

Thérapies cellulaires appliquées à la sclérodermie systémique : état des lieux & perspectives

Mélanie Velier

▶ **To cite this version:**

Mélanie Velier. Thérapies cellulaires appliquées à la sclérodermie systémique : état des lieux & perspectives. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02317878

HAL Id: dumas-02317878

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02317878

Submitted on 16 Oct 2019

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

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

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 11 Octobre 2019

Par Mélanie VELIER
Née le 29 juillet 1992

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

THÉRAPIES CELLULAIRES APPLIQUÉES À LA SCLÉRODERMIE SYSTÉMIQUE : ÉTAT DES LIEUX & PERSPECTIVES

----oOo----

JURY :

Président :	Madame le Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE
Membres :	Madame le Professeur Florence SABATIER
	Madame le Professeur Brigitte GRANEL
	Monsieur le Professeur Christian CHABANNON

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité :	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS	
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES	
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.	
PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

Remerciements

À Madame le Professeur Françoise Dignat-George,
Merci de me faire l'honneur de présider aujourd'hui mon jury de thèse.
Merci pour votre présence et vos précieux conseils tout au long de mon parcours.
C'est un véritable honneur de pouvoir continuer à travailler à vos côtés.
Je vous adresse ici ma très sincère reconnaissance.

À Madame le Professeur Florence Sabatier,
Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse.
Merci pour votre confiance et votre soutien dans chacun des projets que j'ai pu mener sous votre direction lors de ces dernières années.
Je vous adresse ici toute mon admiration.

À Madame le Professeur Brigitte Granel,
Merci de faire l'honneur de siéger dans ce jury.
Votre implication et vos compétences dans cette thématique ont motivé la réalisation de ce projet.
Trouvez ici toute ma gratitude.

À Monsieur le Professeur Christian Chabannon,
Merci d'avoir accepté de juger ce travail.
Merci pour votre disponibilité et votre bienveillance tout au long de mon semestre dans votre service.
Ces six mois passés auprès de vous et votre équipe m'ont été extrêmement enrichissants.
Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

À tout le personnel soignant et les patients qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

À mes parents Rose-Marie et Michel, **grâce à qui ceci a été fait,**
Merci pour votre amour et votre soutien inconditionnels à chaque étape de ma vie et de n'avoir jamais remis en question mes choix.
Vous savoir à mes côtés a toujours été un incroyable moteur.
Maman, je ne saurais par où commencer… Merci pour TOUT ce que tu as fait, les fiches, les courses, les repas Top chef, les relectures, les envois, les retours, les confidences, les rires, les chasses au trésor…Bref la liste est infinie, tout comme mon amour pour toi.
Papa, Merci pour les trajets vers l'école primaire remplis de devinettes, pour les sessions de tennis, de badminton, de ping-pong, pour le MV2, pour le MV2+ …Mais plus important encore, merci d'encourager chacun de mes projets avec un immense enthousiasme et de toujours vouloir le meilleur pour moi.

À ma sœur Caroline, pour qui ceci a été fait.
Merci d'être celle que tu es.
Merci pour tes convictions, tes idées, ta créativité, ton humour tellement second degré et tellement pas « lovely » et toutes ces choses que tu as parsemées sur ma vie avec amour et tendresse depuis que je suis née.

À mes grands-parents, les meilleurs.

À Anaïs, ma binôme. Comme ça aurait été différent sans toi !!! Cette thèse est aussi pour toi, pour tous ces souvenirs passés dans cette faculté, sur les bancs de l'amphi, à tester les cocktails pour les soirées Erasmus, en TP à essayer de peser nos souris tant bien que mal... Merci pour ces 5 années et depuis, pour toutes ces soirées dont je ne me passerai plus !

À mes plus grandes amies, le club: **Anouk** le cercle number1, **Astrid** l'indispensable depuis les repas du mardi soir, **Cam** ma viiiiiiiiiie, **Caro** avec qui je n'oublie jamais de croire au destin, **Cha** la partenaire parfaite pour danser, **Elise** notre pâtissière favorite et la seule prête à sacrifier son sac à viande si besoin, **Elsa** ma double co-loc, co-rédactrice de ce manuscrit et bien d'autres co-, **Gus l**'amie d'enfance dont je ne passerai jamais, **Laura** pour qui j'espère toujours rester Kaoumie… et bien sûr un immense merci à **Céline**.

À Joelle, JC, Ari, JC, Cam, Franck, Inès, Pierre, pour tous ces moments de famille passés ensemble, à rire autour d'une bonne soupe au pistou. Que rien ne change !

À Tomos, mon bro', my ecological mentor, my personal translator. Love ++++

À mes co-internes, sans qui cet internat n'aurait pas eu la même saveur : **Lakdou** mon premier co-interne, c'est une grande joie de te retrouver chaque jeudi, **Lina** la femme pamplemousse merci pour nos soirées à refaire le monde, **Pascalou** merci pour nos journées à la MDD et à nos bières depuis ce stageà l'EFS, **Clem** pour ces conseils toujours avisés, **Pauline ma popo** pour le soutien mutuel, les récitations, les fous rires communicatifs et aussi pour ton précieux talent, tu dessines les cellules dendritiques sur ppt comme personne, **Alexia** merci d'avoir partagé avec moi cette expérience fabuleuse qu'est le stürm (?!), et bien sûr à la

dream team : **Alizée, Astrid, Benjam, Flower, Maëlle, Mahenina, Noémie, Nico, Popo**, je n'aurai pu rêver meilleure équipe pour clôturer cet internat.

À mes Colines petits et gros bonnets et **Marina** pour tous ces moments passés à danser ensemble, en studio ou sur le dancefloor. Tout ça n'aurait pas été possible sans toi **Judith ;** Merci aussi d'avoir accepté sans rien dire tous ces soirs où je n'ai pas pû venir aux cours de danse à cause de gardes ou d'exams à réviser.

À mes ami(e)s : Martin mon choupi mon fantomas mais toujours là s'il le faut**, Baptou** mon marin préféré, extrêment fidèle en amitié, **Jer et Diane** mes voisins favoris que j'adore, présents au quotien**, Charlie** merci d'être là après toutes ces années, en espérant que les prochaines nous rapprocheront encore plus, **Raph** merci d'avoir partagé mes premiers blots «et ça blot, ça blot, ça blot … » et pour ces choufferies régulières depuis**, Megan** ma WTF copine adorée**, Tang** et **Ludi** pour ces sorties PMA**, Clément** et **Audrey** pour vos sourires permanents**, Agathe** et **Pao** pour les danses du crabe et **Bobot,** pour notre future collab !

À Laurie, Mumu et Danielou, vous avez marqué mon enfance. Je suis si heureuse de vous voir ici aujourd'hui. Laurie, que nos debriefs trimestriels ne s'arrêtent jamais !

À toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance et l'honneur de travailler **: Cyril** car oui tout a commencé avec toi, **Laurence C** sans qui je n'en serai certainement pas là aujourd'hui, **Jérémy** sur qui je peux toujours compter, **Stéphanie** pour m'avoir initiée à la recherche et pour soutenir les projets avec patience et pertinence**, Aurélie** pour les envois de publis et les repas partagés ensemble, **Pascale** pour ton enthousiasme débordant, **Christophe P** que je revois toujours avec beaucoup de plaisir, **Philippe C, Christine Z, Laeti** et **Sarah** pour ce super choix en virologie.

À toute l'équipe du LCTC et de bio vasc : **Fanny, Julie, Laurent G, Laurent A, Houssein, Chloé**, **Luc** qui m'ont accueillie lors de mes premiers pas dans la thérapie cellulaire et que je n'ai jamais vraiment quittée depuis… Pour rappel, le choco à l'orange c'est bien le meilleur !!

À toute l'équipe de l'IPC : **Claude, Boris, Bechara, Sophie, Elodie, Sandrine, Cécile, Sylvie et Carine** pour ces 6 mois passés ensemble. Travailler avec vous était une superbe expérience, tant professionnelle que personnelle.

À toute l'équipe d'hémato : **Isabelle Vanessa, Marie, Caroline** pour m'avoir donné goût à cette discipline et **Yaël, Maud, Romaric, Corinne, Sylvie, Shirley** pour me former un peu plus chaque jour à mon métier de demain, je suis très honorée d'apprendre à vos côtés.

À toute l'équipe du C2VN, pour votre aide et votre disponibilité dès que j'en ai besoin.

Enfin, **À toi Pierre,** mon co-équipier, mon quotidien.
Sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour ton soutien, ton admiration, pour toutes ses chansons revisitées et ses éclats de rires. Tu remplis ma vie d'une douceur infinie.
À tous les projets qui nous attendent et je sais déjà qu'ils seront nombreux.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Table des matières

INTRODUCTION **7**
PARTIE 1 : LA SCLÉRODERMIE SYSTÉMIQUE **9**
I. Définition et épidémiologie 10
II. Physiopathologie 10
A. Facteurs génétiques et environnementaux 11
B. Mécanismes physiopathologiques 12
1. Atteinte vasculaire 13
2. Signaux pro-fibrosants 14
3. Désordes immunitaires 16
III. Diagnostic et classification 18
IV. Symptomatologie 22
A. Atteinte cutanée 22
B. Atteinte oro-faciale 24
C. Atteinte pulmonaire 25
D. Atteinte cardiaque 25
E. Atteinte rénale 26
F. Atteinte digestive 26
G. Atteinte de l'appareil locomoteur 27
V. Evolution et pronostic 28
VI. Traitements 29
A. Traitements symptomatiques 29
1. Phénomène de Raynaud 29
2. Ulcères digitaux et calcinoses 30
3. Manifestations digestives 30
4. Crise rénale sclérodermique 30
5. HTAP 31
6. Arthromyalgies 31
B. Traitements immunomodulateurs 31
C. Biothérapies et traitements à l'essai 32
PARTIE 2 : THÉRAPIES CELLULAIRES APPLIQUÉES À LA SCLÉRODERMIE SYSTÉMIQUE **35**
I. La thérapie cellulaire 36
A. Définition 36
B. Classification des cellules souches 37
1. CS totipontentes 37
2. CS pluripotentes 38
a. CS embryonnaires 38
b. induced Pluripotent Stem cells 39
3. CS multipotentes 40
a. CS Mésenchymateuses 40
b. CS Hématopoïétiques 41
4. CS unipotentes 42

II. Les thérapies cellulaires appliquées à la ScS 43
A. Thérapies cellulaires par voie systémique 43
1. Autogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques 43
a. Rationnel mécanistique 44
b. Protocole de l'autogreffe de CSH appliqué à la ScS 48
c. Un traitement validé suite à des essais cliniques randomisés concluants 51
d. Enjeux actuels 55
2. Cellules Souches Mésenchymateuses allogéniques par voie IV 60
a. Définition 60
b. Propriétés 61
c. Essais dans la ScS 65
B. Thérapies cellulaires par voie locale 68
1. Tissu Adipeux non manipulé 69
a. Définition 69
b. Propriétés 70
c. Essais et résultats dans la ScS 70
2. Fraction Vasculaire Stromale 73
a. Définition 73
b. Propriétés 74
c. Essais dans la ScS 75
3. Adipose Stem/Stromal Cells 78
a. Définition 78
b. Essais et résultats dans la ScS 78
PARTIE 3 : TRAVAIL EXPÉRIMENTAL 81
CONCLUSION 110
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 113
SERMENT DE GALIEN 129

Liste des abréviations

AAN : Anticorps Anti-Nucléaires
Ac : Anticorps
ACR : American College of Rheumatology
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AP-HP : Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
AP-HM : Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille
ARMM : Agent Rhumatismal Modificateur de la Maladie
ARNm : ARN messager
ASC : Adipose Stromal/Stem Cells
αSMA : alpha Smooth Muscle Actin
Auto-Ac : Auto-Anticorps
Auto-CSH : Autogreffe de CSH
BAFF : B-cell Activating Factor
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
CB2 : CannaBinoid receptor 2
CE : Cellules Endothéliales
COL1A2 : COLlagène type I alpha 2
CRS : Crise Rénale aiguë Sclérodermique
CS : Cellules Souches
CSE : CS Embryonnaires
CSH : CS Hématopoïétiques
CSM : CS Mésenchymateuses
CTGF : Connective Tissue Growth Factor
CVF : Capacité Vitale Forcée
Cy : Cyclophosphamide
DAMPs : Damage Associated Molecular Patterns
DLCO : Capacité de Diffusion du Monoxyde de Carbone
EBMT : European Society for Blood and Marrow Transplant society
ECFC : Endothelial Colony Forming Cells
EFR : Exploration Fonctionnelle Respiratoire
ET-1 : EndoThéline-1
ETT : Echocardiographie Trans-Thoracique
EULAR : EUropean League Against Rheumatism
EUSTAR: EULAR scleroderma Trials And Research
FGF : Fibroblast Growth Factor
FVS : Fraction Vasculaire Stromale
GAIT : Global Alliance for iPS Therapy
GRCS : Global Rank Composite Score
GvHD : Graft versus Host Disease
HAQ-DI : Health Assessment Questionnaire – Disability Index
Hep-2: Human epithelial cell line type 2
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HLA : Human Leucocyte Antigen
HTAP : HyperTension Artérielle Pulmonaire
ICAM : Inter Cellular Adhesion Molecule
IDO : Indoleamine 2,3 DiOxygenase
IFATS : International Federation for Adipose Therapeutics and Science
IL : InterLeukine
INFɣ : INterFeron ɣ
iPS : induced Pluripotent Stem cells
IRF-5 : Interferon Regulatory Factor-5
ISCT : International Society for stem Cell Therapy
MAC : Myeloid Angiogenic Cells
MATHEC : Maladies Auto-immunes et Thérapie Cellulaire
MCP : MétaCarpo-Phalangiennes
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEC : Matrice ExtraCellulaire

MHISS : Mouth Handicap In Systemic Sclerosis Scale

MLR : Mixed Lymphocyte Reaction

MMF : Mycophénolate Mofétil

MMP : Matrix MetalloProteinases

mRSS : score de Rodnan modifié

MTI : Médicaments de Thérapie Innovante

MVs : MicroVésicules

NK : Natural Killer

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PDGF-R : Platelet Derived Growth Factor-Recepteur

PE : Progéniteurs Endothéliaux

PGI2 : ProstaGlandine I2

PID : Pneumopathie Interstitielle Diffuse

POIC : Pseudo-Occlusion Intestinale Chronique

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

RGO : Reflux Gastro-Oesophagien

rhG-CSF : recombinant human Granulocyte-Colony-Stimulating Factor

ROS : Reactive Oxygen Species

SAL : Sérum Anti-Lymphocytaire

ScS : Sclérodermie Systémique

SFGM-TC : Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire

SHAQ : Scleroderma Health Assessment Questionnaire

STAT-4 : Signal Transducer and Activator of Transcription-4

TA : Tissu Adipeux

TGFα : Transforming Growth Factor alpha

TGFβ : Transforming Growth Factor beta

TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

TNFα : Tumor Necrosis Factor alpha

Treg : T régulateurs

TRM : Treatment Related Mortality

UD : Ulcères Digitaux

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des figures

Figure 1 : Physiopathologie de la ScS d'après Viswanath et al.

Figure 2 : Formes cutanées diffuses (à gauche) et limitées (à droite) de ScS

Figure 3 : Formes cliniques de ScS selon Leroy et Medsger, 2001

Figure 4 : Score de Rodnan modifié

Figure 5 : Différents aspects cliniques du handicap de la main sclérodermique

Figure 6 : Principales complications associées à la ScS

Figure 7 : Impact des différentes approches thérapeutiques actuelles et en cours de développement dans la ScS

Figure 8 : Classification fonctionnelle des CS : de la totipotence à l'unipotence

Figure 9 : Modèle proposé pour le mécanisme d'action de l'auto-CSH

Figure 10 : Cinétique de reconstitution des sous populations immunes après greffe de CSH

Figure 11 : Modèle de la reconstitution du répertoire TCR après auto-CSH

Figure 12 : Schéma présentant le protocole de l'autogreffe de CSH

Figure 13 : Cinétique des traitements dans la procédure d'autogreffe

Figure 14 : Courbes de survie sans évenement (A) et surive globale (B) des patients de l'essai ASTIS

Figure 15 : Distribution du GRCS à 54 mois

Figure 16 : Courbe de Kaplan-Meier évaluant la survie globale des patients de l'essai SCOT

Figure 17 : Critères minimums de définition des CSM selon l'ISCT

Figure 18 : Principaux modes d'action paracrine des CSM

Figure 19 : Fonctions immunomodulatrices des CSM

Figure 20 : Guérison progressive des ulcères digitaux après injection de TA autologue

Figure 21 : Cross talk entre ASC et PE présents dans les FVS

Figure 22 : Résultats cliniques de l'essai SCLERADEC jusqu'à 2 ans après l'injection de FVS autologue

Figure 23 : Schéma d'obtention de la FVS et des ASC depuis le TA

Figure 24 : Aspect avant (A) et après (B) injection d'ASC

Liste des tables

Table 1 : Critères diagnostiques de la ScS selon l'ACR définis en 1980

Table 2 : Critères de classification ACR/EULAR de la Sclérodermie Systémique en 2013

Table 3 : Résumé des 3 principaux essais contrôlés randomisés entre l'auto-CSH et le Cy dans la ScS adapté d'après Del Papa et al.

INTRODUCTION

La sclérodermie systémique est une maladie auto-immune complexe caractérisée par une altération fonctionnelle et structurelle du réseau microvasculaire associée à des lésions de fibrose cutanée et viscérale dans un contexte de dysimmunité.

L'étiologie précise de la maladie est encore inconnue et les mécanismes physiopathologiques sous-tendant la maladie restent à ce jour mal compris. Les thérapeutiques conventionnelles reposent sur l'emploi de molécules immunomodulatrices et sur une prise en charge symptomatique des manifestations de la maladie mais se révèlent souvent insuffisantes, notamment pour les patients souffrant de formes sévères et rapidement évolutives.

Dans ce contexte, poursuivre la recherche d'options thérapeutiques pour les patients atteints de sclérodermie systémique est essentiel. Les approches de thérapie cellulaire pourraient constituer une solution crédible avec l'ambition de pouvoir agir sur les différentes composantes de la maladie : le système immun, le système vasculaire et la matrice extracellulaire.

L'objet de ce travail est d'exposer les thérapies cellulaires dont l'indication est validée ou en cours d'évaluation dans la sclérodermie systémique.

Dans une première partie, nous aborderons les différents aspects de la sclérodermie systémique ; maladie complexe caractérisée par une grande hétérogénéité dans son expression clinique, son évolution et par voie de conséquence, son pronostic.

Puis, dans une seconde partie, nous développerons l'arsenal des thérapies cellulaires disponibles dans la sclérodermie systémique. Un premier volet s'intéressera aux thérapies injectées par voie systémique à visée principalement immunomodulatrice et plus particulièrement à l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques et à l'injection intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses. Un second volet dressera un état des lieux des thérapies cellulaires administrées par voie locale, principalement dérivées du tissu adipeux.

Enfin, les résultats préliminaires d'un travail expérimental mené au Centre recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN, Faculté de Pharmacie, Marseille) concernant l'impact de la maladie sur les propriétés paracrines des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux seront exposés dans une troisième partie.

PARTIE 1 :

LA SCLÉRODERMIE SYSTÉMIQUE

I. Définition et épidémiologie

La Sclérodermie Systémique (ScS) est une maladie auto-immune systémique appartenant au groupe de connectivites (collagénoses). L'origine étymologique vient du grec : σκλήρωσις (sclérosis) qui signifie « durcissement » et δέρμα (derma) « la peau ».

La ScS est une affection généralisée du tissu conjonctif caractérisée par des anomalies micro-vasculaires et des lésions de fibrose cutanée et/ou viscérale, dans un contexte auto-immun.

C'est une maladie répondant à la définition des maladies rares, dont la prévalence en Europe est estimée entre 50 et 150 cas pour 1 million d'individus et dont l'incidence annuelle est d'environ 13 cas pour un million d'individus [1]. Cela représente un peu moins de 10 000 personnes en France [2,3].

Elle atteint avec prédilection les femmes (3 à 8 femmes pour 1 homme) [4]. La maladie peut survenir à tout âge mais il existe un pic de fréquence entre 45 et 60 ans. Chez l'enfant, la ScS est extrêmement rare et représente moins de 5% de l'ensemble des ScS [1].

Au cours de la ScS, il existe un risque de décès 3,5 fois plus élevé que chez un sujet sain de même âge, faisant de la ScS la connectivite avec le moins bon pronostic [5]. Le pronostic est plus sombre dans les formes cutanées diffuses, et d'autant plus s'il existe des atteintes viscérales (pulmonaires, digestives basses, rénales et cardiaques), qui représentent les principales causes de morbidité associée à la ScS. La survie globale à 10 ans est de 55% [6] et des données récentes issues de la cohorte EUSTAR (European League Against Rheumatism (EULAR) Scleroderma Trials And Research) rapportent une survie à 3 ans de 89,3% [7]. Toutefois, le retentissement social associé à l'atteinte cutanée n'est pas négligeable et participe fortement au handicap global de la maladie [8].

II. Physiopathologie

La ScS est une maladie complexe et multifactorielle dont l'étiologie précise demeure inconnue. Cependant, le rôle d'acteurs cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales et cellules immunes) ainsi que l'implication de certains facteurs génétiques et environnementaux sont, de nos jours, clairement établis.

A. Facteurs génétiques et environnementaux

Bien que la ScS ne soit pas une maladie génétique, des études épidémiologiques ont montré une susceptibilité génétique avec une augmentation significative du risque de récurrence pour les apparentés au premier degré (1,6% versus 0,026% dans la population générale) [9]. Cependant, les études portant sur des jumeaux monozygotes n'ont montré qu'un taux de concordance de 4,2%, suggérant ainsi que les facteurs génétiques n'ont qu'un faible impact dans le développement de la maladie [10].

La composante génétique de la ScS est polygénique, c'est-à-dire causée par l'altération d'un ensemble de gènes. Des études d'associations pangénomiques (GWAS) à large échelle ont permis d'identifier des polymorphismes des gènes Human Leucocyte Antigen (HLA) associés à une susceptibilité accrue au développement de la ScS (HLA DRB1*11 :04) [11] et des polymorphismes HLA protecteurs (HLA DRB1*13 :02) [12]. Parmi les gènes non HLA, des variants génétiques du gène Signal Transducer and Activator of Transcription-4 (STAT-4) et Interferon Regulatory Factor-5 (IRF-5), également impliqués dans d'autres maladies auto-immunes, semblent associés à la ScS [13].

Enfin, certains patients font des connectivites successives (par exemple lupus puis ScS), suggérant la possibilité d'un déterminant génétique commun à ces pathologies. Des mécanismes épigénétiques impliquant la méthylation de l'ADN ont été mis en évidence au niveau de gènes régulant la synthèse de collagène : la voie du Transforming Growth Factor beta (TGFβ) ou l'activation des lymphocytes T [14].

Outre les facteurs génétiques, certains facteurs environnements prédisposent et participent à l'apparition de la ScS. Parmi les mieux documentés, l'exposition environnementale à certains toxiques tels que la silice, les métaux lourds ou les solvants organiques semblent être en cause dans le déclenchement de la maladie [15–17] (Tableau 25 des maladies professionnelles pour la silice, maladie à caractère professionnel pour les solvants). Le mécanisme actuellement retenu repose sur la pénétration cutanée et pulmonaire de ses substances responsables d'une inflammation chronique avec formation de radicaux libres, et à terme, du développement de la fibrose. L'imputabilité des solvants organiques a été démontrée dans une méta-analyse [18] et celle des prothèses mammaires a été infirmée [19].

Par ailleurs, des agents infectieux (cytomégalovirus, *Helicobacter pylori*) ont été proposés comme facteurs déclenchants potentiels, mais aucune association causale directe entre infections et ScS n'a pu être démontrée. Néanmoins, au cours de la ScS, une synergie entre produits viraux et d'autres facteurs du microenvironnement pourraient prédisposer au développement de la maladie (l).

Enfin, des anomalies de l'équilibre du microbiote semblent associées au développement de maladies auto-immunes dont la ScS. Deux études ont objectivé un déficit en *Faecalibacterium prausnitzii* dans la flore digestive des patients sclérodermqiues, bactérie aux propriétés anti-inflammatoires [20,21].

B. Mécanismes physiopathologiques

La grande hétérogénéité clinique de la maladie rend complexe la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-tendant. Cependant, il est admis que la ScS repose sur un trépied pathogénique : (i) une attente microvasculaire précoce avec des phénomènes de remodelage vasculaire, (ii) un excès de fibrose, et (iii) des phénomènes inflammatoires et auto-immuns (Figure 1). Une expression variable de ces trois composantes pourrait expliquer l'hétérogénéité clinique et pronostique de la maladie.

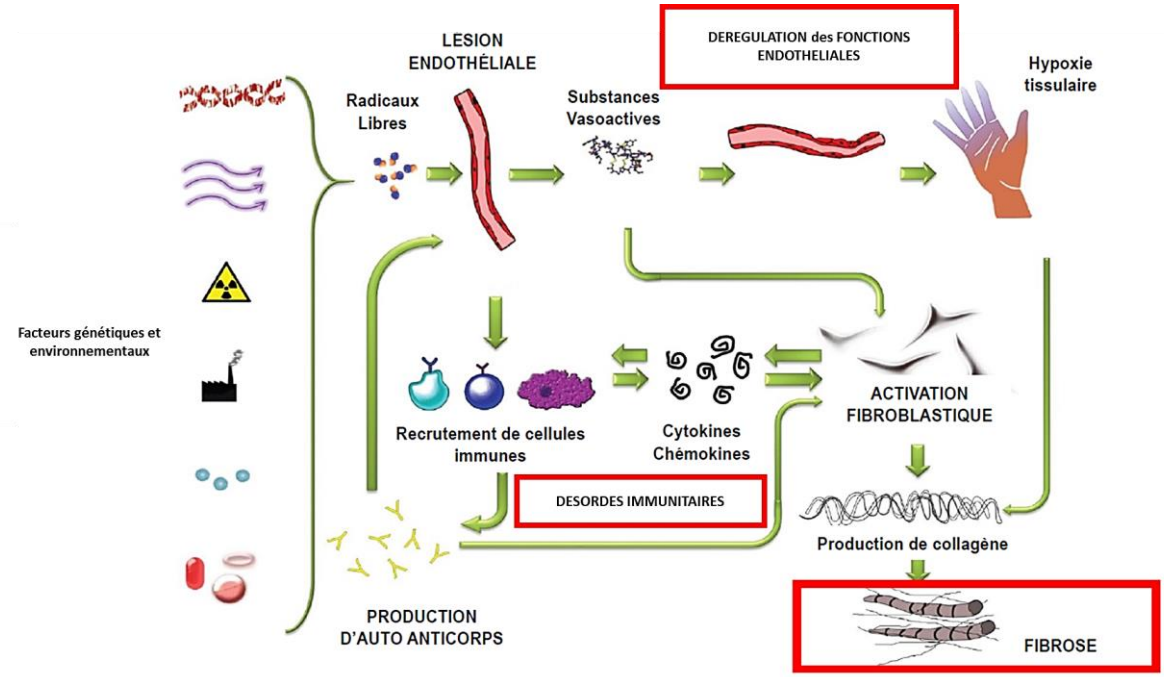


Figure 1 : Physiopathologie de la ScS d'après Viswanath et al. [22]

1. Atteinte vasculaire

Les anomalies vasculaires observées au cours de la ScS sont précoces et concernent principalement la microcirculation (artérioles et capillaires). L'atteinte du réseau micro-vasculaire et l'activation des cellules endothéliales (CE) semblent être un des éléments clés et précoces dans la pathogénie de la ScS. Des travaux histologiques ont en effet montré que les lésions initiales siègent au niveau de l'endothélium et précèdent souvent la fibrose, comme en témoigne le phénomène de Raynaud qui est le premier signe clinique de la maladie.

