27;5(178):178ra40.

376. Schneider AH, Taira TM, Públio GA, da Silva Prado D, Donate Yabuta PB, Dos Santos JC, et al. Neutrophil extracellular traps mediate bone erosion in rheumatoid arthritis by enhancing RANKL-induced osteoclastogenesis. Br J Pharmacol. 2024 Feb;181(3):429–46.

377. Wang W, Peng W, Ning X. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis. 2018 Feb;21(2):415–21.

378. Pratesi F, Dioni I, Tommasi C, Alcaro MC, Paolini I, Barbetti F, et al. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. Ann Rheum Dis. 2014 Jul;73(7):1414–22.

379. Okamoto Y, Devoe S, Seto N, Minarchick V, Wilson T, Rothfuss HM, et al. Association of Sputum Neutrophil Extracellular Trap Subsets With IgA Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Subjects at Risk for Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2022 Jan;74(1):38–48.

380. Carmona-Rivera C, Carlucci PM, Moore E, Lingampalli N, Uchtenhagen H, James E, et al. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. Sci Immunol. 2017 Apr;2(10):eaag3358.

381. Carmona-Rivera C, Carlucci PM, Goel RR, James E, Brooks SR, Rims C, et al. Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis. JCI Insight. 2020 Jul 9;5(13):e139388, 139388.

382. Wright HL, Lyon M, Chapman EA, Moots RJ, Edwards SW. Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid Neutrophils Drive Inflammation Through Production of Chemokines, Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Traps. Front Immunol. 2020;11:584116.

383. O'Neil LJ, Oliveira CB, Wang X, Navarrete M, Barrera-Vargas A, Merayo-Chalico J, et al. Neutrophil extracellular trap-associated carbamylation and histones trigger osteoclast formation in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2023 May;82(5):630–8.

384. Ye H, Yang Q, Guo H, Wang X, Cheng L, Han B, et al. Internalisation of neutrophils extracellular traps by macrophages aggravate rheumatoid arthritis via Rab5a. RMD Open. 2024 Mar 14;10(1):e003847.

385. Frade-Sosa B, Ponce A, Ruiz-Ortiz E, De Moner N, Gómara MJ, Azuaga AB, et al. Neutrophilic Activity Biomarkers (Plasma Neutrophil Extracellular Traps and Calprotectin) in Established Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Biological or JAK Inhibitors: A Clinical and Ultrasonographic Study. Rheumatol Ther. 2024 Jun;11(3):501–21.

386. Luque-Tévar M, Perez-Sanchez C, Patiño-Trives AM, Barbarroja N, Arias de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC, et al. Integrative Clinical, Molecular, and Computational Analysis Identify Novel Biomarkers and Differential Profiles of Anti-TNF Response in Rheumatoid Arthritis. Front Immunol. 2021;12:631662.

387. van der Linden M, Kumari S, Montizaan D, van Dalen S, Kip A, Foster M, et al. Anti-citrullinated histone monoclonal antibody CIT-013, a dual action therapeutic for neutrophil extracellular trap-associated autoimmune diseases. MAbs. 2023;15(1):2281763.

388. Gajendran C, Fukui S, Sadhu NM, Zainuddin M, Rajagopal S, Gosu R, et al. Alleviation of arthritis through prevention of neutrophil extracellular traps by an orally available inhibitor of protein arginine deiminase 4. Sci Rep. 2023 Feb 23;13(1):3189.

389. Middelink L, Chirivi RGS, van Es H, Meldrum E, van Zandvoort P, Bruurmijn T, et al. Early Clinical Development of CIT-013, a First in Class NETosis Inhibitor, in a Randomized Phase I Dose Escalation Study in Healthy Volunteers Demonstrating Potent Inhibition of LPS Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation [abstract]. Arthritis Rheumatol [Internet]. 2023;75 (suppl9). Available from: https://acrabstracts.org/abstract/early-clinical-development-of-cit-013-a-first-in-class-netosis-inhibitor-in-a-randomized-phase-i-dose-escalation-study-in-healthy-volunteers-demonstrating-potent-inhibition-of-lps-induced-neutrophil/

390. Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. J Vis Exp. 2010 Feb 24;(36).

391. van Breda SV, Vokalova L, Neugebauer C, Rossi SW, Hahn S, Hasler P. Computational Methodologies for the in vitro and in situ Quantification of Neutrophil Extracellular Traps. Front Immunol. 2019;10:1562.

392. de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. Detection, Visualization, and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and NET Markers. Methods Mol Biol. 2020;2087:425–42.

393. Krémer V, Godon O, Bruhns P, Jönsson F, de Chaisemartin L. Isolation methods determine human neutrophil responses after stimulation. Front Immunol. 2023;14:1301183.