Plusieurs facteurs sont mis en cause dans l'activation et l'apoptose endothéliales parmi lesquels figurent les auto-anticorps (auto-Ac) anti-CE, l'hyperproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'Interleukine-1 (IL-1) et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα) [23]. La cible de ces anticorps (Ac) n'est pas encore bien définie et leur rôle pathogène n'est toujours pas clairement établi.

Ceci conduit à une surexpression de molécules d'adhésion (Inter Cellular Adhesion Molecule (ICAM), Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) et E-sélectine) à la surface des CE favorisant le recrutement de cellules inflammatoires et conduisant, à terme, à un infiltrat leucocytaire et à une amplification du processus apoptotique endothélial (24,25).

La synthèse de modulateurs du tonus vasculaire est également perturbée au cours de la ScS avec notamment une moindre production de monoxyde d'azote et de prostacyclines vasodilatatrices ainsi qu'un excès de synthèse d'endothéline-1 (ET-1) aux propriétés vasoconstrictrices. Il en résulte des anomalies dans la régulation de la perméabilité et du tonus vasculaire chez les patients sclérodermiques [26,27].

Par ailleurs, des mécanismes pro-angiogéniques sont mis en place pour compenser l'ischémie vasculaire. Ainsi on retrouve une élévation des taux circulants de cytokine pro-angiogénique telle que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et de progéniteurs endothéliaux dans le sang périphérique des patients sclérodermiques [28–30].

Il est toutefois important de noter que les études s'intéressant au nombre de progéniteurs endothéliaux dans la ScS sont discordantes en termes de résultats et ceci s'explique notamment par l'hétérogénéité des populations endothéliales étudiées.

Par ailleurs, notre équipe a récemment publié une étude révélant une corrélation positive entre la fractalkine soluble sérique et le nombre de progéniteurs endothéliaux CD34+ CD45- [31].

Cependant, ces réponses pro-angiogéniques, qui pourraient représenter une tentative de réparation des dégâts vasculaires, s'avèrent insuffisantes et/ou inefficaces. En effet, d'autres facteurs aux propriétés anti-angiogéniques (endostatine, thrombospondine 1 et CXCL4) [32–34] sont up-régulés chez les patients sclérodermiques. De même, Manetti et al. ont rapporté un switch d'isoforme du VEGF pro angiogénique (VEGF165) vers un isoforme anti-angiogénique ($VEGF_{165}b$) [35]. Il a également été proposé que la capacité de néovascularisation des progéniteurs endothéliaux issus de patients atteints de ScS soit diminuée, participant ainsi au déficit de la vasculogenèse compensatoire [36–40].

Une autre hypothèse est que les progéniteurs endothéliaux, une fois recrutés sur le site vasculaire endommagé, sont exposés au TGFβ et se trans-différencient en myofibroblastes [41–43]. Ce phénomène de transition endothélio-mésenchymateuse, impliquant notamment les voies de signalisation TGFβ, Wnt, Notch, semble être une anomalie précoce et réversible dans la maladie qui pourrait contribuer à la fibrose tissulaire et fait actuellement l'objet d'études comme cible thérapeutique potentielle. Il existe donc une dysrégulation angiogénique majeure associée à la ScS.

La dysfonction endothéliale semble étroitement liée à la dysfonction fibroblastique et les anomalies microcirculatoires dans la ScS constituent le *primum movens* au développement de la fibrose.

2. Signaux pro-fibrosants

Les lésions fibrotiques, caractéristiques de la ScS, résultent d'une production excessive de Matrice ExtraCellulaire (MEC) par les fibroblastes du derme et/ou des organes touchés par la maladie. Cette MEC est constituée majoritairement de collagènes de type I, III et IV mais aussi de fibronectine, d'acide hyaluronique et de protéoglycanes. Les dépôts de composants de la MEC forment un tissu conjonctif épais et rigide qui détruit l'architecture du tissu. La fibrose peut toucher différents organes mais débute habituellement au niveau du derme profond de la peau.

Le fibroblaste, cellule clé des tissus conjonctifs, est à l'origine de cette hyperproduction de MEC. En effet, ils acquièrent un phénotype « myofibroblastique » exprimant l'alpha Smooth Muscle Actin (αSMA). Ce phénotype particulier augmente leur capacité proliférative, leur motilité et leur capacité à synthétiser le collagène [44,45].

De nombreux médiateurs contribuent à l'activation fibroblastique, toutefois le TGFβ est considéré comme le facteur régulateur central dans les processus de fibrose. En effet, on assiste à une activation permanente de la cascade du TGFβ au niveau des fibroblastes chez les patients sclérodermiques. Ceci est lié à la transcription autonome et dérégulée des gènes du procollagène et du Connective Tissue Growth Factor (CTGF), habituellement sous la dépendance du TGFβ. Ainsi l'accumulation de la forme phosphorylée de SMAD3, même en l'absence de TGFβ, dans les fibroblastes aboutit à la transcription du gène Collagène type I alpha 2 (COL1A2) [46]. C'est pourquoi le CTGF circulant, puisque corrélé à la sévérité de l'atteinte pulmonaire [47], a été envisagé comme biomarqueur dans la ScS.

D'autre part, il a été noté une surexpression des récepteurs au TGFβ type I et II à la surface des fibroblastes de patients sclérodermiques, ce qui pourrait accroitre leur sensibilité au TGFβ circulant activant de manière excessive cette voie et conduisant à une synthèse excessive de MEC [48,49]. Ainsi il n'y aurait pas une production excessive de TGFβ mais un dérèglement de sa synthèse et de ses récepteurs, qui favorisait une activation autocrine.

Parmi les autres molécules incriminées dans l'activation des fibroblastes, l'interleukine-4 (IL-4), cytokine produite par les lymphocytes Th-2, est trouvée en excès chez les patients sclérodermiques, où elle stimule la croissance fibroblastique et le dépôt tissulaire de MEC [50]. Cet effet passe en partie par la synthèse d'autres cytokines pro-fibrosantes telles que Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) par les fibroblastes, amplifiant le phénomène.

Une démonstration du rôle pathogène de l'IL-4 est également fournie par l'étude du modèle murin de ScS « tight skin » (Tsk1/+) où une activation constitutive de la voie de signalisation de l'IL-4 est montrée comme responsable de la fibrose, réversible après administration d'Ac anti-IL-4 [51]. Un excès de sérotonine est également observé dans la ScS, contribuant à la prolifération des fibroblastes et leur synthèse de collagène [52,53].

Un autre médiateur de l'activation fibroblastique dans la ScS pourrait être l'ET-1. Cette puissante molécule vasoactive, impliquée dans la physiopathologie de la ScS, a été montrée

comme participant à la transformation myofibroblastique, à la synthèse de collagène et à l'inhibition de Métalloprotéinases Matricielles (MMP) [54,55].

Les CE participent elles-aussi au développement de la fibrose dans la ScS *via* la sécrétion de TGFβ qui stimule la synthèse de collagène et la transition endothélio-mésenchymateuse. Ce phénomène a été décrit chez les patients sclérodermiques par Manetti et al. et se manifeste par l'expression de marqueurs myofibroblastiques à la surface des CE (αSMA, collagène type I) et l'acquisition d'un phénotype contractile [41].

Il a également été montré dans la ScS la présence d'Ac anti-Platelet Derived Growth Factor-Récepteur (PDGF-R), capables d'activer la voie du PDGF, entraînant une différenciation myofibroblastique et la synthèse excessive des collagènes de la MEC [56]. Enfin, on note dans la ScS, une perte de l'expression de micro-ARN régulant la production de collagène par les fibroblastes tels que mir-29a, mir-150 et mir-let7a [57–59].

Globalement, l'activation de fibroblastes de patients sclérodermiques aboutit à une transdifférenciation en myofibroblastes, responsables d'une synthèse excessive et incontrôlable de composants de la MEC et de molécules pro-fibrosantes (TGFβ, MCP-1, CTGF) responsables du développement des lésions de fibrose.

3. Désordes immunitaires

Au cours de la ScS, des anomalies de l'immunité innée et adaptative sont constatées et sont à l'origine d'un infiltrat inflammatoire polymorphe mais également de la production d'auto-Ac propres à la maladie.

Il a été démontré que la peau des patients présentant une ScS débutante se caractérise par un infiltrat de monocytes et macrophages [60,61]. Cet infiltrat est la conséquence de l'activation de l'immunité innée par la libération de signaux de dangers appelés Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) [62].

Le rôle des mastocytes a également été suggéré, car ils pourraient être à l'origine de la production d'histamine et d'IL-4, cytokines pro-fibrosantes [63]. Les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes issues de cette première phase de stimulation du système

immunitaire font le lien avec l'immunité adaptative, activant à leur tour les lymphocytes T et B. Ainsi, des lymphocytes T CD4+ activés se retrouvent précocement au contact de fibroblastes dermiques et auraient un rôle dans l'activation de ces derniers [64]. Ceci est particulièrement associé aux formes rapidement évolutives de ScS avec un score de Rodnan élevé.

Concernant le profil cytokinique associé à cet infiltrat lymphocytaire tissulaire, il semble plutôt orienté vers un profil Th-2, avec notamment une sécrétion d'IL-4, IL-13 et IL-10 capables de stimuler la synthèse de collagène, de manière directe en activant la transcription de COL1A2 ou *via* l'activation de la voie TGFβ [65]. L'orientation vers un profil Th-2 a été confirmé avec l'observation de taux circulants élevés d'IL-4 et d'IL-13 dans le sérum des patients [62]. Un tel profil favorise la production d'auto-Ac par les lymphocytes B [62]. Toutefois, une balance Th-1 prédominante a aussi été décrite, notamment au sein des cellules mononuclées circulantes [66]. Il semblerait que le profil de sécrétion cytokinique Th-1/Th-2 soit donc variable dans la ScS [65,67].

Le rôle de l'immunité adaptive dans la pathogénèse de la maladie est indéniable puisque la majorité des patients atteints de ScS ont des auto-Ac détectables dans le sérum, certains ayant pour cible des cellules (fibroblastes et cellules endothéliales) ou molécules clés (PDGF-R, l'ET-1, le VEGF, la fibrilline, les MMP) dans le développement de la maladie [68]. Cependant, le rôle pathogène des lymphocytes B ou des auto-Ac n'a, à ce jour, pas été démontré dans la ScS.

Par ailleurs, des taux anormalement élevés de B-cell activating factor (BAFF) ont aussi été observés dans la ScS et semblent corrélés à la sévérité de l'atteinte cutanée [69]. En outre, les lymphocytes B activés produisent de grandes quantités d'IL-6, cytokine pro-inflammatoire, capable d'activer les myofibroblastes et d'induire également la production de collagène [70]. Cette cytokine pourrait constituer une cible thérapeutique dans la ScS [71]. Les lymphocytes B sont également à l'origine d'une production excessive de TGF-β, amplifiant la synthèse excessive de MEC par les fibroblastes activés [72]. Les mécanismes conduisant à l'exposition d'antigènes cibles et à la rupture de tolérance à l'origine de la production d'auto-Ac restent la partie à élucider.

III. Diagnostic et classification

La ScS se caractérise par une grande hétérogénéité dans son expression clinique, son évolution et par voie de conséquence, son pronostic. Plusieurs classifications ont été proposées. Historiquement, la classification de référence est celle de l'American College of Rheumatology (ACR) datant de 1980 (Table 1) dont les critères présentent une bonne spécificité (98%) mais manquent de sensibilité (34% dans les formes limitées) [73].

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

Table 1 : Critères diagnostiques de la ScS selon l'ACR définis en 1980

En 1988, Leroy et al. [74] ont individualisé deux principales catégories de ScS sur la base de l'extension de la fibrose (Figure 2) :

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

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

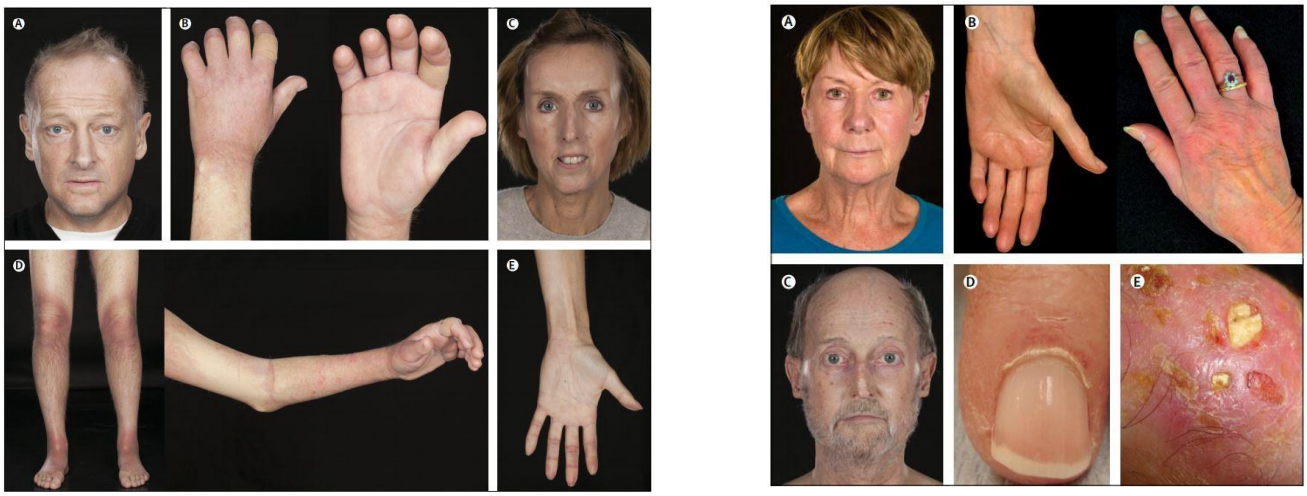


Figure 2 : Formes cutanées diffuses (à gauche) et limitées (à droite) de ScS [75]

En 2001, Leroy et Medsger [76] ont proposé de nouveaux critères de classification pour les ScS en introduisant la notion de ScS sans atteinte cutanée. En effet, s'ajoutent à ces deux présentations principales (cutanées limitées et diffuses) des formes rares de ScS *sine scleroderma* caractérisées par la présence d'un phénomène de Raynaud et des anomalies capillaroscopiques, sans aucune lésion de sclérose cutanée. Ces formes représentent moins de 5% des malades. (Figure 3).

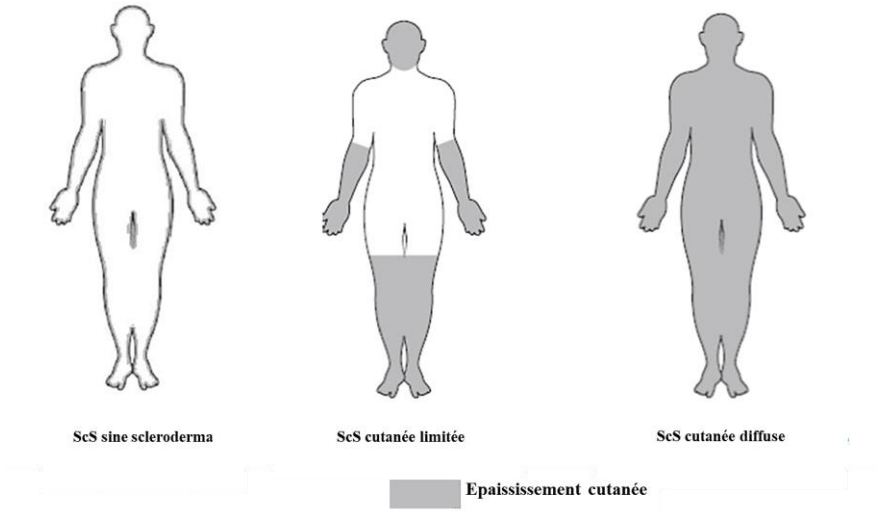


Figure 3 : Formes cliniques de ScS selon Leroy et Medsger, 2001 [76]

Enfin, de nouveaux critères de classification de la ScS ont été établis par l'European League Against Rheumatism (EULAR) et l'ACR en 2013 (Table 2) [77]. Ils apportent une meilleure sensibilité (91%) et une meilleure spécificité (92%) pour la classification des patients comparativement aux critères précédents. Le diagnostic de ScS repose, à ce jour, sur des critères cliniques, immunologiques et paracliniques et toute suspicion clinique de ScS doit donner lieu à une recherche d'Ac antinucléaires et à la réalisation d'une capillaroscopie.

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

Table 2 : Critères de classification ACR/EULAR de la Sclérodermie Systémique en 2013

** Le critère peut être retenu s'il est présent à un moment de l'histoire clinique*
*** Le poids de chaque item présent doit être additionné pour obtenir un score total. Un score supérieur ou égal à 9 classe les patients comme atteints de ScS.*

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

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

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

- Ac anti-centromères (20 à 40%)
- Ac anti-topoisomérase1 (anti-Scl70) (20 à 30%)
- Ac anti-ARN polymérase III, associés à un risque élevé de CRS (5 à 25% selon ethnie)
- Ac anti-Fibrillarine (4 à 10%)
- Ac anti-Th/To (2 à 5%)
- Ac anti PM-Scl, Ac anti-Ku ; qui sont les Ac classiques des syndromes de chevauchement ScS-myosite (2%)

Les deux AAN les plus fréquents sont les anti-centromères et les anti-Scl70, et concernent au total 80% des patients [68,78]. Les Ac de type anti-centromères, détectés chez 40% des patients sont surtout retrouvés dans les formes cutanées limitées [79]. Les Ac anti topo-isomérase de type 1 (ou anti Scl70) sont préférentiellement associées aux formes cutanées diffuses [78].

Les Ac anti-ARN polymérase de type III, concernant environ 15% des malades, sont associés à la survenue d'une crise rénale sclérodermique et au développement de cancers [80].

De nombreux auto-Ac non spécifiques ont été décrits. Ils ciblent les fibroblastes, les CE, les MMP-1 et -3, et le PDGF-R.

Par ailleurs, la ScS est associée à une autre maladie auto-immune dans 25% des cas.

La capillaroscopie péri-unguéale est un examen non invasif et indolore, qui permet une étude morphologique et dynamique des capillaires au lit de l'ongle. Elle doit être réalisée au moins une fois devant tout phénomène de Raynaud atypique pour rechercher une microangiopathie

organique et permettre un diagnostic précoce de la ScS. Seule la présence de mégacapillaires et la raréfaction capillaire sont des éléments caractéristiques de la ScS.

D'autres examens complémentaires permettent d'identifier les complications viscérales et de préciser le pronostic du patient : la réalisation d'une imagerie thoracique et d'une Exploration Fonctionnelle Respiratoire (EFR) avec étude de la capacité de diffusion de monoxyde de carbone (DLCO) est indispensable pour rechercher une atteinte pulmonaire de la ScS et une Echocardiographie Trans-Thoracique (ETT) permettra un dépistage de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP). Enfin, une manométrie œsophagienne et une fibroscopie œsogastroduodénale seront réalisées en cas de manifestations digestives.

IV. Symptomatologie

Le diagnostic doit être évoqué devant l'association de plusieurs critères définis dans la classification ACR/EULAR (Table 2). Les manifestations cliniques sont très variées et résultent d'une atteinte mixte, à la fois vasculaire et fibrotique. Classiquement on retrouve des atteintes cutanées responsables d'un handicap fonctionnel important et des complications viscérales (cardiaques, pulmonaires, rénales) pouvant mettre en jeu le pronostic vital.

A. Atteinte cutanée

Au cours de cette maladie, l'épaississement cutané est souvent très marqué au niveau des mains des patients. Ces atteintes cutanées sont à l'origine d'une impotence fonctionnelle et d'une altération de la qualité de vie, justifiant une attention toute particulière. Schématiquement, l'atteinte de la main peut être la conséquence de phénomènes d'origine vasculaire (ischémie) et fibrosants (sclérose cutanée des doigts et du dos des mains).

Le phénomène de Raynaud est quasi constant (plus de 95% des patients sclérodermiques) et peut précéder de quelques mois à quelques années la maladie. Il est la conséquence d'un vasospasme des artères distales après exposition au froid, entraînant une diminution du débit sanguin et un accès paroxystique douloureux. Cette manifestation n'est pas spécifique de la ScS. Il peut conduire à des Ulcères Digitaux (UD), perte de substance très douloureuse, pouvant se surinfecter et/ou conduire à une gangrène. Près de la moitié des patients atteints de ScS développeront au moins un UD.

Dans un délai variable par rapport au phénomène de Raynaud, des lésions de **sclérose cutanée** surviennent. Il peut s'agir d'une sclérose localisée intéressant seulement les doigts ou les pieds des patients ou pouvant s'étendre au dos des mains et éventuellement au-delà vers la racine du membre supérieur. Les formes cutanées diffuses sont caractérisées par une atteinte scléreuse remontant au-dessus des coudes ou des genoux. Ces lésions induisent une rétraction progressive des doigts en flexion (sclérodactylie) et peuvent également se compliquer de fissurations spontanées ou traumatiques au niveau des faces d'extension des articulations des doigts. Le score de Rodnan modifié (mRSS), sur 51 points, permet d'évaluer l'extension de la sclérose cutanée (Figure 4). Il est validé comme outil pronostique et critère intermédiaire de jugement au cours de la forme cutanée diffuse.

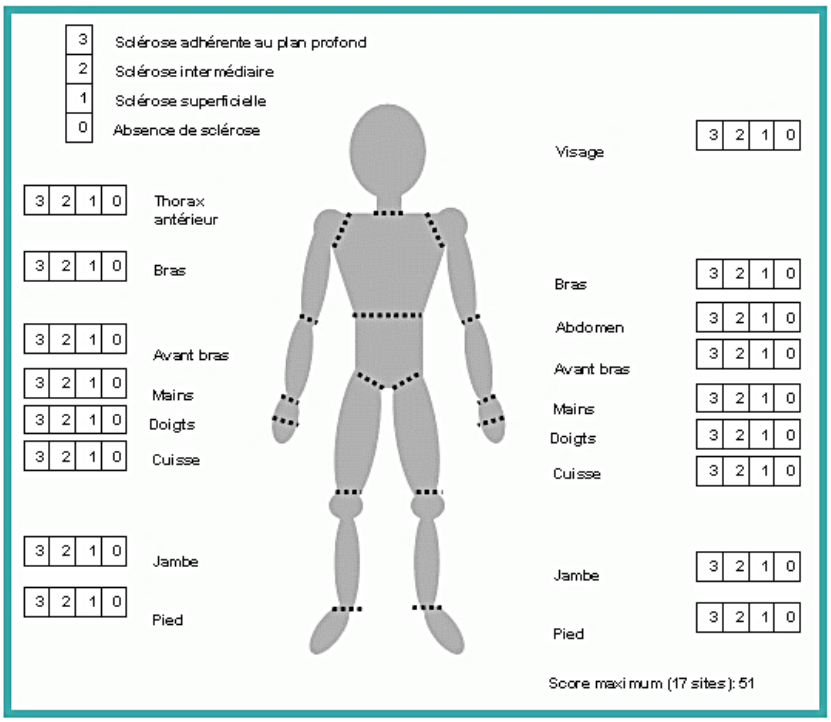


Figure 4 : Score de Rodnan modifié

La **calcinose sous-cutanée** est une atteinte caractérisée par des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite dans les tissus mous sous-cutanés. Elle touche environ 25% des patients sclérodermiques et l'importance de la calcinose augmente avec la sévérité de la ScS, la durée de la maladie et la gravité de l'atteinte cutanée. Les lésions de calcinose siègent le plus souvent aux extrémités des doigts, sur les avants bras et faces antérieures des genoux. La physiopathologie est encore mal comprise ; il n'existe pas d'anomalie du bilan

phosphocalcique pouvant expliquer la formation de calcifications. Une atteinte préférentielle de la main dominante et des zones exposées aux microtraumatismes évoque l'hypothèse de l'intervention de facteurs tissulaires locaux. Des UD d'origine mécanique peuvent apparaître en regard d'une calcinose ou d'un relief osseux. Quelquefois, des phénomènes d'érosion des extrémités des doigts, appelés **ostéolyse acrale**, peuvent survenir, à l'origine d'un raccourcissement de la dernière phalange et un raccourcissement de la longueur des doigts.

En conclusion, les lésions de sclérose, d'ischémie et la calcinose sont associées à un syndrome douloureux et à un handicap fonctionnel de la main des patients (Figure 5). Ce handicap participe à 75% au handicap global de la maladie [75,81] .



Figure 5 : Différents aspects cliniques du handicap de la main sclérodermique [82]

B. Atteinte oro-faciale

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

C. Atteinte pulmonaire

L'atteinte pulmonaire concerne plus de 50% des patients sclérodermiques (jusqu'à 80% selon les études) et représente la première cause de décès. Parmi les complications pulmonaires, on retrouve la **Pneumopathie Interstitielle Diffuse** (PID), pneumopathie fibrosante survenant suite à un excès de production de collagène au niveau des poumons (atteinte parenchymateuse). Elle empêche la diffusion de l'oxygène entre les alvéoles et les vaisseaux sanguins et se manifeste par une toux sèche persistante, une dyspnée d'effort et dans les formes avancées, une insuffisance respiratoire chronique. Les atteintes parenchymateuses surviennent plus fréquemment au cours des formes diffuses [75], a fortiori lorsque des Ac anti-Scl-70 sont présents, mais peuvent également être observées chez les patients ayant une forme cutanée limitée.

La PID est le plus souvent lentement évolutive mais un peu plus de 12% des patients évoluent vers l'insuffisance respiratoire terminale. Bien que l'évolution de cette fibrose soit imprévisible, l'évolutivité de l'atteinte pulmonaire est surtout observée au début de la maladie, justifiant une surveillance rapprochée durant les 5 premières années suivant le diagnostic [75]. La sévérité de la fibrose pulmonaire est donc naturellement associée à un pronostic péjoratif de la ScS [83–85].

L'**HTAP** doit être systématiquement évoquée devant une asthénie, des palpitations et des signes d'insuffisance cardiaque droite (œdèmes des membres inférieurs, turgescence jugulaire…). Elle concerne environ 10% des patients et résulte d'anomalies du remodelage vasculaire, avec une incidence de l'ordre de 0,61 pour 100 patients par année [86]. Compte-tenue de la gravité de l'HTAP, un dépistage systématique par une ETT est justifié, au minimum une fois par an [75,86,87].

D. Atteinte cardiaque

D'après une revue publiée dans le Lancet en 2017 [75], les atteintes cardiaques associées à la ScS seraient largement sous-estimées[198]. Ainsi, une fibrose myocardique sans retentissement clinique concernerait 70% des patients [88] et des troubles de la microcirculation myocardique ont été identifiés chez 80% des patients sclérodermiques.

En cas de doute sur une atteinte cardiaque, une IRM cardiaque est indiquée et une insuffisance cardiaque droite doit être soupçonnée lors de dyspnées, douleurs thoraciques et/ou d'œdèmes des membres inférieurs.

E. Atteinte rénale

La **Crise Rénale aiguë Sclérodermique** (CRS) est une complication rare, d'origine vasculaire et redoutable qui concerne 5% des malades. Elle se définie par le développement d'une microangiopathie thrombotique. Plusieurs facteurs prédictifs de la survenue de cette complication sévère de la ScS ont été identifiés : la présence d'une forme cutanée diffuse, la progression rapide de l'atteinte cutanée, un évènement cardiaque récent, une anémie récente, l'identification d'Ac anti-ARN polymérase III, l'utilisation préalable de corticoïdes à forte dose ou de ciclosporine dans les trois mois précédents la CRS [89,90].

Le diagnostic de CRS doit être évoqué devant une augmentation de la tension artérielle, la survenue d'œdèmes des membres inférieurs ou une protéinurie.

F. Atteinte digestive

La plupart des patients sclérodermiques (plus de 90%) sont handicapés par des troubles digestifs, de sévérité et manifestation clinique variables [91]. L'ensemble du tractus digestif peut être concerné, de la cavité buccale jusqu'au rectum. L'atteinte **œsophagienne**, fréquente et précoce, se manifeste principalement par une dysphagie, des douleurs rétrosternales et/ou des Reflux Gastro-Oesophagiens (RGO). Une gastroparésie, présente chez 10 à 75% des patients sclérodermiques, se révèle par un syndrome dyspeptique, une sensation de satiété précoce, des nausées, et occasionnellement par une intolérance alimentaire totale [92].

L'atteinte de l'intestin grêle, caractérisée par une hypomotilité intestinale chez 88% des patients ScS, est responsable de Pseudo-Occlusion Intestinale Chronique (POIC) et est à l'origine d'une pullulation microbienne intestinale pouvant conduire à un syndrome de malabsorption digestive et à une dénutrition.

L'atteinte colique est présente chez 10 à 50% des patients sclérodermiques [92]. Elle entraîne constipation, fausses diarrhées, météorisme abdominal et syndrome occlusif. Enfin, l'atteinte sphinctérienne ano-rectale se caractérise par une incontinence anale et/ou par un prolapsus rectal.

L'atteinte de l'appareil digestif est responsable de troubles nutritionnels, aggravant encore le pronostic global de la maladie [93,94]. Le recours à la nutrition artificielle, le plus souvent parentérale, est fréquent [95–97].

G. Atteinte de l'appareil locomoteur

La plupart des patients sclérodermiques (40 à 80% des patients) et plus particulièrement les formes cutanées diffuses sont touchés par des douleurs musculo-squelettiques [98]. Leur origine peut être pûrement mécanique ou inflammatoire. La mise en tension des gaines tendineuses touchées par le processus de fibrose peut aboutir à une rétraction irréductible des doigts.

Les arthralgies inflammatoires sont également possibles, bien que les véritables arthrites soient rares, devant faire suspecter un syndrome de chevauchement. Les atteintes musculaires sont également de manifestions variables : de simples myalgies à un déficit moteur proximal.

La Figure 6 présente une vue d'ensemble des principales complications de la ScS.

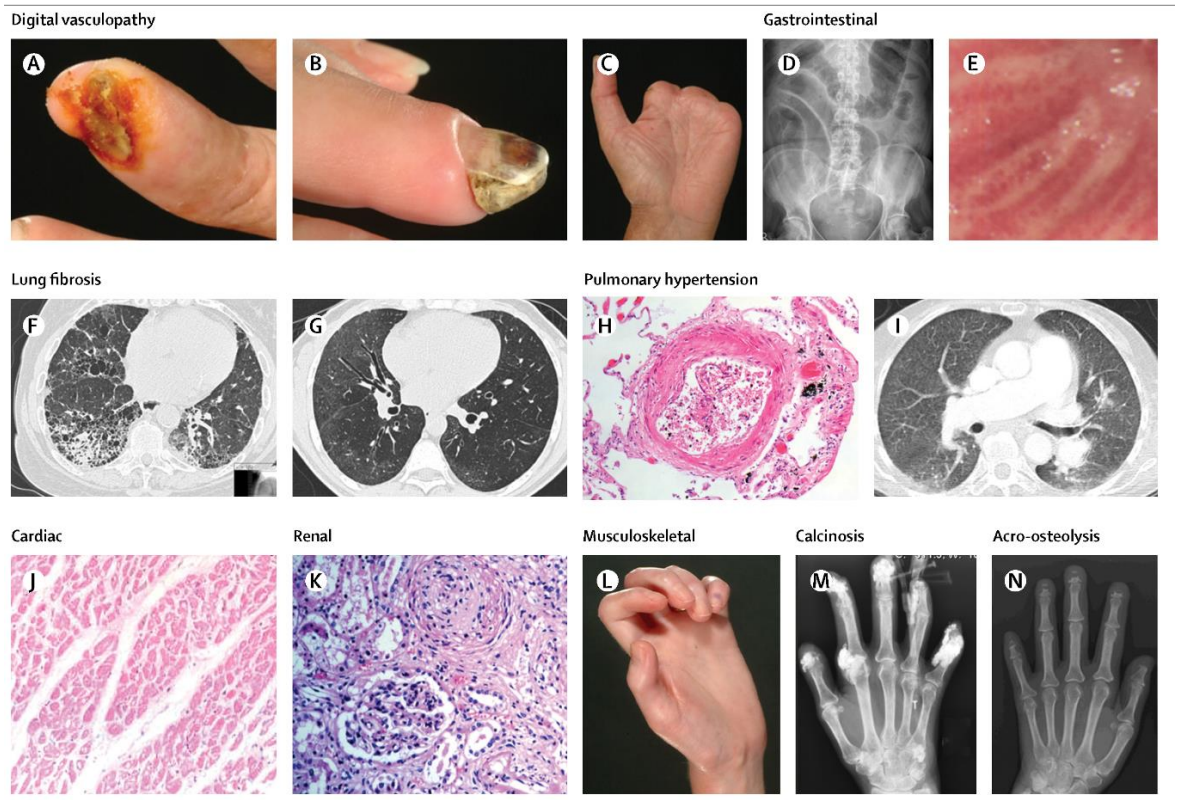


Figure 6 : Principales complications associées à la ScS [75]

V. Evolution et pronostic

Les ScS ont une évolution très différente selon qu'elles sont de forme cutanée limitée ou diffuse. Elle est responsable d'une réduction significative de la survie et le pronostic est globalement moins bon pour les formes cutanées diffuses que pour les formes cutanées limitées avec moins de 50% de survie à 10 ans contre 75% respectivement [83]. Les autres facteurs associés au risque de décès sont l'âge avancé au diagnostic, le sexe masculin et les atteintes viscérales.

C'est principalement l'atteinte pulmonaire qui conditionne le pronostic avec une survie à 5 ans supérieure à 90% en l'absence de PID contre 70% en présence de PID [99]. Également, la progression vasculaire pèse fortement sur le pronostic et a un rôle clé dans les complications viscérales telles que l'HTAP, la CRS, la myocardiopathie ou les ulcères digitaux.

Les auto-Ac ont également une valeur pronostique, et notamment les Ac anti-ARN polymérase III, avec une survie à 10 ans de 30% chez ces patients (93% pour anti-centromères et 66% pour anti-scl70).

Les ScS cutanées diffuses sont définies par des lésions cutanées rapidement évolutives, d'extension maximale en 1 à 5 ans après apparition du premier signe clinique en dehors du phénomène de Raynaud. Dans ces formes, les complications viscérales apparaissent dans les 3 à 5 ans et se manifestent par des atteintes musculaires, digestives, rénales (CRS), pulmonaires (PID) ou cardiaques. On observe plus rarement des manifestations viscérales en ce qui concerne les formes cutanées limitées, bien qu'elles puissent se compliquer d'HTAP et de manifestations digestives sévères.

La gravité de ces atteintes viscérales justifie leur recherche systématique et répétée par un interrogatoire dirigé, un examen clinique poussé et des analyses complémentaires, et ce même en l'absence de symptomatologie évocatrice pour certaines d'entre-elles comme l'HTAP et la PID. En effet, leur prise en charge thérapeutique précoce est un facteur déterminant pour la survie des patients.

Tout ceci justifice un suivi dans un centre expert, au minimum annuel et adapté selon le type de complications.

VI. Traitements

L'absence de traitement global agissant simultanément sur chacun des différents mécanismes pathogéniques de la ScS rend la prise en charge thérapeutique particulièrement difficile. Les approches thérapeutiques sont donc principalement symptomatiques afin de pallier les complications les plus graves. Les thérapeutiques actuelles comportent trois objectifs principaux :

- limiter ou arrêter la progression de la maladie ;
- réduire ses séquelles ;
- améliorer la qualité de vie des patients par une prise en charge du handicap.

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

A. Traitements symptomatiques

1. Phénomène de Raynaud

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

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

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

2. Ulcères digitaux et calcinoses

Le traitement des ulcérations digitales est d'abord préventif (hygiène cutanée et unguéale, protection des doigts, soins locaux en cas de plaies, arrêt du tabac) mais certaines molécules peuvent être utilisées en cas d'ulcérations actives telles que l'iloprost et le sildénafil. Le bosentan (antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline) est quant à lui prescrit à visée préventive en cas de maladie ulcéreuse digitale sévère récidivante.

Une détersion mécanique (voire chirurgicale) peut être nécessaire dans les formes les plus graves.

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

3. Manifestations digestives

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

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

4. Crise rénale sclérodermique

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

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

Enfin, comme mentionné dans les paragraphes ci-dessus, il est capital de limiter la prescription de glucocorticoïdes et de ne pas dépasser 15mg/jour d'équivalent prednisone.

5. HTAP

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

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

6. Arthromyalgies

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

Malheureusement, ces traitements symptomatiques ne stoppent pas l'évolution de la maladie et certains patients évolueront vers une défaillance d'organes où seule la transplantation de l'organe concerné permettra de prolonger la survie.

Enfin, des thérapeutiques non pharmacologiques comme la rééducation fonctionnelle peuvent réduire le handicap associé à la ScS, mais leur efficacité est fortement dépendante de l'adhésion du patient au traitement.

B. Traitements immunomodulateurs

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

L'utilisation de faibles doses de prednisone (≤ 15 mg/j) apporte un bénéfice incontestable dans les ScS cutanées œdémateuses mais elle ne fait pas l'objet de consensus et nécessite une bonne évaluation du rapport bénéfices/risques avec notamment le risque de précipiter une CRS. Une surveillance étroite de la pression artérielle et de la fonction rénale est par ailleurs

nécessaire. La corticothérapie peut cependant gêner la cicatrisation d'un trouble trophique digital.

Les traitements immunomodulateurs conventionnels tels que le methotrexate ou le Mycophénolate Mofétil (MMF) peuvent être proposés pour limiter l'extension de la fibrose cutanée ou certaines complications articulaires sévères [100,101].

Dans les formes cutanées graves d'emblée, le MMF et le cyclophosphamide (Cy) peuvent être utilisés [102]. Une étude a récemment démontré la supériorité du rituximab (Ac monoclonal anti CD-20) dans la prise en charge de la PID en comparaison au Cy [103]. À ce jour, aucun traitement de fond anti-fibrosant ou immunosuppresseur seul n'a permis d'obtenir une amélioration de la survie dans une étude prospective randomisée.

C. Biothérapies et traitements à l'essai

Au cours de la dernière décennie, de nouveaux mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la ScS ont été découverts offrant de nouvelles perspectives (Figure 7).

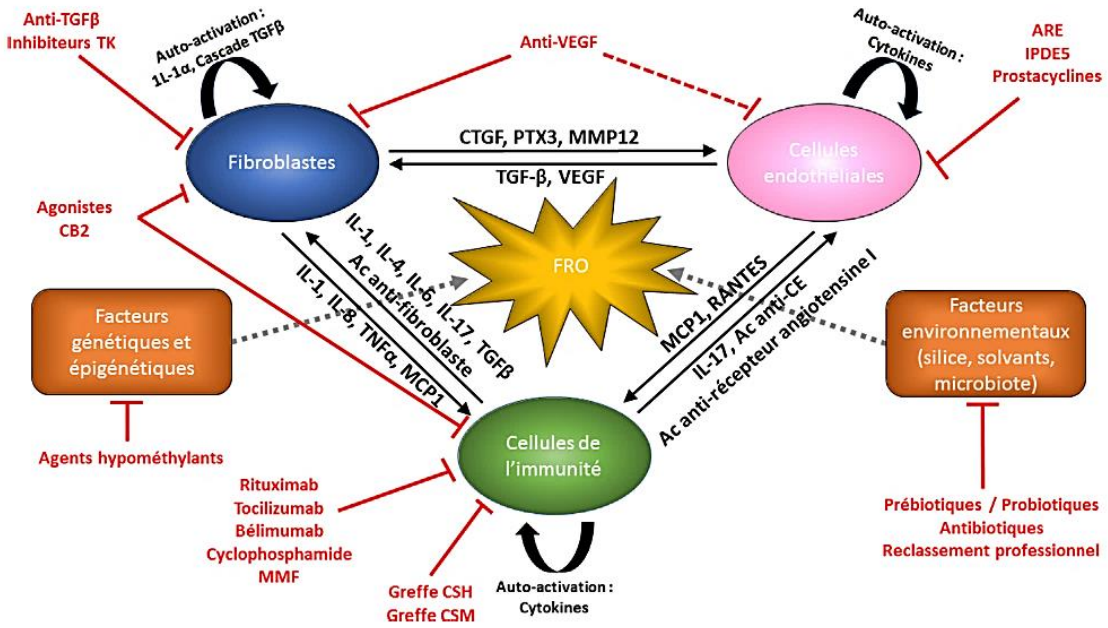


Figure 7 : Impact des différentes approches thérapeutiques actuelles et en cours de développement dans la ScS [104] .

Le rationnel sous-tendant l'utilisation des thérapies anti-TNFα chez les patients sclérodermiques repose sur la présence d'un infiltrat cutané inflammatoire dans les stades précoces de forme cutanée diffuse mais l'efficacité de ces molécules reste à ce jour controversée. En effet, en 2011, un groupe d'experts du consensus EULAR ne recommandait pas l'emploi des anti-TNFα en routine dans le traitement de la ScS mais suggérait que ces traitements pourraient être une alternative thérapeutique dans la prise en charge des manifestations arthritiques associées à la ScS [105].

L'abatacept est une protéine de fusion recombinante soluble qui inhibe l'activation des cellules T en se liant spécifiquement au CD80 et CD86. Les résultats préliminaires concernant cette molécule sont également discordants. Un essai contrôlé randomisé de phase II teste actuellement l'efficacité de l'abatacept par voie sous-cutanée contre placebo (essai ASSET, NCT 02161406).

Par ailleurs, plusieurs Ac monoclonaux ont fait l'objet d'études dans la ScS. Deux essais randomisés avec le rituximab sont actuellement en cours chez les patients sclérodermiques avec HTAP (NCT : 01086540) ou atteinte articulaire (NCT : 01748084).

La surexpression de l'IL-6 dans le sang et la peau des patients sclérodermiques ont motivé l'évaluation du tocilizumab (Ac monoclonal anti–IL6 Récepteur) dans la ScS. Un essai de phase II randomisé contre placebo en double aveugle testant l'efficacité du tocilizumab chez 87 patients sclérodermiques (essai faSScinate, NCT : 01532869) a rapporté des résultats encourageants sur la réduction de l'épaisseur cutanée et l'amélioration de la fonction pulmonaire [106]. Un essai de phase III sur une plus large cohorte est actuellement en cours (NCT 02453256) pour valider cette indication.

Enfin un essai randomisé associant le belimumab (Ac anti-BAFF) et le MMF a mis en évidence un bénéfice de cette association sur la réduction du mRSS chez tous les participants sans différence significative entre les deux bras (MMF seul et MMF + belimumab). Aussi, une étude pilote ouverte objective une amélioration rapide de la fibrose cutanée dans les formes rapidement progressives avec le fresolimumab (Ac anti-TGFβ) [107]. Les antagonistes du (ou des) récepteur(s) à l'ET-1 (bosentan, ambrisentan, macitentan) ont déjà fait leur preuve dans le traitement des ulcères digitaux (bosentan) et sont actuellement à l'essai dans d'autres manifestations associées à la ScS (HTAP, CRS).

Le selexipag (agoniste sélectif du récepteur de la prostaglandine I2 (PGI2)) est indiqué dans l'HTAP, toute étiologie confondue, mais n'a pas montré d'efficacité dans la réduction des crises de Raynaud chez les patients sclérodermiques [108]. Il a été objectivé un effet préventif sur la survenue de fibrose de l'anabasum, un agoniste des Cannabinoid receptor 2 (CB2) dans un modèle murin de ScS ; cette molécule est en cours d'étude chez l'homme [109].

Un essai de phase III randomisé contre placébo en double aveugle, publié dans le *New England Journal of Medicine* en juin 2019 [110] retrouve un bénéfice significatif du nintedanib sur la capacité vitale forcée comparé au placebo sans autre impact sur les manifestations cliniques associées à la ScS. Cet inhibiteur des tyrosines kinases ciblant les récepteurs du PDGF, VEGF et du Fibroblast Growth Factor (FGF) déjà indiqué dans la fibrose pulmonaire idiopathique semble prometteur dans la prise en charge de la fibrose pulmonaire idiopathique chez les patients sclérodermiques.

Enfin le riociguat, stimulateur de la guanylate cyclase déjà indiqué dans certaines formes d'HTAP, semble avoir un effet bénéfique sur la fibrose [111].

Bien que de nombreuses molécules émergent ou sont à l'essai dans la prise en charge de la ScS, aucune de ces thérapies n'a pu démontrer un bénéfice significatif sur les manifestations fibrotiques associées à la ScS. La régression de la fibrose, voire même l'arrêt de progression, représente donc un véritable challenge qu'aucune des molécules actuellement disponibles dans l'arsenal thérapeutique de la ScS n'a relevé jusqu'ici.

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

PARTIE 2 :

THÉRAPIES CELLULAIRES APPLIQUÉES À LA SCLÉRODERMIE SYSTÉMIQUE

I. La thérapie cellulaire

A. Définition

Hippocrate, il y a près de 2000 ans, estimait que « le corps contient en lui-même le pouvoir de rééquilibrer les humeurs et de se guérir lui-même ». On peut considérer qu'il s'agissait de la première définition de la thérapie cellulaire.

Selon le code de la santé publique, « la thérapie cellulaire concerne les produits biologiques à effet thérapeutique issus de préparation de cellules vivantes humaines ou animales » (article L. 1243-1 du CSP). La thérapie cellulaire est une discipline par laquelle on peut prévenir, traiter ou atténuer une maladie ou encore réparer un tissu lésé par l'injection de cellules humaines [112]. Dans la majorité des cas, la thérapie cellulaire repose sur l'utilisation de Cellules Souches (CS), terme apparu dès 1883.

Les CS sont des cellules dites « immatures » et « indifférenciées ». Elles se caractérisent par deux propriétés essentielles : (i) leur capacité de différenciation en cellules ou organes spécialisés dans un environnement donné et (ii) leur propriété d'auto-renouvellement. Ainsi les CS peuvent se diviser de façon « symétrique » donnant naissance à deux cellules indifférenciées, ou bien de façon « asymétrique », générant une cellule plus spécialisée.

Bien que de nombreuses options thérapeutiques reposant sur l'emploi de CS soient actuellement en cours d'investigation, certaines indications sont d'ores et déjà autorisées par les autorités de santé. Parmi les plus courantes :

- l'utilisation de CS cutanées pour reconstituer des feuillets d'épiderme en laboratoire et les greffer chez des grands brulés (depuis les années 1970);
- l'administration de CS Hématopoïétiques (CSH) dans le traitement d'hémopathies malignes depuis les années 80 et plus récemment dans les maladies auto-immunes;
- au Canada, la perfusion de CSM allogéniques, autorisée dans la prise en charge de la maladie du greffon contre (ou Graft versus Host Disease (GvHD)) chez l'enfant;
- en Corée, l'injection de CS Mésenchymateuses (CSM) allogéniques, indiquée dans l'arthrose depuis 2013.

B. Classification des cellules souches

Nous proposons ici une classification fonctionnelle des CS qui repose sur le potentiel de différenciation des cellules (Figure 8). D'autres classifications existentent, basées sur l'origine des CS ou encore sur leur statut réglementaire.

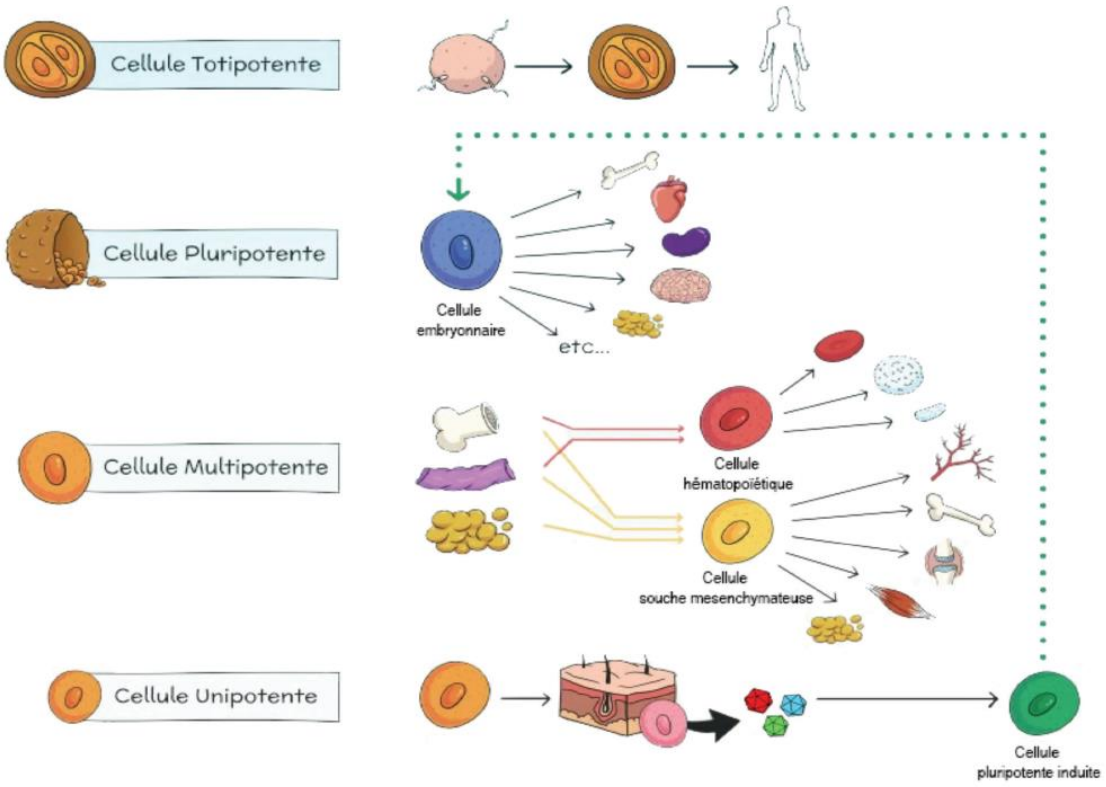


Figure 8 : Classification fonctionnelle des CS : de la totipotence à l'unipotence [112]

1. CS totipontentes

Étymologiquement, totipotence signifie « tout pouvoir », indiquant que les CS totipotentes sont définies par leur capacité à donner un organisme entier. Le zygote (également appelé œuf fécondé) et les cellules issues des premières divisions (stade morula), appelées blastomères, sont les seules cellules totipotentes de l'organisme. Pour des raisons éthiques, ces cellules ne peuvent pas être utilisées en recherche et encore moins à des fins thérapeutiques.

2. CS pluripotentes

Les CS pluripotentes ont la capacité de générer toutes les cellules spécialisées de l'organisme. Ainsi, elles peuvent se différencier en tous les types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) mais ne permet pas d'obtenir les annexes embryonnaires telles que le placenta.

a. CS embryonnaires

La découverte des CS Embryonnaires (CSE) humaines remonte à 1998 en Amérique par James Thomson [113] et a très vite suscité un fort engouement en médecine régénérative.

A partir du 5e jour de développement, l'embryon s'organise en territoires spécialisés : il s'agit du stade blastocyste. Les cellules qui formeront les tissus embryonnaires se regroupent pour former la masse interne du blastocyste au sein d'une cavité (blastocèle) bordée par une membrane externe, le trophoblaste (à l'origine des annexes embryonnaires).

Puis, lors du processus de gastrulation, les cellules de la masse interne du blastocyste se spécialisent et s'organisent en trois feuillets distincts : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme.

In vivo, la pluripotence des CSE n'existe que pendant une très courte durée (entre le 5e et 7e jour de développement) ; c'est pourquoi les chercheurs ont mis au point des lignées de CSE afin de pouvoir maintenir artificiellement cette pluripotence et ainsi développer des applications thérapeutiques.

En France, la création d'embryons à des fins de recherche est interdite par la loi. Les CSE proviennent donc d'embryons surnuméraires créés dans le cadre d'une fécondation *in vitro* et ne faisant plus l'objet d'un projet parental. En pratique, les cellules de la masse interne du blastocyste sont extraites puis mises en co-culture avec des cellules nourricières (fibroblastes) dans un milieu de culture riche en facteurs de croissance.

Ces cellules peuvent se différencier en plus de 200 types de cellules et sont caractérisées par différents marqueurs de surface (SSEA3 et SSEA4) [113] et facteurs de transcription (Oct 4, Sox2, Nanog) [114]. Par ailleurs, lorsque les CSE sont injectées en sous cutanée chez la souris immunodéficiente, elles aboutissent à la formation de tumeurs bénignes, les tératomes [113].

Certains obstacles ont limité l'utilisation des CSE en clinique ; notamment le risque tumorigène (tératomes chez l'animal) et la nécessité de respecter la compatibilité HLA en cas d'usage allogénique, bien qu'elles paraissent faiblement immunogènes.