394. Kortam N, Liang W, Shiple C, Huang S, Gedert R, Clair JS, et al. Elevated neutrophil extracellular traps in systemic sclerosis-associated vasculopathy and suppression by a synthetic prostacyclin analog. Arthritis Res Ther. 2024 Jul 25;26(1):139.

395. Ali R, Liang W, Shipple C, Gedert R, Huang S, Sarosh C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial-to-Mesenchymal Transition and Associate with Vascular Complications in Scleroderma [Abstract]. Arthritis & Rheumatology. 2023;75 (suppl 9).

396. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. Antioxid Redox Signal. 2014 Jul 1;21(1):66–85.

397. Khawaja AA, Chong DLW, Sahota J, Mikolasch TA, Pericleous C, Ripoll VM, et al. Identification of a Novel HIF-1α-αMβ2 Integrin-NET Axis in Fibrotic Interstitial Lung Disease. Front Immunol. 2020;11:2190.

398. Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, Tanita T, Chida M, Song C, et al. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. J Appl Physiol. 2001 Apr;90(4):1299–306.

399. Li J, Xia Y, Sun B, Zheng N, Li Y, Pang X, et al. Neutrophil extracellular traps induced by the hypoxic microenvironment in gastric cancer augment tumour growth. Cell Commun Signal. 2023 May 1;21(1):86.

400. Beyer C, Schett G, Gay S, Distler O, Distler JHW. Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. Arthritis Res Ther. 2009;11(2):220.

401. Silverstein JL, Steen VD, Medsger TA, Falanga V. Cutaneous hypoxia in patients with systemic sclerosis (scleroderma). Arch Dermatol. 1988 Sep;124(9):1379–82.

402. Distler O, Distler JHW, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J, et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. Circ Res. 2004 Jul 9;95(1):109–16.

403. Papaioannou I, Dritsoula A, Kang P, Baliga RS, Trinder SL, Cook E, et al. NKX2-5 regulates vessel remodeling in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. JCI Insight. 2024 Apr 23;9(10):e164191.

404. Takagi K, Kawamoto M, Higuchi T, Tochimoto A, Harigai M, Kawaguchi Y. Single nucleotide polymorphisms of the HIF1A gene are associated with susceptibility to pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis and contribute to SSc-PAH disease severity. Int J Rheum Dis. 2020 May;23(5):674–80.

405. He X, Shi Y, Zeng Z, Tang B, Xiao X, Yu J, et al. Intimate intertwining of the pathogenesis of hypoxia and systemic sclerosis: A transcriptome integration analysis. Front Immunol. 2022;13:929289.

406. Li L, Zuo X, Liu D, Luo H, Zhu H. The profiles of miRNAs and lncRNAs in peripheral blood neutrophils exosomes of diffuse cutaneous systemic sclerosis. J Dermatol Sci. 2020 May;98(2):88–97.

407. Didier K, Giusti D, Le Jan S, Terryn C, Muller C, Pham BN, et al. Neutrophil Extracellular Traps Generation Relates with Early Stage and Vascular Complications in Systemic Sclerosis. J Clin Med. 2020 Jul 7;9(7).

408. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? J Cell Biol. 2012 Sep 3;198(5):773–83.

409. McGarry T, Biniecka M, Veale DJ, Fearon U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. Free Radic Biol Med. 2018 Sep;125:15–24.

410. Chen T, Xu PC, Gao S, Hu SY, Wei L, Yan TK. Monomeric C-reactive protein promotes platelets to release mitochondrial DNA in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Mol Immunol. 2021 Sep;137:228–37.

411. Branitzki-Heinemann K, Möllerherm H, Völlger L, Husein DM, de Buhr N, Blodkamp S, et al. Formation of Neutrophil Extracellular Traps under Low Oxygen Level. Front Immunol. 2016;7:518.

412. McInturff AM, Cody MJ, Elliott EA, Glenn JW, Rowley JW, Rondina MT, et al. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 α. Blood. 2012 Oct 11;120(15):3118–25.

413. Xiao W, Wang RS, Handy DE, Loscalzo J. NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. Antioxid Redox Signal. 2018 Jan 20;28(3):251–72.

414. Chun Y, Kim J. AMPK-mTOR Signaling and Cellular Adaptations in Hypoxia. Int J Mol Sci. 2021 Sep 9;22(18):9765.

415. Aldabbous L, Abdul-Salam V, McKinnon T, Duluc L, Pepke-Zaba J, Southwood M, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Angiogenesis: Evidence From Vascular Pathology in Pulmonary Hypertension. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016 Oct;36(10):2078–87.

416. Rokni M, Sadeghi Shaker M, Kavosi H, Shokoofi S, Mahmoudi M, Farhadi E. The role of endothelin and RAS/ERK signaling in immunopathogenesis-related fibrosis in patients with systemic sclerosis: an updated review with therapeutic implications. Arthritis Res Ther. 2022 May 13;24(1):108.

417. Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Increased phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase p38 in scleroderma fibroblasts. J Invest Dermatol. 2005 Aug;125(2):247–55.

418. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2010 Aug;62(8):2476–87.

419. Salituri J, Patey N, Takano T, Fiset P, Del Rincon S, Berkson L, et al. Mammalian target of rapamycin is activated in the kidneys of patients with scleroderma renal crisis. J Scleroderma Relat Disord. 2020 Jun;5(2):152–8.

420. Moreno-Moral A, Bagnati M, Koturan S, Ko JH, Fonseca C, Harmston N, et al. Changes in macrophage transcriptome associate with systemic sclerosis and mediate GSDMA contribution to disease risk. Ann Rheum Dis. 2018 Apr;77(4):596–601.

421. Oliveira JD, Vieira-Damiani G, da Silva LQ, Leonardi GR, Vaz CO, Jacintho-Robison BC, et al. Impact of antiplatelets, anticoagulants and cyclic nucleotide stimulators on neutrophil extracellular traps (NETs) and inflammatory markers during COVID-19. J Thromb Thrombolysis. 2025 Feb;58(2):199–209.

422. Sun H, Du Z, Zhang X, Gao S, Ji Z, Luo G, et al. Neutrophil extracellular traps promote proliferation of pulmonary smooth muscle cells mediated by CCDC25 in pulmonary arterial hypertension. Respir Res. 2024 Apr 25;25(1):183.

423. Taylor S, Isobe S, Cao A, Contrepois K, Benayoun BA, Jiang L, et al. Endogenous Retroviral Elements Generate Pathologic Neutrophils in Pulmonary Arterial Hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 2022 Oct 15;206(8):1019–34.

424. Zhang F, Li Y, Wu J, Zhang J, Cao P, Sun Z, et al. The role of extracellular traps in ischemia reperfusion injury. Front Immunol. 2022;13:1022380.

425. Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. J Pathol. 2014 Jul;233(3):294–307.

426. Suzuki M, Ikari J, Anazawa R, Tanaka N, Katsumata Y, Shimada A, et al. PAD4 Deficiency Improves Bleomycin-induced Neutrophil Extracellular Traps and Fibrosis in Mouse Lung. Am J Respir Cell Mol Biol. 2020 Dec;63(6):806–18.

427. Sansores-España LD, Melgar-Rodríguez S, Vernal R, Carrillo-Ávila BA, Martínez-Aguilar VM, Díaz-Zúñiga J. Neutrophil N1 and N2 Subsets and Their Possible Association with Periodontitis: A Scoping Review. Int J Mol Sci. 2022 Oct 11;23(20):12068.

428. Fuschiotti P. T cells and cytokines in systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol. 2018 Nov;30(6):594–9.

429. Manoj H, Gomes SM, Thimmappa PY, Nagareddy PR, Jamora C, Joshi MB. Cytokine signalling in formation of neutrophil extracellular traps: Implications for health and diseases. Cytokine Growth Factor Rev. 2025 Feb;81:27–39.

430. Ma Y, Wang M, Jia J, Meng J, Teng J, Zhu D, et al. Enhanced type I interferon signature induces neutrophil extracellular traps enriched in mitochondrial DNA in adult-onset Still's disease. J Autoimmun. 2022 Feb;127:102793.

431. Peng Y, Wu X, Zhang S, Deng C, Zhao L, Wang M, et al. The potential roles of type I interferon activated neutrophils and neutrophil extracellular traps (NETs) in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. Arthritis Res Ther. 2022 Jul 19;24(1):170.

432. Zhou X, Trinh-Minh T, Tran-Manh C, Gießl A, Bergmann C, Györfi AH, et al. Impaired Mitochondrial Transcription Factor A Expression Promotes Mitochondrial Damage to Drive Fibroblast Activation and Fibrosis in Systemic Sclerosis. Arthritis Rheumatol. 2022 May;74(5):871–81.

433. Ryu C, Walia A, Ortiz V, Perry C, Woo S, Reeves BC, et al. Bioactive Plasma Mitochondrial DNA Is Associated With Disease Progression in Scleroderma-Associated Interstitial Lung Disease. Arthritis Rheumatol. 2020 Nov;72(11):1905–15.

434. Ottria A, Zimmermann M, Paardekooper LM, Carvalheiro T, Vazirpanah N, Silva-Cardoso S, et al. Hypoxia and TLR9 activation drive CXCL4 production in systemic sclerosis plasmacytoid dendritic cells via mtROS and HIF-2α. Rheumatology (Oxford). 2022 May 30;61(6):2682–93.