Enfin, le premier obstacle à l'utilisation des CSE humaines est d'ordre éthique ; notamment pour certains groupes qui considèrent l'extraction des CSE comme une atteinte à l'intégrité de l'embryon.

b. induced Pluripotent Stem cells

L'histoire commence il y a 50 ans, lorsqu'un chercheur britannique démontre, grâce à des expériences de transplantation nucléaire chez la grenouille, qu'une cellule différenciée adulte possède l'information génétique nécessaire au développement d'un organisme entier [115].

Quelques années plus tard, l'équipe japonaise dirigée par S. Yamanaka fait l'hypothèse audacieuse qu'une cellule différenciée pourrait revenir au stade de CS pluripotente grâce à la reprogrammation génétique. Il avait en effet remarqué que certains gènes étaient impliqués dans la pluripotence des cellules, il ne restait qu'à trouver la combinaison idéale.

En 2007, l'une d'elle a été fructueuse et repose sur l'utilisation de 4 gènes de pluripotence : Oct3/4, Sox2, c-Myc, et Klf4, également appelée « cocktail de Yamanaka » [116]. Ainsi sont nées les cellules pluripotentes induites, ou en anglais induced Pluripotent Stem cells (iPS). Ces découvertes révolutionnaires ont conduit le japonais S. Yamanaka et le britanique J. Gurdon à recevoir en 2012 le prix Nobel de médecine. Néanmoins, l'utilisation très récente des iPS pose encore un certain nombre de questions, notamment sur la persistance de certaines modifications épigénétiques après reprogrammation.

Il est légitime de se questionner sur le risque mutationnel associé à cette technique de génie génétique, et donc au risque potentiel d'emploi des cellules iPS en clinique chez l'homme. Pour l'utilisation de cellules iPS allogéniques, les chercheurs anticipent le problème de comptabilité HLA en créant des banques de cellules répertoriées selon leur typage HLA, de manière à obtenir des cellules thérapeutiques avec le profil des patients receveurs. Ce travail est mis en œuvre *via* des collaborations internationales et coordonné par l'alliance GAIT (Global Alliance for iPS Therapy).

3. CS multipotentes

Les CS multipotentes ont une capacité de différenciation plus restreinte que les CS pluripotentes. Elles peuvent donner naissance à divers types cellulaires mais sont le plus souvent déjà engagées dans un lignage donné.

Ces cellules sont présentes à l'état indifférencié dans la plupart des tissus dont elles assurent l'homéostasie tout au long de la vie. On developpera dans ce travail les CS mésenchymateuses (CSM) et les CS hématopoïétiques (CSH) qui représentent les principales CS multipotentes chez l'homme à l'âge adulte.

a. CS Mésenchymateuses

Les CS Mésenchymateuses (CSM) ont été identifiées et isolées pour la première fois par l'équipe d'A. Friedenstein dans les années 1970, qui a mis en évidence dans la moelle osseuse l'existence de progéniteurs non hématopoïétiques capables de former des colonies d'allure fibroblastique (Colony Forming Unit- Fibroblasts : CFU-F) [117].

Elles représentent environ 0,001% des cellules mononuclées médullaires mais cette faible densité être palliée par un fort potentiel prolifératif *in vitro*.

Les CSM conservent leur capacité d'auto-renouvellement mais ont également la capacité de s'engager dans les lignées cellulaires d'origine mésodermique telles que l'os, le cartilage, le tissu adipeux et le stroma médullaire [118].

Outre cette capacité de remplacement de cellules cibles par différenciation, le potentiel thérapeutique de ces cellules repose sur leur aptitude à sécréter un large panel de facteurs de croissances et cytokines qui leur confère un potentiel pro-angiogénique, trophique, immunomodulateur et anti-fibrosant. L'ensemble de ces propriétés sera développé dans la deuxième partie de ce travail.

Par ailleurs, elles ont l'avantage d'être facilement accessibles par prélèvement de moelle osseuse ou lipoaspiration du tissu adipeux et de ne nécessiter aucun traitement immunosuppresseur associé en cas d'usage allogénique.

b. CS Hématopoïétiques

Les CS Hématopoïétiques (CSH) sont le point de départ de l'hématopoïèse, qui a lieu, chez l'adulte au niveau de la moelle osseuse. Elles assurent une production continue des différentes lignées sanguines circulantes : leucocytes, hématies et plaquettes.

La capacité d'auto-renouvellement des CSH permet, à partir d'un stock limité de cellules, d'assurer l'hématopoïèse d'un individu tout au long de sa vie.

La France a été pionnière dans l'utilisation des CSH. Georges Mathé, en 1958, réalisait les premières greffes de moelles osseuses pour restaurer l'hématopoïèse de cinq physiciens yougoslaves très lourdement irradiés près d'un réacteur nucléaire à Vinca. La prise en charge de ces patients eut lieu en France, où le personnel du service servit lui-même de donneurs.

Cependant, les premières preuves expérimentales de l'existence de CSH remontent à 1961 avec les travaux de Till & Mc Culloch [119] qui ont mis en évidence des cellules auto-renouvelables dans la moelle osseuse de souris.

Ces cellules sont multipotentes, quiescentes, transplantables et peuvent être amplifiées *in vitro* en présence de facteurs de croissance hématopoïétiques.

Contrairement aux CSE, il est impossible de créer des lignées de CSH car leurs télomères se raccourcissent lors des divisions cellulaires.

Chez l'adulte, les CSH sont uniquement présentes au sein de la moelle osseuse dans les niches hématopoïétiques où elles cohabitent étroitement avec les CSM. Il est important de noter que les CSH peuvent être mobilisées dans le sang périphérique grâce à l'administration de rhG-CSF et plus récemment de plerixafor Mozobil® (antagoniste du récepteur CXCR4) qui permettent d'augmenter significativement la concentration de CSH circulantes.

Enfin, le sang de cordon constitue une source alternative de CSH. De nos jours, les CSH sont utilisées en routine dans le cadre d'autogreffes et d'allogreffes comme traitement ou support de traitement dans de nombreuses hémopathies.

4. CS unipotentes

Les CS unipotentes sont en mesure de ne fournir qu'un seul type cellulaire, mais sont capables d'auto-renouvellement. Ainsi, elles permettent le renouvellement permanent du tissu dans lequel elles résident.

Cependant, de par leur capacité de différenciation extrêmement limitée et leur isolement parfois difficile, les CS unipotentes offrent des perspectives thérapeutiques assez restreintes.

Actuellement, la principale utilisation de CS unipotentes repose sur l'emploi de feuillets épidermiques dans la prise en charge des grands brulés.

II. Les thérapies cellulaires appliquées à la ScS

Le traitement de la ScS repose actuellement sur l'utilisation combinée de traitements immunosuppresseurs et symptomatiques. En effet, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de la ScS et très peu d'approches thérapeutiques sont significativement efficaces pour réduire les lésions de fibrose (cutanées ou viscérales) associées à la maladie. Par ailleurs, l'emploi de traitements au long cours expose les patients à une forte toxicité, impactant directement la morbi-mortalité de la maladie. Le développement de thérapies innovantes efficaces et peu toxiques représente donc un enjeu majeur dans la prise en charge actuelle de la ScS.

Dans ce contexte, les injections systémiques par voie intraveineuse (IV) de CSH et CSM associées à des approches locales de médecine régénérative dérivées du Tissu Adipeux (TA) constituent des options prometteuses dans la prise en charge des patients atteints de ScS.

Nous proposons ici, une revue des différentes thérapies cellulaires disponibles ou à l'étude dans la prise en charge de la ScS avec, en premier lieu, les thérapies injectées par voie systémique à visée immunomodulatrice puis, dans une seconde partie, les approches locales, principalement dérivées du TA, destinées à la régénération tissulaire.

A. Thérapies cellulaires par voie systémique

1. Autogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques

L'autogreffe de CSH (auto-CSH) est la seule intervention thérapeutique ayant démontrée un bénéfice significatif sur la survie globale des patients atteints de formes sévères de ScS au cours des ces dernières années. Les premières données proviennent des registres rétrospectifs sur lesquels on notait un bénéfice de ce mode d'intervention sur l'évolution de la ScS chez des patients traités par ailleurs pour une hémopathie [120,121].

Par la suite, des essais cliniques randomisés dans les formes sévères de ScS ont montré une supériorité significative de la procédure d'autogreffe comparée aux thérapeutiques conventionnelles. Depuis, plus de 4500 procédures d'auto-CSH ont été réalisées dans le monde entier pour traiter des patients souffrant de pathologies auto-immunes sévères [122].

a. Rationnel mécanistique

L'efficaité de l'auto-CSH chez des patients souffrant de maladies auto-immunes telles que la ScS repose sur une abrogation non spécifique de l'auto-réactivité (reset immunologique), suivie de la reconstitution d'un système immunitaire « naïf », plus tolérant grâce à la réinjection des CSH [123,124]. Dans le cas idéal, les facteurs environnementaux déclencheurs de la ScS ne seront plus suffisamment présents pour activer la cascade pathogénique [125].

Certaines études ont montré un large spectre d'action de l'auto-CSH sur l'immunité contrairement aux traitements immunomodulateurs conventionnels qui ciblent spécifiquement certains acteurs de l'immunité [126].

- ***Reset immunologique***

Immédiatement après l'auto-CSH, de nombreuses cellules lymphoïdes et myéloïdes sont soit éliminées, soit déplétées en fonction de l'intensité du conditionnement ; puis un « nouveau » système immunitaire se développe à partir des cellules souches CD34+ réinjectées (Figure 9).

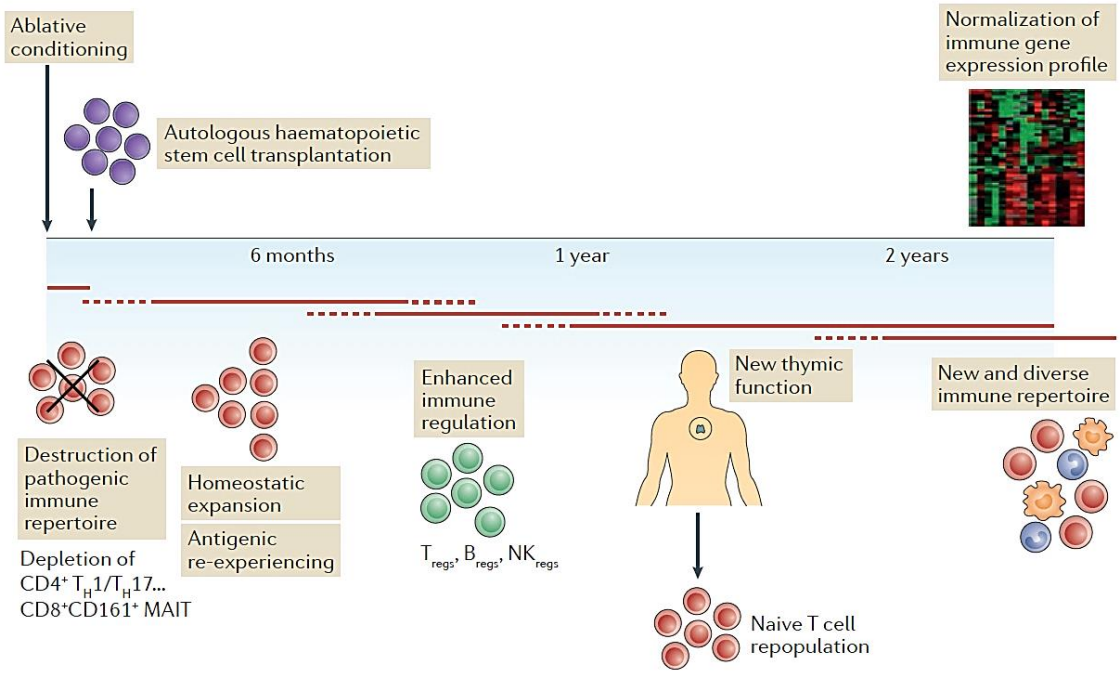


Figure 9 : Modèle proposé pour le mécanisme d'action de l'auto-CSH [127]

L'analyse de la reconstitution immunologique après auto-CSH a montré la possibilité d'un reset de la réponse immune et l'induction d'une tolérance de novo *via* la réémergence de cellules T et B régulatrices et d'un nouveau répertoire immunologique.

La reconstitution de l'immunité précède celle du système adaptatif : les cellules NK circulantes différenciées à partir de progéniteurs CD34+ rejoignent les valeurs normales un mois après l'allogreffe. S'en suit la récupération des cellules T puis B dans les 6 mois après la greffe [124] (Figure 10).

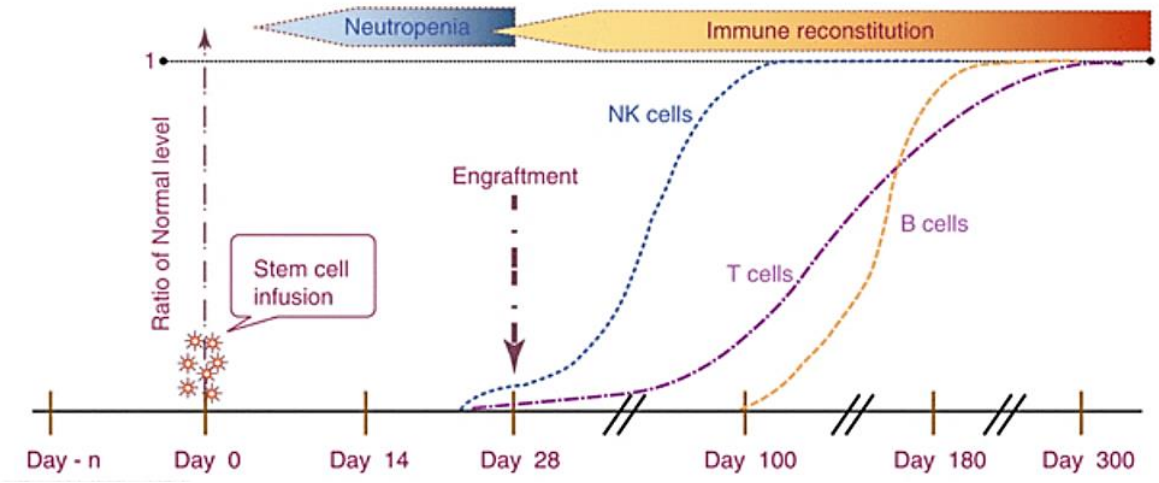


Figure 10 : Cinétique de reconstitution des sous populations immunes après greffe de CSH [128]

Des études portant sur la restauration immunologique chez des patients sclérodermiques après auto-CSH rapportent une reconstitution retardée des cellules T CD3+ avec lymphopénie T CD4+ [124] et inversion du ratio Th2/Th1 persistante jusqu'à 3 ans post greffe [129].

La mise en place d'un répertoire T diversifié ainsi que la restauration des propriétés immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs (Treg) prennent quant à elles jusqu'à deux ans [130].

Par ailleurs, le suivi à 6 ans d'un groupe de patients autogreffés a permis de mettre en évidence des différences phénotypiques entre les patients répondeurs et non répondeurs (progression de la maladie). Ainsi, il a été observé une augmentation relative de cellules CD4+ CD45RA+ (lymphocytes T CD4+ non stimulés par un antigène, dits « naïfs ») ainsi que des cellules CD3+ et CD8+ dans le groupe « non répondeurs » après auto-CSH. Cela pourrait refléter la persistance d'un mécanisme pathologique sous-jacent chez ces patients.

Concernant les lymphocytes B, leurs taux circulants étaient inversement associés à la réponse clinique, suggérant que les clones B pathogéniques pourraient se développer préférentiellement en cas de résultat défavorable [124].

En 2016, une étude a analysé les taux sériques de cytokines inflammatoires, pro-fibrotiques, pro-angiogéniques et autres molécules d'intérêt dans le suivi de l'auto-CSH des patients sclérodermiques chez 20 patients autogreffés [131]. Celle-ci rapporte des taux significativement plus élevés d'IL-6, IL-8, IL-10, Interferon ɣ (INFɣ) et de MCP-1 dans le bilan pré-greffe des patients sclérodermiques en comparaison aux sérums de donneurs sains ; preuve d'un état pro-inflammatoire chez ces patients. Rapidement après l'auto-CSH (à 6 mois), les taux d'IL-2 et IL-8, TGFβ, PDGF diminuent transitoirement alors que le MCP-1, molécule ayant une puissante action chimio-attractive, semble être un marqueur robuste de l'efficacité clinique, avec une réduction progressive de ces taux circulants et significative à 4 ans post auto-CSH.

- ***Rôle de la lymphopénie et de la thymopoïèse***

Le premier mécanisme à l'origine de la reconstitution des lymphocytes T après l'auto-CSH est la prolifération induite par la profonde lymphopénie.

En effet, l'environnement lymphopénique conduit à une expansion des populations T périphériques (effectrices et mémoires), principalement grâce aux signaux cytokiniques et aux stimulations antigéniques.

Dans un second temps la thymopoïèse intervient dans la reconstitution du système immunitaire en produisant des clones de cellules T naïves avec des T Cell Receptor (TCR) uniques, aboutissant à la création d'un répertoire TCR plus diversifié qu'avant l'autogreffe (Figure 11).

L'expansion de ces cellules naïves est plus lente que celle induite par la lymphopénie et plusieurs études cliniques ont démontré que la rémission post-greffe était corrélée à l'activation thymique [124,132].

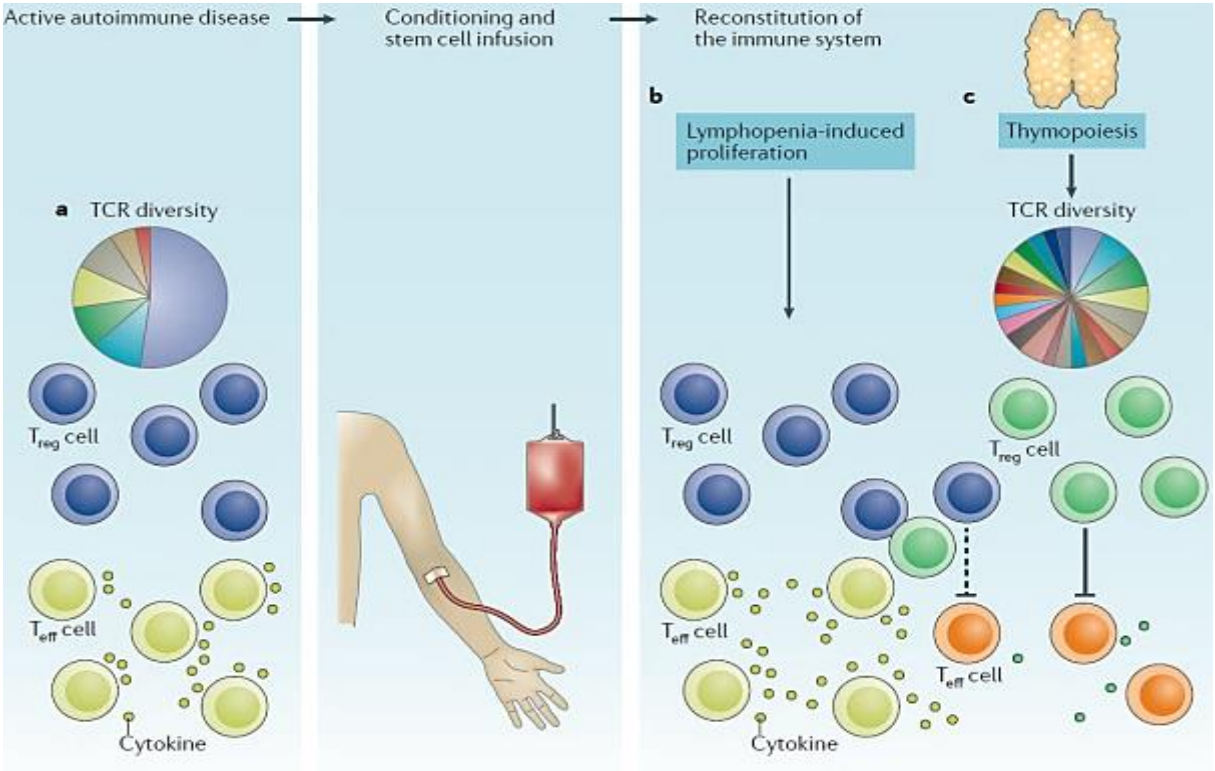


Figure 11 : Modèle de la reconstitution du répertoire TCR après auto-CSH [133]

- ***Rôle des lymphocytes T régulateurs***

Les lymphocytes Treg ont un rôle capital dans l'immunotolérance périphérique, notamment dans la régulation des phénomènes d'auto-immunité et inflammatoires. Il est admis dans la littérature que les lymphocytes Treg des patients sclérodermiques ont une fonctionnalité réduite [134] et qu'ils participent au développement de la maladie par leur transformation en lymphocytes T effecteurs pathogènes des lignées Th17 ou Th2.

Bien que les données actuelles concernant l'impact de l'autogreffe sur les lymphocytes Treg dans la ScS soient controversées, certaines études ont montré une amélioration fonctionnelle du compartiment T régulateur après auto-CSH chez les patients sclérodermiques [135] et une augmentation des cellules CD4+ CD25+ FoxP3+ impliquées dans les mécanismes d'immunotolérance [136].

b. Protocole de l'autogreffe de CSH appliqué à la ScS

L'auto-CSH consiste à recueillir et à conserver des CSH chez un patient et à les lui réinjecter après un traitement dit de « conditionnement ». La greffe se décline classiquement en quatre étapes successives (Figure 12) : la mobilisation des CSH, la collecte et cryopréservation des CSH, le conditionnement et la greffe.

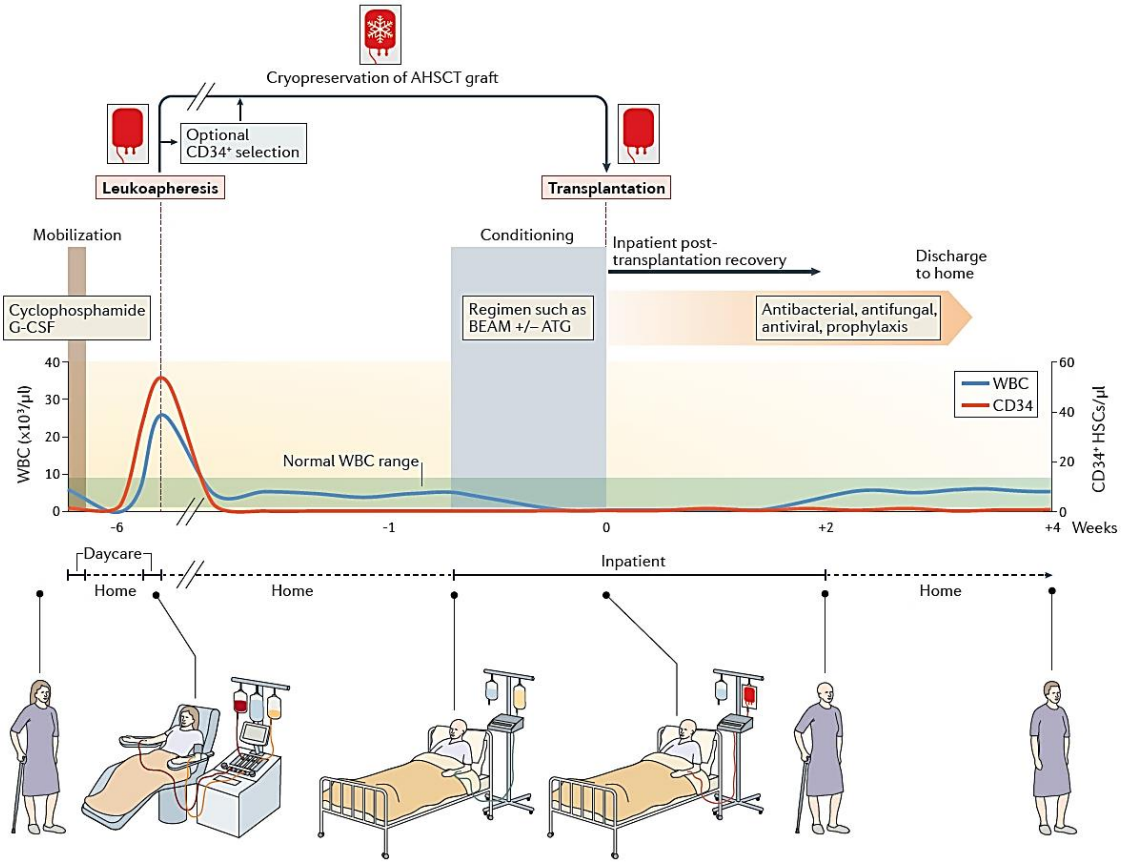


Figure 12: Schéma présentant le protocole de l'autogreffe de CSH [127]

- ***Mobilisation des CSH :***

Historiquement, on prélevait directement les CSH dans la moelle osseuse sous anesthésie générale au bloc opératoire. Aujourd'hui, la modalité préférée de collecte des CSH est un prélèvement par aphérèse des progéniteurs hématopoïétiques circulants suite à un traitement de mobilisation. L'European Society for Blood and Marrow Transplant Society (EBMT) préconise cette deuxième option car elle permet une récolte plus importante de cellules souches CD34+, une meilleure prise de greffe et donc une reconstitution hématopoïétique plus rapide qu'avec les CSH prélevées directement au niveau de la moelle osseuse tout en étant moins invasive [126].

L'étape de mobilisation des CSH repose sur l'administration quotidienne par voie sous-cutanée de recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (rhG-CSF), facteur de croissance hématopoïétique, seul ou en association avec des agents cytotoxiques tels que le cyclophosphamide (Cy). Les CSH ainsi « décrochées » de la moelle osseuse, sont libérées dans la circulation sanguine. Le protocole de mobilisation recommandé par l'EBMT repose sur l'administration conjointe de Cy (posologie : 2 à 4g/m^2) puis de rhG-CSF (posologie : 5-10µg/kg) pendant 4 à 5 jours [126]. La combinaison du Cy au rhG-SCF permet d'optimiser la collecte des CSH mais également de prévenir une potentielle poussée de la maladie qui pourrait être provoquée par le rhG-CSF.

Il est capital d'y associer une bonne hydratation ainsi que la prise d'uromitexan pour pallier les toxicités du Cy (cystites urinaires). Si la mobilisation est insuffisante, un traitement par plerixafor (antagoniste réversible et sélectif du récepteur de chimiokine CXCR4) pourra être introduit. Cette molécule provoque une rupture de la liaison entre CXCR4 et son ligand : SDF-1alpha, également connu sous le nom de CXCL2, se traduisant par la présence de cellules matures et immatures dans la circulation périphérique.

- ***Collecte et cryopréservation des CSH :***

Après 4 à 5 jours de mobilisation, les CSH sont collectées par cytaphérèse. Il s'agit d'une technique de prélèvement et de tri des cellules sanguines circulantes à l'aide d'un séparateur de cellules. Cette collecte est réalisée en 3-4 heures et peut être renouvelée le lendemain en cas de quantité insuffisante de CSH collectées. La quantité ciblée de cellules à collecter est généralement de 3 à 5.10^6 CD34+/ kg avec un minimum recommandé de 2.10^6 CD34+/ kg Par la suite, les CSH sont cryopréservées au sein d'un laboratoire de thérapie cellulaire jusqu'à la

greffe. Différents contrôles qualité (contrôles microbiologiques et numération des cellules CD34+ viables) sont réalisés sur le greffon, avant et après décongélation, afin d'assurer la sécurité et l'efficacité du produit.

- ***Conditionnement :***

Ensuite, les patients reçoivent une chimiothérapie de conditionnement dite « d'intensification thérapeutique ». Celle-ci a lieu entre 15 jours et 3 mois après la collecte des CSH et est extrêmement variable selon les équipes.

Cette intensification thérapeutique repose sur l'emploi de Cy ou d'autres immunosuppresseurs tels que la fludarabine à hautes doses associés à du sérum anti-lymphocyaire (SAL). L'objectif est d'éliminer les cellules auto-réactives du système immunitaire du patient et de dépléter *in vivo* les cellules T présentes dans le greffon. Des précautions d'isolement et de surveillance renforcée sont nécessaires pendant cette période pour prévenir les risques infectieux associés à l'aplasie profonde induite.

- ***Greffe de CSH :***

Elle consiste en une transfusion des CSH par voie IV lente au lit du patient, après décongélation et lavage des cellules dans une unité de thérapie cellulaire. S'en suit un « homing » des CSH dans la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse physiologique. Une étape supplémentaire d'immunosélection des cellules CD34+ *ex vivo* avant cryopréservation peut être réalisée dans un laboratoire spécialisé [137]. Les principaux traitements reçus par le patient au cours du protocole d'autogreffe sont résumés dans la figure ci-dessous (Figure 13).

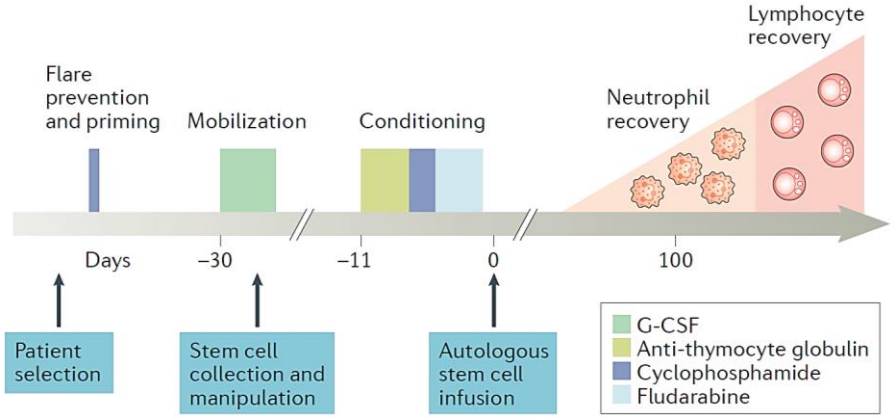


Figure 13 : Cinétique des traitements dans la procédure d'auto-CSH [137]

c. Un traitement validé suite à des essais cliniques randomisés concluants

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

- ***Essai ASSIST***

L'essai ASSIST est le premier essai randomisé évaluant l'efficacité de l'auto-CSH après conditionnement non myéloablatif dans la ScS. Il s'agit d'un essai ouvert, de phase II, monocentrique sur 19 patients atteints de formes diffuses de ScS. Le bras contrôle consiste en l'injection par voie IV de Cy une fois par mois pendant 6 mois. Il est important de noter qu'il s'agit du seul essai randomisé évaluant la greffe de CSH non manipulées (sans tri des cellules CD34+) parmi les trois exposés dans ce travail.

Les résultats de cet essai ont montré une amélioration significative à 2 ans de la Capacité Vitale Forcée (CVF) et une réduction du score mRSS chez les patients autogreffés [138]. Huit des neuf patients traités par Cy mensuel ont vu leur maladie progresser et sept d'entre eux ont bénéficié par la suite d'une auto-CSH.

- ***Essai ASTIS***

L'essai ASTIS est une étude ouverte multicentrique de phase III randomisée sur 156 patients atteints de formes précoces de ScS diffuses et traités, pour un tiers d'entre eux, par des équipes hospitalières françaises. Ce projet collaboratif a été conduit pendant plus de 12 ans sur 10 pays et 29 sites.

Après inclusion dans l'étude, les patients ont été répartis aléatoirement en deux groupes : un premier groupe de 79 patients traités par autogreffe de cellules CD34+ triées après conditionnement non myéloablatif (Cy et SAL de lapin) et un second groupe de 77 patients traités mensuellement par une injection intraveineuse de Cy pendant 1 an. Le délai médian de suivi des patients était de 5,8 ans.

Les résultats, publiés en 2014, ont révélé un bénéfice significatif de la procédure d'auto-CSH sur le critère principal de jugement (survie sans évènement à deux ans) et sur la survie globale et ce, malgré une mortalité liée au traitement plus importante que celle du bras contrôle pendant la première année post-greffe [139] (Figure 14). Aussi, la procédure d'autogreffe s'est montrée plus efficace sur l'amélioration des scores cutanés, sur la qualité de vie et sur la fonction pulmonaire, particulièrement chez les patients n'ayant jamais fumé.

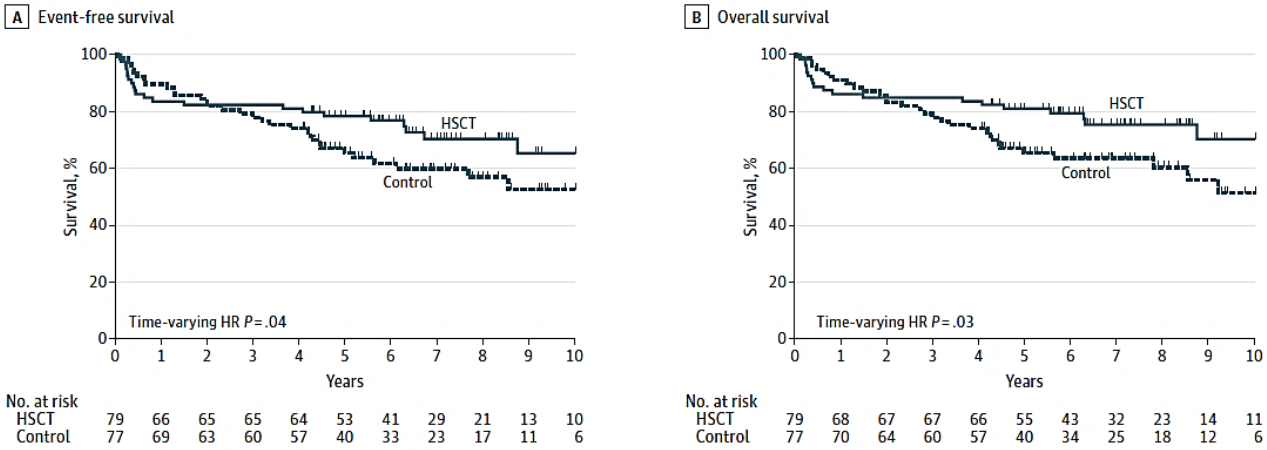


Figure 14: Courbes de survie sans évenement (A) et surive globale (B) des patients de l'essai ASTIS [139]

- ***Essai SCOT***

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

- une myéloablation majeure (Cy, SAL équin et irradiation corporelle totale) suivie d'une greffe de cellules CD34+ triées autologues (n= 36)
- et une cure mensuelle de Cy haute dose (1 dose 500mg/m² puis 11 doses de 750 mg/m²) par voie intraveineuse (n=39).

Le critère principal était un score composite nommé GRCS pour Global Rank Composite Score, évalué à 54 mois post-randomisation, qui reflète la manière dont les participants se

positionnent les uns par rapport aux autres en fonction de plusieurs paramètres tels que la survie sans évènement, la CVF, l'indice d'invalidité, le décès du participant et le mRSS. Notons toutefois que ce score ne mesure en aucun cas l'activité de la maladie ou sa sévérité.

Les résultats, publiés dans le *New England Journal of Medicine* en 2018 [132], ont montré une supériorité significative de la stratégie d'auto-CSH à 54 mois (Figure 15).

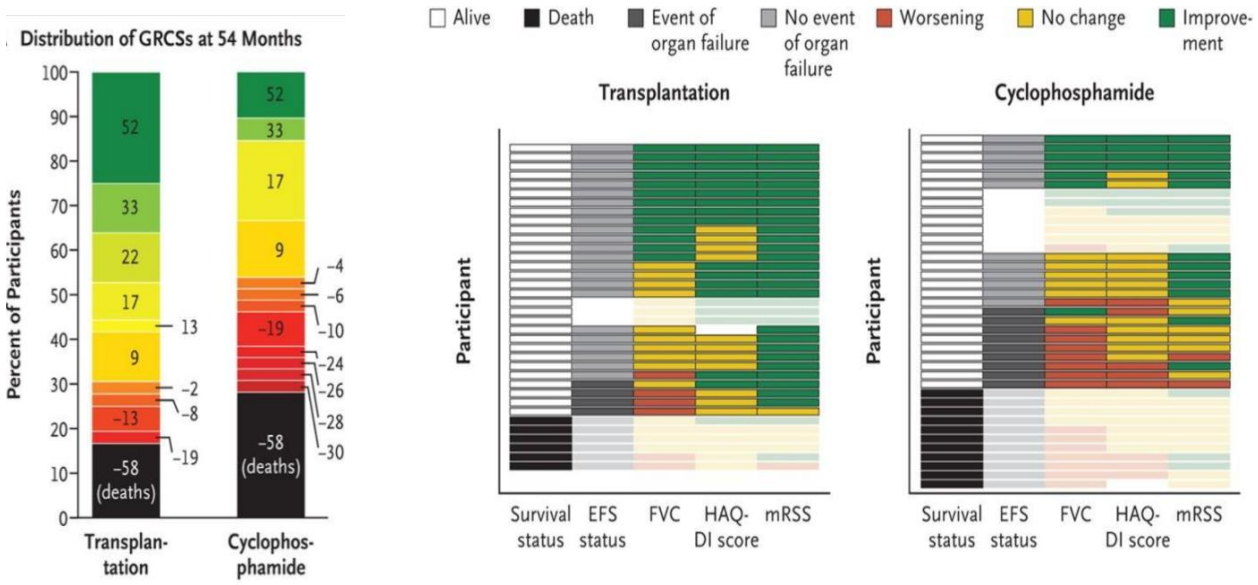


Figure 15 : Distribution du GRCS à 54 mois [132]

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

Parmi les 75 participants, 14 sont décédés pendant l'essai : 3 dans le groupe auto-CSH et 11 dans le groupe Cy. Seulement 9% des patients autogreffés ont dû avoir recours à un Agent Rhumatismal Modificateur de la Maladie (ARMM) à 2 ans.

L'analyse des courbes de Kaplan-Meier révèle que les courbes de survie des deux groupes se séparent autour de 2 ans post-randomisation. Toutefois, le pourcentage de participants présentant des effets indésirables sévères était plus faible dans le groupe Cy (51% vs 74% dans le groupe transplantation) et 100% des participants inclus dans le groupe transplantation ont présenté au moins un effet indésirable de grade 3 contre 84% pour le groupe Cy.

Concernant le risque d'infections associé aux protocoles, le taux d'infection par personne par année (tout grade confondu) était similaire entre les deux groupes ; mais la survenue d'infections au minimum de grade 3 est plus important dans le groupe transplantation. L'auteur de l'étude, Keith M. Sullivan, conclue ainsi que « les résultats indiquent qu'avoir une autogreffe de cellules souches en cas de sclérodermie sévère pose plus de risques à court terme, mais offre des gains plus importants à long terme que le traitement par le Cy » comme en témoigne les courbes de survie globale de l'essai (Figure 16)

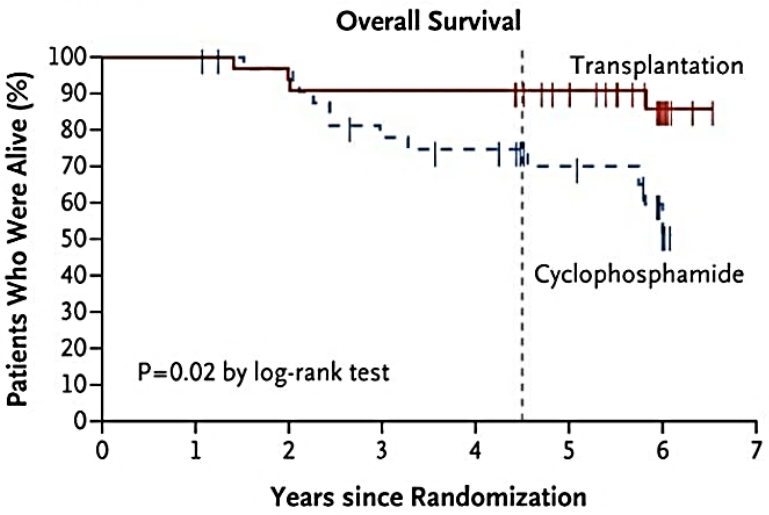


Figure 16: Courbe de Kaplan-Meier évaluant la survie globale des patients de l'essai SCOT [132]

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

La table 3 résume les principales caractéristiques de ces trois essais.

	ASSIST	ASTIS	SCOT
Phase	II	III	III
Nombre de centre(s)	1	29	14
n (autoCSH) / n (Cy)	10/9	79/77	36/39
Bras comparateur	Cy IV mensuel pendant 6 mois	Cy IV mensuel pendant 12 mois	Cy IV mensuel pendant 6 mois
Critère principal de jugement	>25% de réduction du mRSS et >10% d'amélioration de la CVF à 1 an	Survie sans évènement à 2 ans	Score composite à 54 mois (GRCS)
Mobilisation	Cy + rhG-CSF	Cy + rhG-CSF	rhG-CSF
Conditionnement	Non myéloablatif (Cy + SAL)	Non myéloablatif (Cy + SAL)	Myéloablatif (Cy+ SAL+TBI*)
Type de greffon	Auto-CSH	Cellules CD34+	Cellules CD34+
****TRM (%) autogreffe/Cy**	0/0	10,1/0	2,8/0
Mortalité globale (%) de l'autogreffe	0%	24%	9%

Table 3: Résumé des 3 principaux essais contrôlés randomisés entre l'auto-CSH et le Cy dans la ScS adapté d'après Del Papa et al [140]

**TBI : total body irradiation ; **TRM : treatment related mortality,*

d. Enjeux actuels

- ***Meilleur screening des patients***

L'auto-CSH appliquée aux maladies auto-immunes est un véritable challenge car il s'agit de combiner l'emploi d'une thérapeutique relativement ancienne à une indication innovante. Cette complexité est, en grande partie, palliée grâce au réseau Maladies Auto-immunes et Thérapie Cellulaire (MATHEC), à l'initiative de RCP (Réunion de Concertation Pluridisciplinaire) bi-mensuelle réunissant des professionnels de l'autogreffe et de la ScS afin de prendre une décision collégiale quant aux patients éligibles à l'autogreffe. L'approche par auto-CSH développée depuis 15 ans dans les formes sévères de maladies auto-immunes offre une option thérapeutique validée avec un niveau de preuve 1 pour la ScS. A la différence des

patients autogreffés pour des hémopathies malignes chez qui la masse tumorale domine le pronostic, la décision thérapeutique d'auto-CSH pour les patients atteints de ScS repose sur un faisceau d'arguments : absence de comorbidités, degré des atteintes viscérales, évolutivité de la maladie, lignes de traitements antérieures …

Ci-dessous sont listées les recommandations de la Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) des patients éligibles à l'autogreffe [122] :

- patients de 18 à 65 ans (certaines indications pédiatriques peuvent être discutées) ;
- ScS diffuse ou limitée avec une durée de la maladie depuis les premiers signes d'atteinte cutanée :
    - inférieure ou égale à 2 ans avec un mRSS supérieur ou égal à 20 associé à une atteinte du tronc avec une vitesse de sédimentation à la première heure supérieure à 25mm ou une hémoglobine inférieure à 11g/dL non expliquée par d'autres causes que l'évolutivité de la maladie ou
    - inférieure ou égale à 4 ans avec un mRSS supérieur ou égal à 15 associé à une atteinte viscérale significative ou s'aggravant de manière significative depuis plus de 6 mois et définie comme suit par soit :
        - une atteinte pulmonaire : DLCO et/ou FVC $\leq$ 80% de la valeur théorique et atteinte interstitielle pulmonaire
        - une atteinte rénale : hypertension artérielle, anomalies urinaires persistantes, anémie hémolytique microangiopathique, insuffisance rénale *de novo*, toute cause non liée à la ScS ayant été éliminée
        - une atteinte cardiaque : troubles du rythme, bloc du 2^{e} ou 3^{e} degré, épanchement péricardique, insuffisance cardiaque congestive régressive, toute cause non liée à la ScS ayant été éliminée ou
    - inférieure ou égale à 4 ans avec un mRSS inférieur à 14 (atteinte cutanée limitée) en cas d'atteinte pulmonaire co-existante.

Un bilan pré-greffe dans les trois mois précédant la procédure est obligatoirement réalisé et permet d'évaluer la sévérité de la ScS et son retentissement viscéral afin de détecter de potentielles contre-indications relatives ou absolues à l'autogreffe. Il comprend notamment une évaluation cardio-pulmonaire poussée, un bilan nutritionnel, une exploration de la fonction hépatique et rénale, un panoramique dentaire et une consultation stomatologique, un

dosage de la PSA/PSA libre et un toucher rectal pour les hommes, une consultation gynécologique pour les femmes, ainsi qu'un bilan infectieux complet.

La toxicité et le risque de décès liés à la greffe varient en fonction d'un certain nombre de facteurs comme le type de cellules injectées, la sévérité de la maladie et l'intensité des régimes de conditionnement pré-greffe. C'est pourquoi la sélection des patients doit être rigoureuse avec un screening des comorbidités et une évaluation initiale complète de la maladie. Un suivi systématique en centre expert permet d'évaluer la réponse au traitement et de dépister précocement les éventuelles complications de la procédure. Ce suivi est réalisé tous les 3 mois pendant un an, puis tous les 6 mois jusqu'à 3 ans puis tous les ans jusqu'à 10 ans, puis tous les 2 ans.

- ***Optimisation du protocole thérapeutique***

À ce jour, la réduction de la morbi-mortalité associée au protocole d'autogreffe est un véritable défi pour les professionnels de santé. Le risque de toxicité est principalement lié au traitement de conditionnement préalable à la réinjection des CSH. En effet, les essais randomisés de phase III ont été très concluants en termes d'efficacité mais ont révélé une mortalité per-traitement importante.

Même s'il n'existe actuellement aucun consensus sur les modalités du conditionnement, la majorité des régimes utilisés repose sur celui de l'essai ASTIS, à savoir un conditionnement non myéloablatif sans irradiation corporelle totale. Néanmoins des améliorations dans la tolérance du conditionnement sont à l'étude. Parmi elles, l'étude ASSIST IIb compare le régime de conditionnement réalisé dans ASSIST à un conditionnement d'intensité réduite (respectivement 200 mg/kg/jour de Cy contre 120 mg/kg/jour) (NCT :01445821) pour tenter d'en réduire la toxicité.

Par ailleurs, la manipulation des cellules collectées *ex vivo,* par exemple avec un tri immunomagnétique des cellules CD34+ fait encore débat. Dans ce cas, l'auto-CSH consiste en la réinjection d'une suspension cellulaire enrichie à plus de 90% en cellules CD34+ et déplétée en autres types cellulaires. Cette approche est celle qui a été réalisée dans l'essai SCOT et pourrait représenter une piste d'amélioration intéressante dans la procédure d'autogreffe car elle permet de purifier le produit en CSH et d'éliminer les potentielles cellules T auto-réactives présentes dans le greffon.

Cependant, en 2016, le groupe de travail sur les maladies auto-immunes de l'EBMT a publié une étude rétrospective comparant l'efficacité et la sécurité de l'autogreffe avec et sans sélection des cellules CD34+ chez les patients sclérodermiques. L'analyse multivariée des données n'a mis en évidence aucune différence significative entre les deux groupes en termes de survie globale (p=0,96), d'incidence de rechute ou de progression de la maladie (p=0,13) [141]. Ces résultats sont similaires à ceux issus d'un essai pilote randomisé chez 33 patients atteints de polyarthrites rhumatoïdes sévères [142]. Néanmoins, il est à noter que cette étape supplémentaire dans la production des greffons engendre également un coût supplémentaire et une quantité en cellules CD34+ récoltées supérieure.

Enfin, de nouveaux scores ou paramètres évaluant la réponse, la progression et la rechute post-autogreffe nécessitent d'être validés afin de standardiser les résultats.

- ***Immunomonitoring et biobanques***

Malgré des résultats plûtot satisfaisants de l'autogreffe dans les formes sévères de ScS, certains patients rechutent ou sont résistants à cette thérapeutique. Des études permettant la mise en évidence de marqueurs biologiques ou génétiques prédictifs de la réponse seraient nécessaires afin de mieux sélectionner les patients. Le biobanking d'échantillons de patients déjà greffés et la mise en place d'une évaluation clinico-biologique précise et globale permettraient sûrement de répondre à cette problématique.

Aussi, du fait de la complexité de la physiopathologie de la maladie, l'approche par auto-CSH dans la ScS reste empirique et il est difficile d'identifier clairement les cibles cellulaires ou moléculaires de cette approche. Le monitoring immunologique régulier des patients greffés offrirait la possibilité d'identifier certaines cibles préférentielles ou de nouveaux mécanismes d'action.

Une collaboration multicentrique combinée à une analyse précise des données issues de registres partagés grâce à des plateformes techniques adéquates est indispensable pour évaluer l'efficacité des greffes de CSH, améliorer les traitements et prévenir les complications.

Depuis 20 ans, environ 100 patients atteints de formes sévères de ScS ont bénéficié d'une procédure d'auto-CSH en France. Les résultats des différentes études et notamment des 3 essais randomisés en Europe et aux Etats-Unis (ASSIST, ASTIS et SCOT) sont concordants et montrent un bénéfice significatif sur la survie à long terme de l'auto-CSH par rapport au traitement par Cy intraveineux pour les formes sévères ou rapidement progressives de ScS.

L'auto-CSH constitue à ce jour le seul traitement réduisant de manière significative la morbi-mortalité de ces patients. Cette efficacité repose sur un reset immunologique avec réinitialisation *de novo* de la réponse immune dans l'année suivant l'autogreffe.

Néanmoins, la forte toxicité médicamenteuse associée à la procédure nécessite que l'indication d'auto-CSH soit validée en RCP par un comité d'experts spécialistes de la ScS mais également de la greffe de CSH.

2. Cellules Souches Mésenchymateuses allogéniques par voie IV

a. Définition

Les CSM sont des progéniteurs multipotents, de nature non hématopoïétique, initialement décrites comme cellules de soutien au sein de la moelle osseuse. Depuis leur découverte, les CSM ont fait l'objet d'une multitude de publications, permettant de mettre à jour de nouvelles propriétés. La définition actuelle, établie en 2006 par l'International Society for stem Cell Therapy (ISCT), repose sur 3 critères [143] (Figure 17) :

- une capacité à adhérer au plastique et proliférer en culture ;
- un phénotype membranaire déterminé par cytométrie en flux avec une majorité de cellules (> 90%) positives pour CD105, CD73, CD90 et au moins 98% des cellules négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD11b, CD14, CD45 ;
- une capacité de différenciation *in vitro* en types cellulaires issus du mésoderme (ostéoblaste, chrondrocyte, adipocyte)

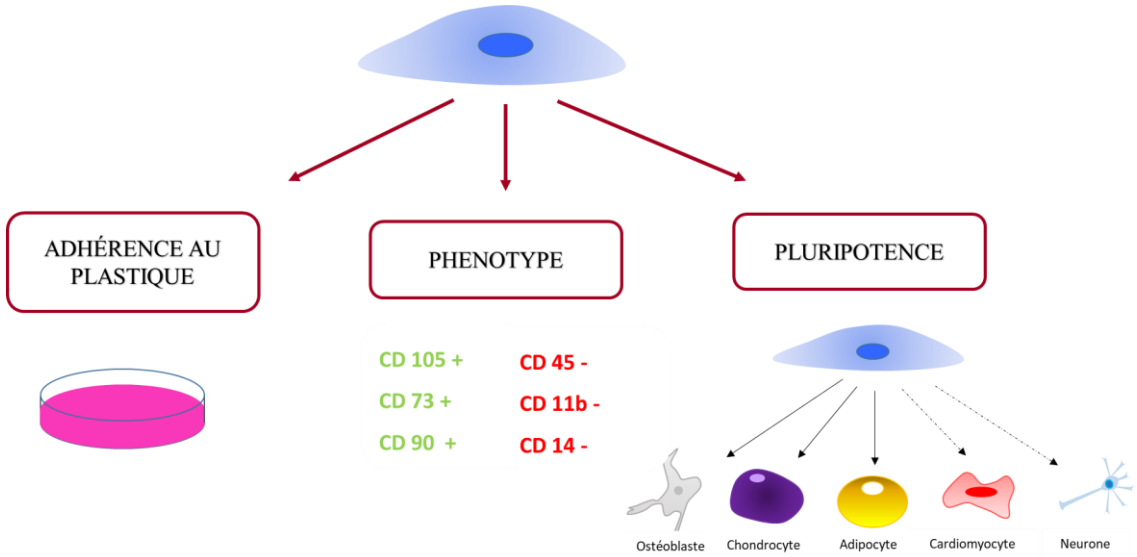


Figure 17 : Critères minimums de définition des CSM selon l'ISCT

Des sources alternatives de CSM ont été mises en évidence ; parmi elles, le tissu adipeux (TA), le placenta et le cordon ombilical représentent les sources les plus utilisées.

Bien que certaines différences fonctionnelles ou phénotypiques puissent être observées entre les CSM de moelle osseuse et du TA, l'établissement de critères de définition a permis une

homogénéisation des pratiques et une comparaison plus aisée des études. L'engouement pour les CSM dans les études ou les essais cliniques se justifie par un accès relativement aisé chez l'homme (surtout pour celles issues depuis le TA), un fort potentiel d'expansion *in vitro* garantissant l'obtention d'un nombre suffisant de cellules et des propriétés multiples leur conférant un potentiel thérapeutique dans diverses pathologies [112].

Sur le plan réglementaire, les CSM expansées répondent au statut de Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) et sont soumises au règlement du CE n°1394/2007. Par ailleurs, l'expansion des CSM doit répondre aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) appliquées aux médicaments tant au niveau de la production que des contrôles de qualité.

b. Propriétés

L'intérêt croissant pour les CSM ces dernières années repose majoritairement sur leurs propriétés. Bien qu'initialement étudiées pour leur pluripotence, l'efficacité des CSM repose principalement sur leur effet paracrine. En effet, les CSM sécrètent de nombreuses molécules bioactives (cytokines, facteurs de croissance) [144] et produisent des microvésicules (MVs) extracellulaires riches en ARNm, miRNA et protéines [145]. (Figure 18).