435. Su TIK, Khanna D, Furst DE, Danovitch G, Burger C, Maranian P, et al. Rapamycin versus methotrexate in early diffuse systemic sclerosis: results from a randomized, single-blind pilot study. Arthritis Rheum. 2009 Dec;60(12):3821–30.

Facteurs sériques, cellulaires et environnementaux impliqués dans l'excès de NETose dans différentes formes de Sclérodermie Systémique

INTRODUCTION. La sclérodermie systémique (ScS) se caractérise par une dysfonction des fibroblastes, une dysfonction endothéliale et de l'auto-immunité, évoluant dans un environnement oxydatif. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont activés et fortement pourvoyeurs de stress oxydatif, avec la possibilité de libérer des filaments d'ADN décondensés (appelés NETs pour Neutrophil Extracellular Traps). Nous hypothétisons que les NETs pourraient être présents dans la ScS et nous proposons d'explorer les facteurs potentiellement impliqués dans leur dérégulation, et notamment l'hypoxie omniprésente dans cette pathologie.

METHODES. Les PNN de sujets sains et de ScS étaient stimulés de façon autologue en condition normoxique (37°C et 21% O_2) ou hypoxique (37°C et 1% O_2) selon les expériences. Une quantification des NETs, de l'aire des NETs et du nombre de noyau était réalisée via Image J, basée sur le marquage des NETs via Sytox Orange et DAPI. Les formes réactives de l'oxygène (FRO) mitochondriales étaient marquées par du TOMM20.

RESULTATS. Les PNN de ScS généraient plus de NETs que ceux de sujets sains, principalement ceux se compliquant d'hypertension artérielle pulmonaire ou d'ulcères digitaux (complications vasculaires), et ceux avec une courte durée d'évolution de la maladie. Il n'y avait pas de différence quant à la génération de NETs selon le phénotype cutané (diffus ou limité), ni selon le type d'auto-anticorps détecté. Le sérum et le PNN de ScS étaient impliqués dans l'excès de NETs. La génération de NETs faisait intervenir la voie NADPH-oxydase (Nox) indépendante via la formation de FRO mitochondriales, exacerbé par un environnement hypoxique, chez tous les patients.

CONCLUSION. La NETose est présente en excès chez tous les ScS, principalement ceux atteints de complications vasculaires. Ce phénomène implique la voie Nox-indépendante via la formation de FRO mitochondriales. Ces résultats pourraient ouvrir vers de nouvelles cibles thérapeutiques.

Sclérodermie systémique ; Polynucléaires neutrophiles ; NETose ; Neutrophil extracellular traps ; hypoxie ; stress oxydatif ; mitochondrie

Serum, cellular and environmental factors implicated in the excess of NETosis in different type of Systemic Sclerosis

INTRODUCTION. Systemic sclerosis (SSc) is characterized by fibroblasts and endothelial dysfunctions, and autoimmunity, with an oxidative environment. Neutrophils can generate high amount of oxidative stress, and are strongly activated by it. In response to oxidative stress, neutrophils can release DNA filaments called Neutrophil Extracellular Traps (NETs). We hypothesized that NETs could be involved in ScS, and proposed to explore the different factors potentially implicating in its dysregulation, notably hypoxia which is omnipresent in SSc.

METHODS. Neutrophils from healthy controls and ScS were stimulated in autologous conditions in normoxia (37°C and 21% O_2) or hypoxia (37°C and 1% O_2) in some experiments. The quantifications of NETs, area of NETs and number of nucleus were performed using a software in Image J, based on the NETs staining by Sytox Orange and DAPI. Mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) were stained by TOMM20.

RESULTS. Neutrophils from SSc generated more NETs than those from controls, especially those from patients with pulmonary arterial hypertension or digital ulcers (vascular complications), and those at the early stages of the disease. There was no difference according to skin phenotype (diffuse or limited), and the type of autoantibody detected. Serum and neutrophils were both implicated in the excess of NETs. NETs generation implicated the NADPH-oxidase (Nox)-independent pathway, through the generation of mtROS, exacerbated by an hypoxic environment, in all patients (with and without vascular complications).

CONCLUSION. NETosis phenomenon is present in excess in all SSc patients, notably those with vascular complications. This phenomenon implicates the Nox-independent pathway, through the generation of mtROS. These results could lead to new therapeutic targets.

Systemic sclerosis ; Neutrophils ; NETosis ; Neutrophil extracellular traps ; hypoxia ; oxidative stress ; mitochondria

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Immunologie et Microbiologie

Université de Reims Champagne-Ardenne

IRMAIC - EA 7509