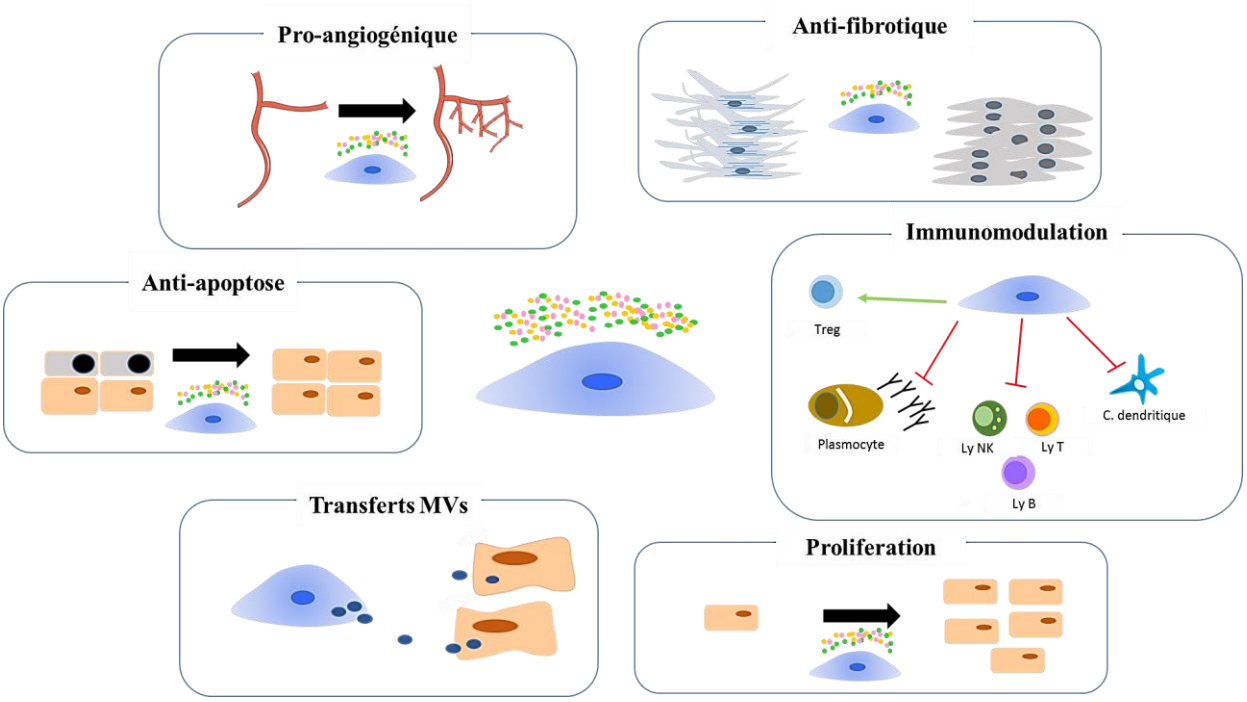


Figure 18 : Principaux modes d'action paracrine des CSM

- ***Effet régénératif***

Initialement, le potentiel régénératif des CSM a été attribué à leur capacité de migration et de différenciation en différents types cellulaires d'origine mésodermique.

Cependant, les résultats de nombreuses études animales conduites au cours de ces dernières années ont remis en question ce paradigme [146] et ont montré leur capacité à se différencier en des lignées d'origine non mésodermiques [147] telles qu'en cellules épithéliales, hépatiques ou gastro-intestinales. Dans ce cas, il s'agirait alors d'une fusion entre les CSM et les cellules cibles [148] et non d'un remplacement tissulaire.

- ***Effet pro-angiogénique***

L'effet pro-angiogénique des CSM est double, reposant à la fois sur un effet paracrine puissant [149,150] et sur une capacité de différenciation en cellules endothéliales [151]. En effet, les CSM sécrètent un large panel de molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF, MCP-1, bFGF et l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) activant le recrutement de cellules endothéliales sur les sites ischémiés et la formation de nouveaux vaisseaux. Les CSM semblent promouvoir chaque étape de l'angiogenèse, depuis l'activation et la migration des CE, la production de protéases nécessaires à la dégradation de la matrice environnante jusqu'à la stabilisation du vaisseau néoformé.

L'effet paracrine pro-angiogénique des CSM peut être amplifié dans certaines conditions comme l'influence de certaines chémokines (Transforming Growth Factor Alpha (TGFα)) [152] ou un contexte d'hypoxie [153]. En outre, il a déjà été montré que les CSM jouent un rôle crucial dans la modulation de l'angiogenèse dans des modèles d'ischémie chez l'animal [154].

- ***Effet anti-fibrotique***

Même si quelques études ont pu montrer un effet bénéfique des CSM de moelle osseuse sur des lésions de fibrose de différents organes (poumons [155], rein [156] et peau [157]), l'effet anti-fibrotique des CSM reste peu documenté. Les études *in vivo* [157,158] testant l'efficacité des CSM de moelle osseuse dans un modèle de fibrose de la peau (bléomycine ou radio-induite) ont montré un bénéfice net de l'injection de CSM responsable d'une diminution de l'infiltrat leucocytaire inflammatoire, une augmentation du remodelage matriciel par les MMP et un nombre réduit de cellules αSMA positives.

Une équipe française s'est intéressée au potentiel anti-fibrotique des CSM isolées depuis le TA dans un modèle original murin de fibrose induite par des injections répétées d'acide hypochloreux. Dans ces travaux, les CSM dérivées du TA ont permis de réduire les lésions de fibrose d'un point de vue histologique associé à une down régulation des transcrits du TNFα et de l'IL-1b ainsi qu'à une élévation du ratio Matrix Metalloproteinase-1/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (MMP-1/TIMP-1) témoin d'un remodelage matriciel dans la peau et les poumons des souris [159]. Les auteurs ont aussi montré une disparition des CSM 7 jours post-injection alors que le pic d'efficacité clinique était présent à J+21 suggérant que ce potentiel repose sur un mécanisme autre que la migration et la différenciation des CSM aux sites de fibrose.

De plus, Chen et al. ont obtenu, en 2017, des résultats concordants avec une diminution de l'épaisseur de la peau et du contenu en hydroxyproline dans un modèle murin de ScS induit à la bléomycine [160].

- ***Effet Immunomodulateur/Anti inflammatoire***

La découverte du potentiel immunomodulateur des CSM remonte aux travaux portant sur l'administration de CSM chez les patients souffrant de GvHD ; notamment ceux de Leblanc et al. sur les CSM haplo-identiques dans la prise en charge des patients atteints de GvHD sévère cortico-résistante qui ont montré une réduction de la mortalité liée à la greffe (p=0.002) et une augmentation significative de la survie globale [161].

Ce sont les tests Mixed Lymphocyte Reaction (MLR), *in vitro*, qui ont confirmé ce potentiel immunomodulateur des CSM en mettant en évidence un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules immunitaires activées dans des modèles de cocultures avec les CSM [162].

Par la suite, Di Nicola et al. ont mis en évidence le mécanisme paracrine de cet effet dans un modèle de co-culture indirect avec insert entre CSM et lymphocytes T [163]. Cependant, bien qu'un effet antiprolifératif puissant de l'ordre de 70% était observé sur les lymphocytes T, le taux d'inhibition en condition de coculture sans insert était supérieur (environ 95%). Ceci suggère que l'effet immunomodulateur des CSM repose majoritairement sur la sécrétion de diverses molécules solubles [164,165].

Les CSM interagissent avec tous les acteurs du système immunitaire inné et adaptatif, résultant en une modulation globale de l'immunité [164] (Figure 19). Elles entraînent une

anergie des lymphocytes B, T, Natural Killer (NK) avec un switch des lymphocytes T vers un phénotype Th2 et freinent également l'activation et la maturation des cellules dendritiques [166,167].

Plusieurs mécanismes participent à ce potentiel immunomodulatuer. Parmi eux, on retrouve l'activation de l'Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO) responsable de l'accumulation de produits toxiques et donc d'un effet cytotoxique [168] mais également la sécrétion de facteurs solubles tels que l'IL-6, les prostaglandines.

Par ailleurs, les CSM modifient les profils de sécrétion des cytokines par les cellules immunes afin d'induire un profil anti-inflammatoire et plus immunotolérant [169]. Aussi, elles induisent l'apoptose des cellules T inflammatoires par l'activation de la voie Fas-Fas Ligand [170].

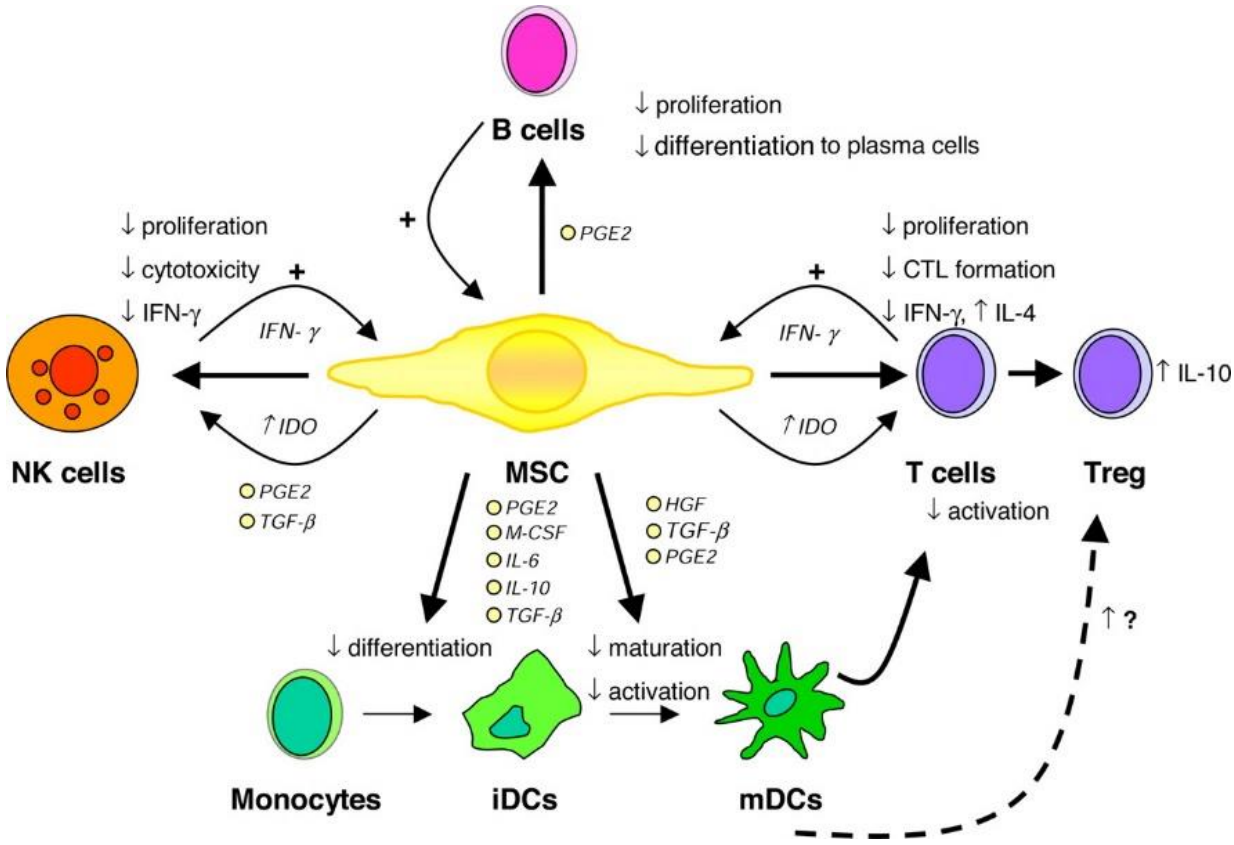


Figure 19 : Fonctions immunomodulatrices des CSM [164].

Des études récentes ont démontré le rôle majeur des MVs dans l'effet anti-inflammatoire du sécrétome de CSM. Celles-ci sont de véritables vecteurs de communication inter-cellulaire et agissent par différents mécanismes tels que l'interaction avec des marqueurs de surface

cellulaires, l'internalisation mais également la fusion membranaire libérant dans la cellule cible des ARN, des miRNA et des protéines dotés de propriétés biologiques. Ainsi, les MVs dérivées de CSM exercent un effet inhibiteur sur la différenciation et la prolifération des lymphocytes T et stimulent la sécrétion d'IL-10 et la génération de lymphocytes Treg [145].

Enfin, l'immunogénicité de CSM est très réduite (faible expression des molécules de HLA type I et l'absence de HLA–II à leur surface [171]), permettant ainsi d'envisager le développement d'approches allogéniques sans régimes de conditionnement intensifs.

Ainsi, la découverte des propriétés immunomodulatrices des CSM a permis de faire passer progressivement la thérapie cellulaire fondée sur les CSM du domaine de la médecine régénérative à celui de l'auto-immunité.

c. Essais dans la ScS

L'identification de nouvelles cibles pathogéniques a amené au développement de nouvelles thérapies cellulaires et géniques. Grâce à leur potentiel à la fois immunomodulateur, trophique et pro-angiogénique, les CSM peuvent être employées à visée régénérative mais également dans des approches d'immunomodulation. Ainsi, les CSM représentent un candidat de choix dans la prise en charge de la ScS.

L'utilisation en clinique des CSM par voie IV dans la ScS a été initialement décrite dans deux rapports de cas et une série de cas [172–174] pour un total de 7 patients (6 greffes allogéniques et 1 autologue). Les patients souffraient d'une nécrose cutanée étendue et/ou d'une fibrose pulmonaire et cardiaque. Les trois rapports ont noté une cicatrisation importante des ulcères et des zones nécrotiques de la peau après l'administration systémique de CSM. La diminution du mRSS a également été rapportée et les résultats de l'angiographie ont indiqué une néovascularisation.

Ces résultats ont encouragé la mise en place de deux essais à plus grande échelle évaluant l'injection de CSM allogéniques par IV dans la ScS : un essai réalise en Chine (NCT00962923) publié en 2017 [175] et un essai réalisé à l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) (NCT02213705) dont les résultats ne sont pas encore disponibles.

- ***Essai de l'équipe chinoise (NCT 00962923) :***

Quatorze patients atteints de formes diffuses de ScS ont été inclus dans cet essai. Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'efficacité et la sécurité de l'injection combinée de plasmaphérèse et de CSM. Le protocole consistait en la réalisation de 3 plasmaphérèses à J1, J3 et J5 suivies d'une injection de Cy à J6 pour inhiber la réponse B prolifération. Puis, les patients recevaient à J8 une seule injection de $1x10^6$ CSM/kg de poids du receveur. Il s'agissait de CSM expansées à partir de cordon ombilical.

L'utilisation de plasmaphérèses repose sur les résultats de quelques études qui ont montré une amélioration du mRSS et une diminution des marqueurs inflammatoires chez les patients sclérodermiques [176,177].

Les résultats de cet essai ont montré une amélioration significative du mRSS (diminution moyenne du score de -6,2 points) ainsi qu'une réduction de marqueurs sériques de la maladie tels que le TGFβ et les auto-Ac anti-Scl70 [175]. De façon intéressante, le VEGF sérique était également diminué significativement à 1, 3 et 6 mois post-traitement chez ses patients témoignant d'une modulation de l'angiogenèse.

- ***Essai de l'équipe française (NCT 02213705) :***

Le principal objectif de cette étude non randomisée monocentrique de phase II réalisé à l'hôpital Saint Louis à Paris est d'évaluer la tolérance de l'administration par voie IV lente de CSM allogéniques issues de moelle osseuse dans le traitement des formes sévères de ScS (formes rapidement évolutives ou réfractaires au Cy contre-indiquées à une auto-CSH).

Dans cette étude, les CSM sont expansées depuis un prélèvement de moelle d'un donneur intrafamilial (dans l'ordre : fratrie, parents, cousins ou autre membre de la famille) ou du conjoint du receveur. La dose administrée est de $0,5x10^6$ CSM/kg, $1x10^6$ CSM/kg ou $3x10^6$ CSM/kg de poids de receveur selon les groupes.

Dans un premier temps, 10 patients à la dose de $1x10^6$ CSM/kg ont été inclus, puis les 10 patients suivants ont été inclus à la dose de $0,5x10^6$ CSM/kg, $1x10^6$ CSM/kg ou $3x10^6$ CSM/kg en fonction de la probabilité de toxicité dont les critères sont décrits dans la classification du Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE).

Les objectifs secondaires sont l'évaluation de la faisabilité d'une telle thérapie, la tolérance à plus de trois mois après injection (notamment l'absence de pathologies malignes) et enfin l'évaluation de la réponse clinique et de l'évolutivité de la maladie à 3, 6, 9 et 12 mois. Cette étude est actuellement en cours.

Une étude rétrospective s'est intéressée à la sécurité de l'injection sytémique de CSM dans les maladies auto-immunes chez plus de 400 patients entre 2007 et 2016 et a montré une excellente tolérance de cette approche [178]. En effet, seulement 15,8% des patients ont présenté des effets indésirables dans les 30 jours post-injection dont les plus fréquents étaient de la fièvre, des insomnies, des palpitations et des céphalées.

Le taux global de survenue d'infection s'élèvait à 29,5% dont 13% d'infections sévères et le risque de développement d'un cancer était de 1,2%. Enfin 45 patients (11,1%) sont décédés durant la période de suivi (en moyenne 45 mois) et majoritairement à cause de la maladie sous-jacente (rechutes et complications).

L'utilisation par voie IV de CSM allogéniques est à ce jour encore à l'essai. Néanmoins, les résultats déjà publiés ont montré des résultats prometteurs, tant au niveau de l'amélioration des lésions déjà développées (réduction du mRSS) que sur des marqueurs systémiques (TGFβ circulant, auto-Ac). Concernant la tolérance de cette approche, les données issues des registres de l'EBMT ont montré une mortalité induite par le traitement de l'ordre de 8,7% pour l'auto-CSH [179] versus 0,2% pour les injections systémiques de CSM. Ceci s'explique par la haute toxicité des traitements de conditionnement dans les protocoles d'auto-CSH, non nécessaires dans les approches utilisant les CSM. Le développement à plus large échelle de cette approche nécessite la mise en place d'essais randomisés contre placebo, pour confirmer l'efficacité de cette thérapie.

B. Thérapies cellulaires par voie locale

La ScS se manifeste par des atteintes (micro-)vasculaires conduisant à des lésions d'ischémie et de fibrose développées dans la partie 1 de ce travail. Ceci justifie le développement de thérapies angiogéniques riches en progéniteurs endothéliaux ou favorisant la formation de nouveaux vaisseaux pour les patients sclérodermiques.

Si la vasculogenèse est longtemps restée un processus de croissance vasculaire restreint à la période embryonnaire, ce concept a été révisé en 1997 avec les travaux pionniers d'Asahara et al. [180] qui fournissent la première évidence de l'existence d'un mécanisme de vasculogenèse en période post-natale. Ces travaux décrivent la présence dans le sang périphérique adulte de progéniteurs endothéliaux (PE) identifiés parmi une fraction des cellules mononucléées coexprimant l'antigène CD34 et le récepteur 2 du VEGF également appelé KDR.

Ces cellules sont caractérisées sur le plan fonctionnel par une capacité de prolifération et de différenciation endothéliale *in vitro* et une aptitude à promouvoir la néovascularisation *in vivo*.

Divers modèles de transplantation médullaire chez l'animal ont établi que ces cellules, mobilisées à partir de la moelle osseuse sous l'influence de différentes cytokines ou de facteurs de croissance, sont capables de rejoindre spécifiquement les sites de néovascularisation où elles contribuent significativement à la croissance ou à la réparation endothéliale lors de processus physiologiques ou en réponse à l'ischémie [181,182].

Chez l'homme, de nombreux travaux précliniques ont établi que l'injection de PE obtenus par isolement et amplification *ex vivo* depuis le sang périphérique humain ou contenus dans la fraction mononuclée de cellules médullaires, induit le développement de néo-capillaires et favorise le rétablissement de la perfusion tissulaire dans différents modèles d'ischémie périphérique ou myocardique [183,184].

Cependant, l'identité précise des progéniteurs endothéliaux reste un sujet de débat.

Des progrès récents dans la caractérisation des PE présents dans la circulation sanguine ont permis d'identifier au moins deux sous-populations [185] : des progéniteurs « précoces » d'origine hématopoïétique dits « myéloïdes » appelés Myeloid Angiogenic Cells (MAC) et des progéniteurs « tardifs » ou Endothelial Colony Forming Cells (ECFC).

La détermination de l'origine et du réservoir tissulaire des ECFC chez l'adulte a fait l'objet de travaux récents. Sur la base d'études menées sur les ECFC de patients atteints de maladies clonales touchant les CSH, il a été clairement établi que les ECFC n'appartiennent pas au lignage hématopoïétique [186] remettant en question leur présence au sein de la moelle osseuse. A l'inverse, l'existence d'ECFC résidents dans la paroi vasculaire est confortée par de solides observations [187,188].

Ceci a conduit à considérer le Tissu Adipeux (TA), richement vascularisé, comme une nouvelle source facilitant l'accès à des ECFC autologues.

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

1. Tissu Adipeux non manipulé

a. Définition

Le TA, présent en grande quantité chez les mammifères, est surtout connu pour permettre de survivre à des épisodes d'apports caloriques limités en emmagasinant de l'énergie excédentaire sous forme de lipides lors de périodes d'abondance.

Les adipocytes, principales cellules composant le TA, sont les seules cellules qui sont spécialisées et parfaitement adaptées pour accumuler les lipides sans compromettre leur intégrité fonctionnelle grâce à leur machinerie enzymatique appropriée [189].

Le TA est un organe grandement vascularisé. Son développement est étroitement relié à celui du réseau vasculaire qui le compose [190].

L'histoire du transfert de graisse autologue remonte à la fin du XIXe siècle où il fut utilisé initialement pour « combler » des plaies, dépressions…

b. Propriétés

Le TA blanc est un tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse riche en différents types cellulaires (adipocytes et fraction vasculaire stromale).
Il possède deux fonctions principales :

- un rôle métabolique par le stockage et la libération des lipides ;
- un rôle endocrinien qui synthétise et sécrète des adipokines et des cytokines, qui agissent par voie autocrine ou paracrine [191].

Par ailleurs, le TA se caractérise par une capacité d'adaptation remarquable : on peut observer le remodelage, l'expansion ou la régression du tissu à une échelle importante tout au long de la vie d'un individu. Pour assurer cette plasticité, il existe une communication étroite entre les CE et les adipocytes dans le TA *via* une signalisation paracrine impliquant des facteurs sécrétés ou encore par l'intermédiaire de contacts cellule-cellule.

Le transfert de TA purifié était initialement utilisé pour son effet volumateur. Cependant, l'utilisation à large échelle de cette approche a mis en évidence des propriétés supplémentaires, et notamment trophiques, sur la qualité de la peau.

Cette trophicité a été ensuite attribuée à la présence de cellules souches multipotentes au sein du TA découverte en 2001 par l'équipe de Zuk [192]. Il est démontré dans cette étude pionnière que le TA contient une population de cellules souches multipotentes : les Adipose Stromal/Stem Cells (ASC) dont les propriétés sont similaires aux CSM de la moelle osseuse décrites dès 1960.

c. Essais et résultats dans la ScS

- ***Handicap de la main***

La greffe de TA autologue, aussi appelée lipofilling, est l'une des procédures les plus répandues dans l'ère de la chirurgie plastique. Néanmoins, son application dans la ScS est récente puisque ce n'est qu'en 2014 que le TA a été testé dans la prise en charge du syndrome de Raynaud [193].

Bank et al, en 2014, rapporte les résultats d'une étude monocentrique ouverte destinée à évaluer de la réinjection de graisse autologue dans les mains de 13 patients souffrant de syndrome de Raynaud réfractaire dont 9 femmes atteintes de sclérodermie. Le TA a été

injecté localement au niveau de la paume et du dos de la main. La procédure était bien tolérée et a permis de réduire significativement la douleur, la gravité des crises induites par le froid et de favoriser la cicatrisation des ulcères [193].

Ces résultats sont confortés par les travaux de Del Papa et al., qui ont rapporté l'efficacité de l'injection autologue de TA purifié dans les doigts atteints pour le traitement des ulcères digitaux réfractaires chez les patients sclérodermiques [194].

Le TA a été récolté après lipoaspiration sous anesthésie locale, puis centrifugé. Les phases supérieure et inférieure, contenant l'huile et les adipocytes matures ainsi que les résidus de sang et de plasma, ont ensuite été éliminés, et seule la couche intermédiaire appelée ATDC par les auteurs, pour Adipose Tissue Derived Cell, a été injectée.

La guérison de l'ulcère était observée chez tous les patients et aucun ulcère n'est réapparu. Une réduction significative de la douleur a été observée après quelques semaines sans aucun effet indésirable rapporté. Une évaluation par capillaroscopie a permis de détecter une croissance et augmentation très significative du nombre de capillaires ($p<0,0001$). Une diminution de la résistance artérielle évaluée par échographie Doppler a également été notée après 1, 3 et 6 mois, comparativement à l'état initial.

Par la suite, un essai randomisé contre placebo (solution saline) mené par la même équipe en 2018 (NCT 03406988) confirme l'efficacité et la sécurité de cette procédure avec une guérison à 8 semaines des ulcères chez 23 des 25 patients qui ont reçu le TA versus 1/13 dans le groupe placebo [195] (Figure 20).



Figure 20 : Guérison progressive des ulcères digitaux après injection de TA autologue [195]

- ***Handicap du visage***

L'atteinte du visage au cours de la ScS est une plainte fréquente des patients tant au plan esthétique (télangiectasies, amincissement des lèvres, …), que fonctionnel (limitation de l'ouverture buccale, problèmes gingivo-dentaires, syndrome sec, …).

Il semble que dans la forme cutanée pure de sclérodermie (morphée et coup de sabre), le transfert de TA autologue donne de bons résultats, persistents plusieurs années après la procédure [196,197].

Sautereau et al. ont protocolisé une approche simple de réinjection de microgaisse, TA purifié par système Puregraft ® (Puregraft, San Diego, Californie), pour la prise en charge du handicap du visage des patients atteints de ScS [198]. L'injection de microgaisse autologue a été réalisée chez 14 patientes sous anesthésie locale. Une diminution moyenne du score Mouth Handicap in Systemic Sclerosis Scale (MHISS) de 10,7 points à 6 mois a été observée. En fin de suivi, 75% des patients se disaient satisfaits du traitement par microinjection de TA.

Plus récemment, l'injection de TA purifié (centrifugation 700g pendant 3 minutes) dans la région périorale chez 20 patientes atteintes de formes diffuses de ScS a montré une amélioration significative de l'ouverture buccale et une amélioration de la néovascularisation de la peau (objectivée par capillaroscopie et densité vasculaire) [199].

Enfin, des approches combinant le TA à d'autres produits de médecine régénérative ont été évaluées dans la ScS. Par exemple, le Plasma Riche en Plaquettes (PRP), concentré plaquettaire issu du sang périphérique de production facile et rapide, a été combiné au TA dans deux études pour la prise en charge du handicap du visage chez les patients sclérodermiques. Virzì et al. [200] ont ainsi traité six patientes par l'administration séquentielle de PRP puis de TA. Les résultats ont montré une augmentation substantielle de l'élasticité cutanée entraînant une nette amélioration de l'ouverture buccale.

Notre équipe a également rapporté l'efficacité de l'association graisse-PRP chez 2 patientes atteintes de ScS [201]. Contrairement à l'étude de Virzì, les produits étaient mélangés extemporanément avant l'injection. Les résultats montraient à 12 mois une diminution du handicap de la face évalué par le score de MHISS et une capacité d'ouverture buccale plus importante. Cependant, l'apport réel de PRP mérite d'être évalué dans des essais comparatifs de plus grande échelle.

2. Fraction Vasculaire Stromale

a. Définition

Les adipocytes ne représentent que 40 à 60% du TA, les autres cellules constituant la Fraction Vasculaire Stromale (FVS). Celle-ci est obtenue en quelques heures par la digestion enzymatique (collagénase) d'un prélèvement de TA suivie d'une centrifugation permettant d'éliminer les adipocytes.

En France, la production de FVS doit être réalisée dans une unité de thérapie cellulaire autorisée à produire des MTI.

La FVS est constituée d'un mélange hétérogène de cellules parmi lesquelles on retrouve notamment deux populations aux propriétés régénératives : les Adipose Stromal/Stem Celles (ASC) et les ECFC mais également d'autres types cellulaires tels que les péricytes, les macrophages et les leucocytes. D'après l'International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) et l'International Society for Cellular Therapy (ISCT), la répartition des cellules nucléées viables au sein de la FVS est la suivante [202] :

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

La FVS est ainsi présentée comme une alternative à l'utilisation thérapeutique des CSM de moelle osseuse présentant l'avantage d'un prélèvement par liposuccion (moins invasif par rapport à celui de moelle osseuse) et de fournir des CSM en plus grande quantité par rapport à la moelle osseuse (jusqu'à 10 fois d'après Zhu et al. [203]).

L'utilisation en clinique de la FVS voit le jour en 2007 dans le cadre de reconstruction mammaire chez des patientes traitées par radiothérapie pour un cancer du sein [204,205].

Les avantages de la FVS sont nombreux : caractère autologue, accessibilité, richesse en cellules souches, faible délai d'obtention (quelques heures) et absence d'expansion *in vitro*.

b. Propriétés

De par sa richesse en ASC, en cellules endothéliales et en péricytes, la FVS a la capacité de favoriser la croissance et/ou la réparation vasculaire. La synergie des cellules présentes dans la FVS a été démontrée puisque l'association de PE et d'ASC entraîne une plus grande néovascularisation *in vitro* que les PE ou ASC utilisés de manière isolée [206].

Bora et al. ont fait l'hypothèse que les ASC et les PE retrouvés dans la FVS produisaient de nombreux facteurs solubles bioactifs, et qu'un cross talk s'établissait par le VEGF et le PDGF pour la néovascularisation *via* les cellules endothéliales et le maintien d'un réseau stable grâce aux ASC [207] (Figure 21).

Ceci est renforcé par les travaux de Harada et al. qui ont montré un potentiel angiogénique de la FVS supérieur à celui des ASC dans un modèle d'ischémie chez le rat [208].

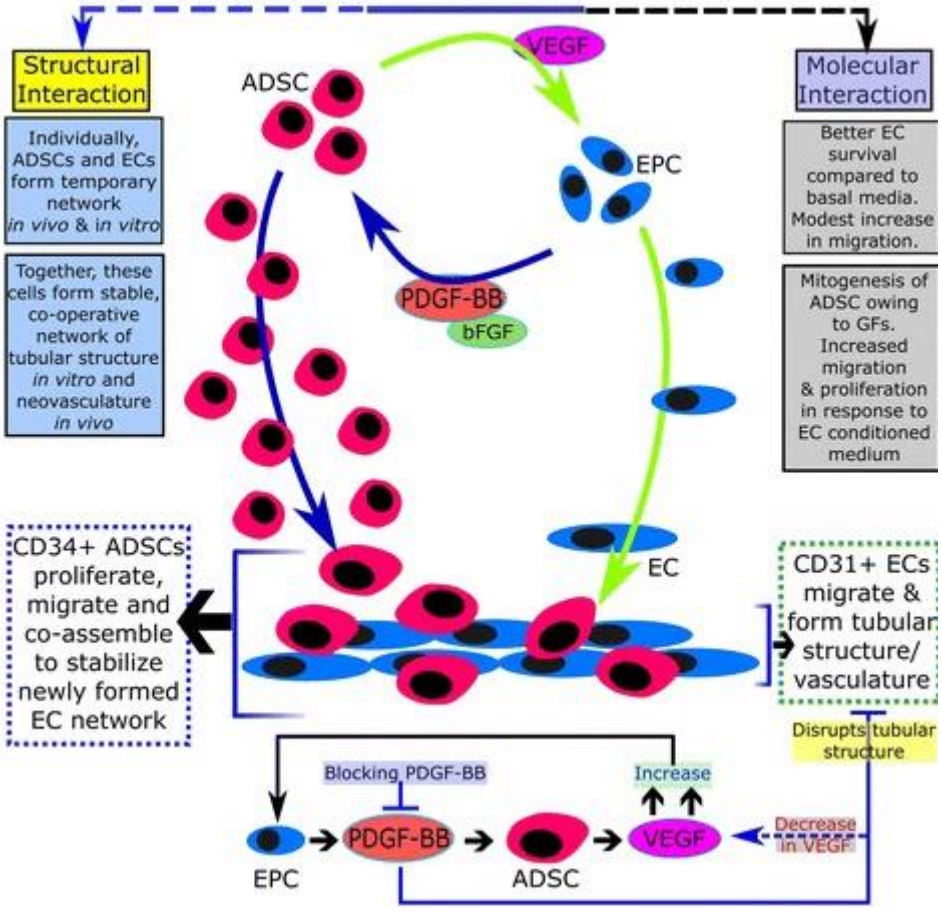


Figure 21 : Cross talk entre ASC et PE présents dans les FVS [207]

La FVS possède également des propriétés immunomodulatrices qui permettent de limiter les dommages tissulaires par la sécrétion de facteurs anti-apoptotiques et anti-inflammatoires [209]. En effet, la FVS est capable de moduler les réponses immunes *via* différents mécanismes tels que la sécrétion de molécules immunosuppressives, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T, l'activation de la maturation des cellules dendritiques et l'induction de lymphocytes T régulateurs [209]. Il existe peu de démonstrations de l'effet anti-fibrotique de la FVS dans la littérature et les données disponibles attribuent cet effet à la présence de CSM dans la TA.

Domergue et al. ont montré un potentiel anti-fibrotique des ASC supérieur à celui la FVS dans un modèle de cicatrice hypertrophique après greffe de peau humanisée chez des souris Nude [210]. L'effet thérapeutique des ASC a été attribué à une plus grande expression du TGFß3 et de l'HGF, médiateurs anti-fibrotiques importants et à des niveaux plus élevés de rapport MMP-2 et du rapport MMP-2/TIMP-2, témoignant d'un remodelage de la matrice extracellulaire.

Il a par ailleurs été montré que la FVS sécrétait un panel plus large de molécules solubles comparé aux ASC [211].

Enfin, notre équipe a également documenté l'effet anti-fibrotique et pro-angiogénique de la FVS dans un modèle murin de fibrose cutanée induit par des injections quotidiennes de bléomycine [212]. La FVS a ainsi, grâce à cette diversité cellulaire, des effets multiples angiogéniques, immunomodulateurs, anti-fibrotiques et trophiques.

c. Essais dans la ScS

En raison d'un risque important d'ischémie lié à l'injection de TA dans les doigts, l'équipe du Professeur B. Granel à Marseille a émis l'hypothèse que l'effet trophique lié à l'injection de cellules de la FVS débarrassée des adipocytes serait bénéfique dans la prise en charge globale du handicap de la main sclérodermique.

L'essai SCLERADEC (NCT01813279), réalisé en 2013, était la première étude pour déterminer l'intérêt de la FVS autologue dans la prise en charge du handicap fonctionnel de la main de patients atteints de ScS [213]. L'objectif de cet essai était d'évaluer la tolérance et l'effet de l'injection sous-cutanée dans les doigts de FVS préparée de façon automatisée avec le dispositif Celution 800/CRS (CytoriTherapeutics, Inc., USA).

Douze patientes sclérodermiques souffrant d'un handicap de la main (score fonctionnel de la main de Cochin supérieur à 20/90) ont été incluses dans cette phase I, monocentrique, en ouvert. Après environ 3 heures de production, les patientes recevaient dans les deux faces latérales de chaque doigt 0,5 mL de FVS.

Quatre évènements mineurs liés à la procédure ont été rapportés : deux ecchymoses abdominales, une paresthésie transitoire sur le côté d'un doigt et une douleur située sur le côté latéral du pouce gauche. Tous ces événements indésirables étaient transitoires et ont guéri spontanément. Aucune complication ischémique ou infectieuse n'a été observée.

Les résultats ont été très encourageants mettant en évidence une amélioration significative du score fonctionnel de la main de Cochin, du score de Raynaud, du Scleroderma Health Assessment Questionnaire (SHAQ) à 6 mois ainsi qu'une réduction du nombre d'ulcères à 12 mois (15 versus 9). Quatre patientes se sont déclarées très satisfaites de la procédure, 5 se disent être satisfaites et 3 sont modérément satisfaite à 1 an.

L'évaluation à 24 mois a montré un bénéfice durable de la FVS sur les différents paramètres analysés (Figure 22) [214].

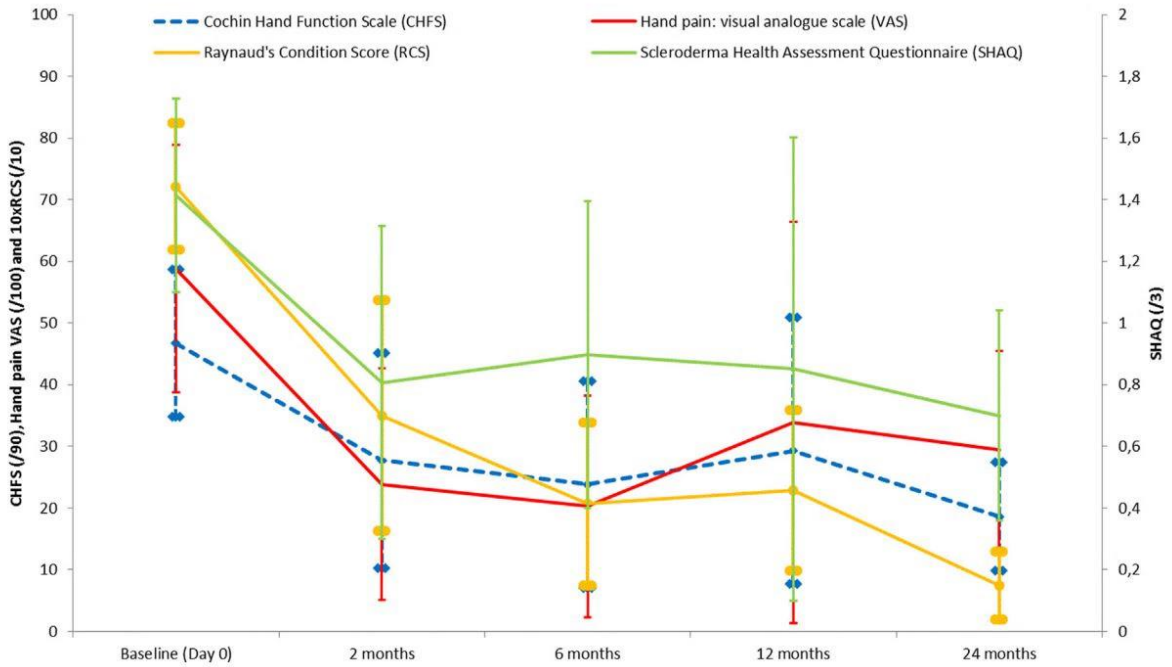


Figure 22: Résultats cliniques de l'essai SCLERADEC jusqu'à 2 ans après l'injection de FVS autologue [214]

Les résultats prometteurs de l'essai SCLERADEC ont alors donné naissance à 2 essais multicentriques randomisés contrôlés versus placebo afin de valider l'efficacité de l'injection de FVS dans le handicap fonctionnel des mains chez les patients sclérodermiques :

- l'essai américain STAR (NCT 02396238) ;
- l'essai français SCLERADEC II (NCT 02558543).

L'essai STAR (NCT 02396238), réalisé aux Etats-Unis et dont le promoteur est la société Cytori Therapeutics a recruté et évalué 88 patients atteints de ScS : 51 atteints de forme cutanée diffuse et 37 de forme cutanée limitée.

L'objectif principal de l'étude, qui reposait sur l'amélioration du handicap de la main évaluée par le score fonctionnel de la main de Cochin, n'a pas été atteint à 24 ou 48 semaines [215].

Cependant, l'analyse en sous-groupe des patients atteints de sclérodermie cutanée diffuse montrait des améliorations significatives du score fonctionnel de la main de Cochin et de l'indice d'évaluation du handicap : Health Assessment Questionnaire–Disability Index (HAQ-DI), paramètre secondaire important évaluant l'incapacité fonctionnelle des patients.

L'essai SCLERADEC II dont l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM) était promoteur a inclus une cohorte de 40 patients (20 patients traités par FVS selon la procédure décrite dans SCLERADEC I et 20 patients par Ringer Lactate). Trois centres participaient à cette étude : Marseille, Rouen et Paris.

Le critère principal de jugement qui était l'amélioration du score fonctionnel de la main de Cochin à 3 mois n'a pas été atteint. Cependant, de nombreux paramètres cliniques et biologiques sont en cours d'évaluation statistique et permettront peut-être d'identifier des marqueurs prédictifs de bonne réponse au traitement, permettant ainsi une meilleure sélection des patients éligibles.

3. Adipose Stem/Stromal Cells

a. Définition

Les ASC peuvent être isolées et expansées par simple mise en culture de la FVS grâce à leur capacité d'adhésion au plastique (Figure 23). Les ASC répondent, comme les CSM issues de moelle osseuse, aux critères de l'IFATS et de l'ISCT cités plus haut et possèdent les mêmes propriétés que les CSM de moelle osseuse. Néanmoins, leur abondance dans le TA et la facilité de prélèvement du TA en font des candidats de choix faisant l'objet de nombreux essais cliniques.

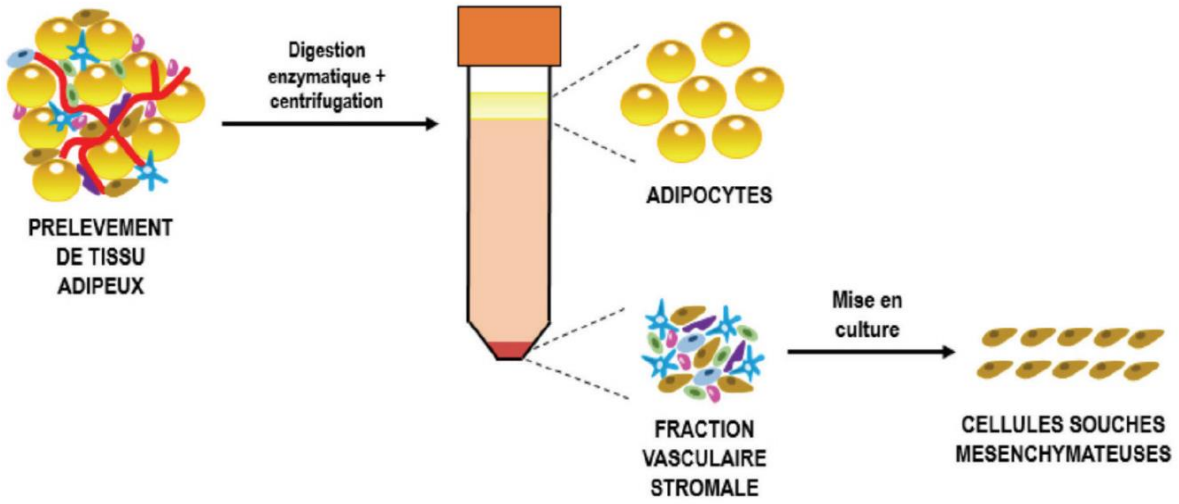


Figure 23 : Schéma d'obtention de la FVS et des ASC depuis le TA [112]

b. Essais et résultats dans la ScS

La première étude évaluant l'injection locale d'ASC chez les patients sclérodermiques est italienne et a été réalisée il y a moins de 10 ans [216]. Cette étude a évalué l'effet de la réinjection de CSM issues du TA chez 6 patients souffrant de sclérodermie localisée (morphée en plaque, morphée généralisée, sclérodermie linéaire, sclérodermie « en coup de sabre »), non évolutive depuis 6 mois.

Le TA était prélevé par liposuccion à partir de la graisse abdominale, puis centrifugé avant d'être adressé dans une Unité de Thérapie Cellulaire pour l'isolement et la culture des ASC *in vitro*.

Trois semaines plus tard, l'injection de $0{,}8.10^6$/ml CSM cultivées *in vitro* et re-suspendues dans une solution d'acide hyaluronique au niveau des zones les plus accessibles était réalisée selon la demande du patient. Le volume injecté variait de 5 à 10 ml selon les zones.

Les zones traitées étaient le visage, les membres et les pieds (Figure 24). Les patients étaient tous suivis sur une durée de 1 an.

La tolérance fut excellente ; la complication la plus fréquente ayant été la présence d'ecchymoses aux zones d'injection. Les patients ont tous jugé « satisfaisant » le résultat obtenu. Les auteurs ont noté l'arrêt de la progression locale de la maladie dans 100% des cas, une amélioration de la souplesse de la peau (83% des cas), une régression de la dyschromie (67% des cas) et la réduction de l'érythème (17% des cas).



Figure 24: Aspect avant (A) et après (B) injection d'ASC [216].

Une autre étude italienne a cette fois évalué l'injection locale d'ASC dans la prise en charge du handicap du visage chez 10 patients souffrant d'atteintes péri-orales et de limitation d'ouverture de la bouche[217]. Cet essai comparait l'efficacité d'ASC expansées à celle de TA purifié.

Ainsi les patients étaient divisés en deux groupes : ceux traités par lipofilling et ceux par ASC. Les deux procédures ont amélioré de façon significative le MHISS, la capacité

d'ouverture maximale de la bouche à 1 an post-intervention sans qu'aucune des deux techniques ne montre une efficacité supérieure comparée à l'autre.

Un essai français de phase II nommé ADUSE va être initié et visera à évaluer l'injection de 40.10^6 d'ASC expansées dans les ulcères digitaux réfractaires des patients sclérodermiques. Il s'agit d'un essai en double aveugle, randomisé contre placebo, prospectif sur 8 centres. Le critère principal de jugement de cet essai est la proportion d'ulcères digitaux ischémiques réfractaires actifs cicatrisés (complets ou partiels) sans récidive à 16 semaines post-injection. Trente-deux patients seront inclus dans cette étude.

Enfin, les CSM issues de la moelle osseuse sont aussi à l'étude dans des applications locales. Un essai contrôlé, randomisé contre placebo, en double aveugle évaluant l'injection intramusculaire de CSM de moelle osseuse dans les ulcères digitaux est en cours chez 20 patients sclérodermiques (NCT 03211793) [218].

La quantité totale de CSM injectée est de 50.10^6 de cellules et sera répartie en 8 sites d'injection au niveau de la paume, du dos de la main et de l'avant-bras.

Le critère principal de cet essai MANUS (Mesenchymal stromal cells for Angiogenesis and Neovascularization in digital Ulcers of Systemic Sclerosis) est la toxicité à 12 semaines post-injection et les critères secondaires sont le délai de cicatrisation des ulcères digitaux, le handicap de la main, la qualité de vie et l'activité de la maladie. Les patients seront suivis jusqu'à 52 semaines après la procédure.

La mise au point de thérapies innovantes d'utilisation locale pour la prise en charge du handicap de la main ou du visage est indispensable pour soulager les lésions déjà développées chez les patients sclérodermiques. La découverte de cellules souches dans le TA a totalement révolutionné le champ de la médecine régénérative. En effet, initialement utilisé pour son effet volumateur, le TA possède des propriétés trophiques et régénératives attribuées aux CSM et PE qu'il contient. Depuis, plusieurs produits de thérapie cellulaire sont à l'essai dans la ScS. Parmi eux, la FVS et les ASC ont montré des résultats encourageants dans la prise en charge des complications de la ScS tels que les ulcères digitaux.

PARTIE 3 :

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL :

Impact de la ScS sur l'effet paracrine des ASC

Parmi les nouvelles stratégies innovantes à l'étude dans la prise en charge de la ScS, figurent les thérapies cellulaires dérivées du TA. L'emploi de ces approches autologues reposent sur plusieurs modalités qui diffèrent par le degré de complexité du procédé d'ingénierie cellulaire mis en œuvre pour préparer le produit cellulaire à partir du prélèvement de TA.

Le procédé le plus simple consiste à utiliser le TA purifié par la centrifugation d'un lipoaspirat destinée à éliminer la fraction liquide (liquide d'infiltration, phase huileuse et cellules sanguines) du prélèvement. Cette technique est une procédure simple, mais qui ne peut être réalisée le long des doigts en raison d'un risque important d'ischémie.

Cette limite à conduit l'équipe de médecine interne du Professeur B Granel en collaboration avec le laboratoire de thérapie cellulaire de Marseille dirigé par le Professeur F. Sabatier à développer une stratégie basée sur les cellules de la FVS séparées des adipocytes. En effet, une fois remises en suspension, les cellules de la FVS constituent un produit suffisamment fluide pour être compatible avec une injection sous-cutanée au niveau des faces latérales des doigts des patients sclérodermiques.

Les travaux précliniques de ce projet ont démontré un effet anti-fibrosant et pro-angiogénique de l'injection sous-cutanée de FVS issue du TA dans un modèle murin de sclérodermie cutanée induite par la bléomycine [212].

Par la suite l'essai SCLERADEC promu par l'AP-HM en 2013, a fourni la première étude déterminant l'intérêt de la FVS autologue dans la prise en charge du handicap fonctionnel de la main de patients atteints de ScS [213].

Ces résultats ont motivé la réalisation d'un essai de phase II intitulée SCLERADEC II dont le critère principal de jugement (l'amélioration du score fonctionnel de la main de Cochin à 3 mois) n'a pas été atteint.

Cependant de nombreux paramètres exploratoires cliniques et biologiques (phénotypage, clonalité, rendement...) sont en cours d'évaluation statistique afin de déterminer s'il existe une corrélation entre certaines caractéristiques biologiques de la FVS et des évaluations cliniques.

Dans les approches par thérapie cellulaire, le caractère autologue représente un avantage majeur car il évite le risque immunologique. Néanmoins, il nécessite de considérer l'impact potentiel de la maladie sur les propriétés biologiques des cellules.

Celui est peu documenté pour la FVS du TA; cependant notre équipe a montré que les FVS issues de patients sclérodermiques présentent une signature transcriptionnelle représentative du contexte vasculaire et fibrotique de la maladie associée à une réduction modérée du potentiel de réparation endothéliale [219].

Ces résultats concernant la FVS ont suscité des explorations plus approfondies concernant les différentes composantes cellulaires qu'elle contient, afin d'envisager des techniques d'ingénierie cellulaire capables de maximiser le potentiel thérapeutique de ce thérapeutique dans le contexte de la ScS.

Ainsi, nous nous sommes intéressés à la composante mésenchymateuse de la FVS. En effet, les ASC ou Adipose Stromal/Stem Cells, composant majoritaire de la FVS, ont déjà fait l'objet de diverses études cliniques dans la ScS détaillées dans la partie 2 de ce travail. Cependant, le développement de nouvelles stratégies autologues par les ASC nécessite de clarifier les altérations éventuellement induites par la ScS sur ces cellules.

Puisque les effets paracrines sont considérés comme le principal mécanisme d'action thérapeutique des ASC, l'objectif de ce travail expérimental était de déterminer dans quelle mesure les ASC issues de patients sclérodermiques maintiennent leurs propriétés paracrines pro-angiogénique et anti-fibrotique.

Les résultats de ce travail réalisé au Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN, Faculté de Pharmacie, Marseille) ont fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique, soumis au *Journal of Clinical Medicine,* exposé ci-dessous.

Article

Adipose-derived Stem Cells from Systemic Sclerosis patients maintain their pro-angiogenic and anti-fibrotic paracrine effects in vitro

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

1 Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, C2VN, Marseille, France ; melanie.velier@univ-amu.fr, stephanie.simoncini@univ-amu.fr ; pauline.francois@univ-amu.fr ; aurelie.daumas@univ-amu.fr ; brigitte.granel@univ-amu.fr ; francoise.dignat-george@univ-amu.fr ; jeremy.magalon@univ-amu.fr ; florence.sabatier@univ-amu.fr

2 Cell Therapy Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, INSERM CIC BT 1409, Marseille, France ; melanie.velier@ap-hm.fr ; pauline.francois@ap-hm.fr ; jerermy.magalon@ap-hm.fr ; florence.sabatier@ap-hm.fr

3 Plastic Surgery Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France; maxime.abellan-lopez@ap-hm.fr; baptise.bertrand@ap-hm.fr

4 Internal Medicine Department, Hôpital Nord & Hôpital de la Timone, AP-HM, Marseille, France, aurelie.daumas@ap-hm.fr ; brigitte.granel@ap-hm.fr

5 R&D Department, Macopharma, Mouvaux, France, sandy.eap@macopharma.com ; anais.lagrange@macopharma.com ; bruno.delorme@macopharma.com

* Correspondence: florence.sabatier@ap-hm.fr

1. Introduction

Systemic Sclerosis (SSc) is a rare and multifaceted systemic autoimmune disease. Although the pathogenesis of SSc remains elusive, it is generally accepted that initial vascular injury due to autoimmunity might result in the constitutive activation of fibroblasts and fibrosis affecting skin and multiple organs. All of these three processes interact and result in a polymorphous spectrum of clinical and pathologic manifestations of SSc (1). In rapidly progressive SSc forms, mortality rates reach 30 to 50 % in the first 5 years after disease onset, according to the extent of skin, cardiopulmonary, and renal involvement (2). Current therapeutic approaches are still insufficient to stop the evolution of the disease and cure the already developed fibrosis lesions. No treatment has ever shown any benefit in the severe forms of SSc expect autologous hematopoietic stem cells transplantation that can reduce significantly the morbimortality but displays a high toxicity (3–5). In this context, new innovative cell-based therapies are currently being developed with the hope of long-term benefit and better tolerance. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSC) are multipotent progenitors that can be isolated from several tissues including adipose tissue, umbilical cord or placenta (6). The discovery of MSC trophic and immunomodulatory properties accelerated the development of MSC-based therapies not only in regenerative medicine but also for autoimmune diseases (7). MSC also have anti-fibrotic (8) and angiogenesis (9) promoting capacities, that might counteract the main pathogenic mechanisms of SSc. The therapeutic potentials of MSC have been largely attribute to their paracrine actions. Soluble mediators and extracellular vesicles produced by MSC play a pivotal role in immunomodulation and tissue repair (10). Adipose tissue represents an advantageous source of MSC due to its abundance and ease to harvest. Adipose-derived Stromal/Stem cells (ASC) have been assessed in several *in vivo* models of SSc with promising results. Three studies tested ASC in bleomycin-induced SSc model and showed a reduction or a prevention of lung fibrosis (11–13). Beside, Maria et al demonstrated that ASC from healthy donors (HD) can reduce some fibrotic and inflammatory markers and promote matrix remodeling in skin and lungs through a hypochlorous acid (HOCl-) murine model of diffuse SSc (14).

Early phase clinical trials evaluating local injections of autologous ASC in the face or the hand of patients suffering from SSc have provided encouraging results. Scuderi et al showed that transplantation of ASC in a hyaluronic acid solution improved significantly the tightening of the skin (15). Another study compared fat grafting and injection of autologous ASC in the mouth functional disability of SSc patients and found that both procedures obtained satisfying results on month opening and reduction of pain (16). Our group also reported the safety and potential efficacy of autologous adipose derived stromal vascular fraction, of which uncultured ADSC represent the major

cell subset, in hand disability and Raynaud syndrome of SSc patients (17,18). However autologous MSC based therapies are still under debate (19–22), notably concerning the potential alterations of cells from SSc patients. Although most of the studies focused on bone marrow derived MSC, controversies exist about ASC. Recent reports of altered molecular signatures of ASC from SSc patients suggested that their angiogenic and ant-fibrotic activities could be compromised (23–25) but evidences from functional investigations are still lacking.

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

2. Experimental Section

2.1. Donor specifications

ASC from HD (n=7) were obtained from surgical residues of adipose tissue after liposuction for aesthetic purpose. ASC from SSc patients (n=7) were obtained from surgical residues of adipose tissue after a routine care lipotransfer procedure. All patients and HD gave informed consent for the scientific use of the surgical residues.

2.2. ASC isolation and expansion

Adipose tissue harvesting was performed using a standardized method in a closed circuit with a 3 mm Coleman cannula. Once harvesting was complete, the bag was immediately transported to the registered Cell Therapy Unit. The collected lipoaspirate was washed with Ringer Lactate (Baxter Inc, Opelika, AL, USA) and enzymatically digested with collagenase NB5 (SERVA) 0.25 U/mL during 45 minutes at 37°C. The cells were concentrated, washed, aseptically recovered and resuspended in lactate Ringer's solution. This cell suspension was than plated into a 75T flask in a Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 Nutrient Mixture (DMEM/F-12) culture medium supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS) medium and antibiotic solutions. The culture medium was changed every 48 hours until 80% of confluence was reached. Adherent cells were then detached with Trypsin-EDTA and passed to extend the culture. ASC were used at passage 3 to 5 for all experiments.

2.3. Phenotype analysis

The expression of a panel of surface markers was assessed, following previously described protocol (26). For each antigen tested, 200,000 cells re-suspended in cold Phosphate Buffered Saline (PBS) were

incubated with the phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody at saturating concentration, for 30 min in the dark at +4°C. Antibodies and isotype controls were purchased from Becton-Dickinson (CD29, CD34, CD40, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, IgG1 and IgG2b) or Beckman Coulter (CD80, CD86 and HLA-DR). Appropriate PE-conjugated isotype-matched controls were included. Cells were then washed twice with PBS Ca++/Mg++ by centrifugation at 300 g for 5 min. Labelled HD-ASC (ASC extracted from healthy donors) and SSc-ASC (ASC extracted from patients suffering from SSc) were finally resuspended in 200 µL of CellFix (Becton-Dickinson) and processed immediately for flow cytometric analysis. Acquisitions were performed using an ACCURI™C6 flow cytometer equipped with 488 nm argon laser (Becton-Dickinson). At least 10,000 events were recorded for each analysis. Data were analyzed with the BD CSampler software (Becton Dickinson).

2.4. Differntiation potential

Adipogenic and osteogenic differentiation capacity was assessed by seeding HD-ASC and SSc-ASC at 10,000 cells/cm^2 on an appropriate surface: 12-well plates, 24-well plates and T25 flasks. Adipogenic and osteogenic differentiations were induced using specific induction medium. Adipogenic differentiation was induced using DMEM low glucose supplemented with 10% FBS, 1µM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich) and 60µM indomethacine (Sigma-Aldrich). After 14 days of culture, the adipogenic differentiation was revealed using Oil Red O staining, as previously described *(26,27)*. Briefly, the cell layer was stained with 1.8 g/L Oil Red O (Sigma-Aldrich) for 30 min. Lipid droplets in the cytoplasm of the cells appeared to be stained in red. The accumulation of triglycerides was quantified with a commercially available kit according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cell layer was washed with PBS and incubated with the AdipoRed™ reagent (Lonza) for 10 min. The fluorescence was measured using an Infinite1 M200 PRO spectrometer (Tecan). The parameters used were: excitation wavelength at 485 nm, emission wavelength at 572 nm and gain at 90. The results were obtained using i-control™ microplate reader software (Tecan).

After 21 days of culture, the osteogenic differentiation was revealed using Alizarin Red S, as previously described (26,27). Osteogenic differentiation was induced using DMEM high glucose supplemented with 10% FBS, 0.1 µMdexamethasone, 25 µg/mL L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich) and 3mM NaH2PO4 (Sigma-Aldrich). Briefly, the cell layer was stained with 2% Alizarin Red S at pH 4.3 (Sigma-Aldrich) for 30 sec to 5 min. The staining reaction was stopped with distilled water. Calcium deposits appeared to be stained red-orange. Calcium content measurement was performed with commercially available kits (Interchim), in accordance with the manufacturer's instructions. After differentiation of HD-ASC and SSc-ASC under the different culture conditions tested, the expression

of respective specific markers of differentiation was assessed by RT-qPCR. Quantitative RT-qPCR was performed using the SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), PrimePCR assay (Bio-Rad) and cDNA in a CFX 1000 Touch System (Bio-Rad). The amounts of fatty acid-binding protein 4 (FABP4) and alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL) were normalized to that of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, $\Delta C_T = C_{T\ \text{gene of interest}} - C_{T\ \text{GAPDH}}$).

2.5. Senescence Associated β Galactosidase staining

SA-ß-Gal activity was performed using the Promokine Senescence detection kit (PromoCell) according to the manufacturer's instructions. Percentage of SA ß-gal positive cells was counted in 10 randomly selected microscopic fields (20x magnification) for each well.

2.6. Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was conducted by using a propidium iodide-based flow cytometry protocol. ASC (100,000 cells / well in 6-well culture dishes) were incubated for 48hours in basal medium, harvested, fixed with 70% cold ethanol, and stained with propidium iodide. At least 10,000 events were acquired per sample with a Gallios flow cytometer system and analyzed using Kaluza® Analysis software (Beckman Coulter).

2.7. Analysis of ASC secretome

ASC were seeded at a density of 100,000 ASC/well in 6-well culture dishes with DMEM/F-12 supplemented with 10% FBS during 24h and the medium was then replaced by 1ml of DMEM supplement with 1% of FBS/well. The conditioned medium was recovered after 48 hours and then centrifuged 300g for 5 minutes. Quantification of soluble factors (Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A), Matrix metalloproteinase -2 (MMP-2), Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1 (TIMP-1), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Transforming Growth Factor β1 (TGFβ1)) were performed with the Luminex method in accordance with the manufacturer's instructions. The 96-well plates were run on a Bio-Plex® MAGPIXTM Multiplex Reader using Bio-Plex Manager software (Bio-Rad). Concentrations were calculated based on 7-point standard curves using a five-parametric fit algorithm. Only data that fell within the documented assay range and passed the quality control measures provided by the manufacturer were considered.

2.8. RT-qPCR analysis

Total RNA was isolated from the ASC of HD and SSc using RNeasy Mini kits (Ambion), including a DNase I digestion to step remove genomic DNA. Concentration was determined using the NanoVue

spectrophotometer (Biochrom). A specific quantity of RNA (600ng) was converted to cDNA using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems). Real-time PCR amplification was performed with the Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) using pre-designed primers (Applied Biosystems) on a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The cycling conditions were as follows: 2 minutes at 50°C (UNG incubation), 2 minutes at 95°C (polymerase activation) followed by 40 cycles of 1 s at 95°C (denaturation) and 20 s at 60°C (annealing/elongation). References of primers used for gene-specific amplification are listed in Table 1. CT-values of technical duplicates were averaged and relative quantification of all mRNAs of interest was performed based on the $2^{-\Delta C_T}$ method with mRNA expression of GAPDH.

2.9.Co-culture conditions

ASC from both HD and SSc patients were first co-cultured with dermal fibroblasts (DF) from SSc patient. DF were isolated after an enzymatic digestion (collagenase NB5, 0.25 U/mL during 45 minutes at 37°C) of a skin biopsy and seeded at a density of 144,000cells / well in 6-well culture dishes in a DMEM-10% PBS medium. The medium was changed with a DMEM-0.5% FBS medium 24h later. The day after, 288,000 ASC were placed into the top chamber using a transwell insert. The transwell insert (Greiner) had pore of 0.4 µm diameter to permit movement of cytokines between chambers. After 5 days of co-cultivation, western blot assays and collagen quantification were performed on protein lysates of fibroblasts.

Then, HD-ASC and SSc/ASC were co-cultured with Human Microvascular Endothelial Cells- dermal Adults (HMVEC-dA, C-12212, Promocell) in an indirect co-culture model with a transwell insert of 0.4 µm diameter for 24h. 100 000 HMVEC-dA were seeded in a 6-well culture dishes. They were incubated overnight with an endothelial basal cell culture medium-2 (C-22211, Promocell) -1%PBS medium. The day after, 600,000 ASC were placed into the top chamber using a transwell insert (0.4 µm diameter) for 24 hours. Then the HMVEC-dA were trypsinazed and tested immediately in angiogenic *in vitro* assays (tube formation assays and spheroid assays).

2.10. Western blot analysis

Proteins were extracted from cell layers from 6-well-plates and subjected to SDS-PAGE using NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Protein Gels (ThermoFisher Scientific). SDS-PAGE was run at 200 V for 60 min, followed by electroblotting of proteins (90 min at 0.5 A and 4°C) onto Nitrocellulose C+ membranes. Immuno-detection was carried out in Tris-buffered saline supplemented with 0.1 % Tween-20) and 3 % BSA (bovine serum albumine). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies for detection of α-SMA (alpha Smooth Muscle Actin) (#A5228, Sigma Aldrich) and

GADPH (#2118C, Cell Signaling). Subsequently, blots were incubated with secondary goat-anti-rabbit or goat-anti-mouse antibodies (Abcam, Cambridge, UK) for 1h at room temperature. Immunocomplexes were visualized by chemiluminescence using ECL according to manufacturer's instructions (Pierce). A G-BOX Imaging System (GeneSys) was used to catch up the specific bands, and the optical density of each band was measured using specific software (GeneTools, Syngene). All proteins for each panel were assessed on one membrane, therefore GAPDH expression need to be determined once to control for loading for all these proteins. The difference between the proteins of interest and the control loading protein of the same sample was calculated as relative content and presented graphically. For statistical analyses signals were further normalized to the control group (untreated DF).

2.11. Collagen content quantification

Proteins were extracted from cell layers from 6-well-plates after 5-days of co-culture with ASC. This method is based on the quantitative dye binding Sircol method (Biocolor). Samples were centrifuged at 12,000 g for 5 min and 80 µl of each sample were added to 1ml of Syrius red reagent. Tubes were rocked at room temperature for 30min and centrifuged at 12,000 g for 10min. The supernatants were discarded and tubes washed with 750 µl of ice-cold salt acid. After another 12,000 g centrifugation for 10min, the collagen-dye pellets were suspended in 1ml of Alkali Reagent. Optical Density (OD) of samples and standard range of bovine collagen type I concentrations was read at 555 nm on a microplate reader Multiskan Ascent (Thermo Electron). Results were expressed as collagen content in µg.

2.12. Tube formation assays

HMVEC-dA resulting from the co-culture with HD-ASC (n=4) and SSc-ASC (n=6) was were loaded at a density of 20,000 cells/well in a µ-slide angiogenesis (81506,IBIDI) system coated with 10 µl of growth factor-reduced Matrigel™ (6 mg/ml) (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, Phenol Red Free, 356231), previously polymerized for 30min, and were maintained in EBM2 supplemented with MV SingleQuots (EGM2-MV) (Lonza) at 37°C with 5% CO2. Capillary-like structures were recorded after 6 hours using a Leica DMI8 video-imaging inverted microscope equipped with an Incubator I8 at 5x magnification and were captured using Leica Application Suite X software (Las X 3.0.2.16120). The number of meshes and nodes were quantified using NIH ImageJ software with the Angiogenesis Analyzer plug-in developed by Gilles Carpentier. Each experiment was performed in triplicate.

2.13. Spheroid-based sprouting assay

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

2.14.Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA) and IBM SPSS software package (SPSS Statistics for Windows, version 17.0). Quantitative variables are reported as the mean ± SD or the median with range (min-max) according to the normality of their distribution. Continuous variables were compared using Student's t-test or the nonparametric Mann-Whitney t-test. One-way analysis of variance (ANOVA) was employed to compare more than two groups and two-way ANOVA statistical analysis, followed by a post-hoc Bonferroni test for multiple comparison, was applied. A p-value <0.05 was considered to represent a statistically significant difference.

3. Results

3.1. Characteristics of the patients

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

3.2. Characterization of ASC

3.2.1. Morphology and Phenotype

ASC were first characterized according to ISCT criteria. In the condition of cellular expansion, both HD-ASC and SSc-ASC were small, fusiform, spindle-shaped plastic adherent cells (Figure 1A), a typical morphology of mesenchymal stem/stromal cells (Figure 1A) (30). We next analyzed membrane marker expression of HD-ASC and SSc-ASC in accordance with ISCT guidelines (31). Our results showed that both population of cells express typical membrane markers of mesenchymal stromal cells (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105) and did not express hematopoietic markers (CD34 and CD45) or major histocompatibility complex class II (HLA-DR). We also verified that culture conditions did not induce the expression of co-stimulatory molecules. Both HD-ASC and SSc-ASC were found negative for the expression of CD40, CD80 and CD86 markers (Table 3). Results are presented in percentage of positive cells (means ± SD).

3.2.2. Differentiation

The differentiation potential of HD-ASC and SSc-ASC toward adipogenic and osteogenic lineages after appropriate induction was investigated (Figure 1). Oil Red O staining revealed that HD-ASC and SSc-ASC efficiently differentiated into the adipogenic lineage (Figure 1B). Under adipogenic induction, cells appeared bigger, more oval and we observed large lipid droplet accumulation inside the cytoplasm of the cells (stained red), while the undifferentiated cells maintained their original spindle-shaped morphology and the formation of lipid granules was not observed (data not shown). The quantification of triglycerides showed a significant accumulation after 14 days of differentiation whatever the cellular populations studied (Figure 1D). Finally, the expression of FABP4, an adipogenic-specific gene, was analyzed using RT-PCR after expansion of the cells in an FBS+bFGF-medium, before (day 0 or D0) and after differentiation (day 14 or D14). The level of mRNA expression of FABP4 was significantly increased after adipogenic induction at D14 (Figure 1E).

HD-ASC and SSc-ASC amplified in FBS+bFGF-containing medium had also the ability to differentiate in osteoblasts, as assessed by the Alizarin Red S staining (Figure 1C). After 3 weeks under osteogenic stimuli, we observed the presence of calcium deposits (stained red);

while the undifferentiated cells did not present calcium deposits (data not shown). The concentration of calcium deposit in the extracellular matrix significantly increased at D21 compared to D0 for HD-ASC and SSc-ASC (Figure 1F). Lastly, the expression of (ALPL), a key osteogenic-specific gene, was analyzed by RT-PCR before (day 0 or D0) and after differentiation (day 21 or D21, Figure 1G). The level of mRNA expression ALPL was significantly increased after osteogenic induction at D21 for both type of cells. Altogether, our results showed that HD-ASC and SSc-ASC differentiation potential in adipocytes and osteoblasts was comparable, whatever the cellular population studied. Our results also showed that both cellular populations presented typical human mesenchymal stromal cells features

3.3. Senescence markers of ASC

Using SA- β-Galactosidase staining, we revealed the absence of statistical difference between HD-ASC and SSc-ASC senescence percentage ($p>0.05$) (Figure 2A-2B). To confirm the absence of senescence, we analyzed the cell cycle distribution by flow cytometry. This characterization shows that the percentage of quiescent cells (G0/G1), replicative cells (S) and in division cells (M) are equivalent in HD-ASC and SSc-ASC ($p>0.05$) (Figure 2C-2D).

3.4. RT-qPCR anlaysis and secretome analysis

We then investigated the mRNA expression of a set of genes relevant for the pro-angiogenic and anti-fibrotic potential of ASC. RT-qPCR analyses showed that the expression level of VEGF-A transcripts tended to be decreased in SSc-ASC compared to HD-ASC ($p=0.16$). No Significant difference was observed in mRNA levels of αSMA, COL1A1, COL3, MMP-2, MMP-1, TIMP-1, TGFβ1, HGF (Figure 3). Consistently, results of secretome analysis confirmed a trend toward a lower level of secreted VEGF-A ($p=0.20$) in SSc-ASC and did no evidenced any significant difference for the other markers evaluated in the two groups. (Table 4).

3.5. Pro-angiogenic paracrine activity of ASC

The sprouting ability of HMVEC-dA was first evaluated using in a 3D spheroid assay *in vitro* performed after co-culture in the presence of SSc-ASC or HD-ASC (Figure 4A-4B). Quantitative data indicated that the average sprout length was significantly reduced in HMVEC-dA co-cutlivated with SSc-ASC compared to ones exposed to HD-ASC. The total network length was also reduced is

response to SSc-ASC although difference between the two groups could not reach statistical significance. The HMVEC-dA dependent formation of capillary-like structures, as evaluated in Matrigel™ assay, was not significantly different between HMVEC-dA stimulated with SSc-ASC and HD-ASC (Figure 4C-4D). Taken together, these data demonstrated that SSc-ASC maintained a notable paracrine angiogenic effect on endothelial cells but this is partially reduced compared to that of HD-ASC.

3.6. Anti-fibrotic paracrine potential of ASC

Finally, we aimed at evaluating the paracrine anti-fibrotic potential of ASC as assessed by expression of the myofibroblast marker αSMA and collagen content in DF isolated from SSc patients and co-cultured in insert with ASC for 5 days. Western blot analysis performed on protein lysates of DF showed that the secretory activity of SSc-ASC induced a significant reduction of α-SMA in DF compared to non-treated DF (Figure 5A-5B) while the impact of HD-SSC was heterogeneous among donors and non-significant. Soluble collagen contents were significantly decreased in both the DF stimulated by SSc-ASC or HD-ASC compared to untreated DF (Figure 5C). Altogether, these data demonstrated an anti-fibrotic paracrine activity of ASC from SSc patients *in vitro*.

4. Discussion

ASC-based therapy represents a real hope for patients suffering from an advanced form of SSc. However, important questions related to the maintenance of their beneficial biological properties in the autologous context have to be completely elucidated. In addition, identification of *in vitro* functional tests that behave as potency assays, i.e able to anticipate their clinical results, should permit a better selection of the patients that can benefit from these innovative therapies. In such attempt, evaluating the paracrine activity of ASC from SSc patients in terms of pro-angiogenic and anti-fibrotic impact is worth considering. Main novelty of our study is to demonstrate that the secretory activity of SSc-ASC gives them a significant capacity to reduce fibrosis *in vitro*. Moreover, pro-angiogenic potential of ASC isolated from SSc patients is maintained, albeit slightly reduced compared to HD-ASC. These data may support further clinical developments of autologous ASC in the management of SSc patients for whom conventional therapies are no longer an option.

Although several studies have evaluated the phenotypic and functional characteristics of Bone Marrow-MSC (BM-MSC) from patients suffering from SSc, few data referred to the impact of SSc on MSC extracted from the adipose tissue. Our results confirm that SSc-ASC display similar expansion potential, adipogenic or osteogenic differentiation potential and usual phenotype compared to HD-

ASC. This is consistent with early studies performed on BM-MSC and ASC from SSc patients(32–34) However, Virzì et al. found that SSc-ASC display multilineage differentiation ability but an incomplete mesenchymal maturation phenotype impairing complete differentiation (25). This alteration was related to a pro-inflammatory microenvironment characterizing adipose tissue. Therefore, it is likely that the heterogeneous inflammatory status of the selected SSc patients may impact the differentiation capacity of ASC.

The senescence status of MSC is of paramount importance for their therapeutic use, as an accelerated senescence not only impedes the *in vitro* expansion process necessary to obtain a sufficient dose of cells, but also evokes deleterious changes in the secretome and biological properties of MSC (35). In contrast to the previous report on BM-MSC (36), we demonstrated here that SSc-ASC do not exhibit a more senescent phenotype compared to HD-ASC. In a context where senescence, notably associated with a decreased in sirtuins activity, is emerging as a pathophysiological contributor to scleroderma, this result adds to the benefit of using adipose tissue as MSC source for therapeutic purpose (37).

The paracrine promotion of angiogenesis is highly expected in the SSc context, notably when local MSC-based therapies are used to limit vascular manifestations and digital ulcers. We found that the paracrine factors produced by SSc-ASC maintained a significant capacity to stimulate angiogenic activity of microvascular endothelial cells *in vitro*. This is consistent with our previous study on adipose-derived stromal vascular fraction (AD-ASVF) from SSc patients showing a slight reduction of the *in vivo* neovascularization potential compared to AD-SVF from HD (38). Nevertheless, this paracrine potential was attenuated compared to the one of HD-ASC. The difference was mainly observed in spheroids assays indicating that only early stages of angiogenesis (sprouting) are altered, whereas organization of endothelial cells into capillary-like structures in Matrigel™ involving mainly proliferation, migration and invasion properties, was enhanced in a comparable extend by both SSc- and HD-ASC. Besides, we found no major difference in the expression level of some relevant soluble factors involved in angiogenic effect of ASC. Our results are in line with those reported by Capelli et al. who assessed the extent to which the ASC enhance the angiogenic activity of endothelial cells in a direct coculture *in vitro* model. They found that both SSc- and HD-ASC improved the branching index of endothelial cells (34). Taken together these data suggest that the impact of SSc on the pro-angiogenic capability of ASC does not constitute a major obstacle to using autologous cells for vascular repair/regeneration. However, identification of specific mechanisms responsible of the weakened ASC-induced paracrine stimulation of endothelial cells sprouting may deserve further studies.

Other groups have described the potential involvement of organ-resident perivascular MSC-like cells and BM-MSC in myofibroblast generation during fibrosis development associated to SSc (39,40).

However, in SSc patients, transfer of adipose tissue enriched in autologous ASC was recently shown to improve the orofacial fibrosis (41). We report here the first assessment of the paracrine antifibrotic potential of SSc-ASC using indirect coculture experiments performed with patients-derived DF. Consistent with the presence of antifibrotic factors in SSc-ASC, such as HGF, TIMP-1 and MMP-2, we found that these cells reduce the αSMA expression level and collagen content in DF from SSc patients, demonstrating a significant anti-fibrotic paracrine effect *in vitro*. These data seem in contrast with recent *in silico* analysis of miRs highlighting a pro-fibrotic signature of ASC from SSC patients (23). In addition, sera from SSc patients were shown to favor the differentiation of healthy ASC into profibrotic myofibroblast-like cells *in vitro* (42).

Of note, our approach allowed to address the global functional effect of ASC secretome and was performed in the presence of fibroblasts from SSc patients. Thus, our results may suggest that ASC paracrine antifibrotic functions are finely tuned by the disease-associated microenvironment and that ASC are prone to activate compensatory mechanisms aimed at restoring local homeostasis. In support of this hypothesis, such adaptability of MSC to microenvironmental factors have been already proposed for their immunomodulatory properties (43).

In conclusion, our data indicate that the paracrine angiogenic and properties of autologous ASC are compatible with a potential benefit of ASC-based therapy in scleroderma patients. These further encourage the clinical evaluation of such emerging strategies. They also provide additional support to the development of cell-free therapies based on the secretome of ASC. Finally, future analysis of the relationship between these paracrine activities evaluated *in vitro* and the corresponding impact of ASC-based therapy in reducing clinical manifestations of SSC will permit the definition of accurate potency assays. Such tests may allow to better select putative responder patients and optimize these promising cell-based therapies.

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

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

References

1. Del Papa N, Zaccara E. From mechanisms of action to therapeutic application: A review on current therapeutic approaches and future directions in systemic sclerosis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2015;29(6):756-69.

2. Fransen J, Popa-Diaconu D, Hesselstrand R, Carreira P, Valentini G, Beretta L, et al. Clinical prediction of 5-year survival in systemic sclerosis: validation of a simple prognostic model in EUSTAR centres. Annals of the Rheumatic Diseases. 1 oct 2011;70(10):1788-92.

3. 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. 04 2018;378(1):35-47.

4. 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. 25 juin 2014;311(24):2490-8.

5. Burt RK, Farge D. Systemic sclerosis: Autologous HSCT is efficacious, but can we make it safer? Nat Rev Rheumatol. 2018;14(4):189-91.

6. da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. Journal of Cell Science. 9 mai 2006;119(11):2204-13.

7. Rozier P, Maria A, Goulabchand R, Jorgensen C, Guilpain P, Noël D. Mesenchymal Stem Cells in Systemic Sclerosis: Allogenic or Autologous Approaches for Therapeutic Use? Front Immunol. 2018;9:2938.

8. Wu Y, Huang S, Enhe J, Ma K, Yang S, Sun T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. Int Wound J. déc 2014;11(6):701-10.

9. Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, Gervois P, Ratajczak J, Struys T, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. Pharmacol Ther. août 2014;143(2):181-96.

10. Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse H-F, Lian Q. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy: Current Status and Perspectives. Cell Transplant. sept 2014;23(9):1045-59.

11. Lee SH, Lee EJ, Lee SY, Kim JH, Shim JJ, Shin C, et al. The effect of adipose stem cell therapy on pulmonary fibrosis induced by repetitive intratracheal bleomycin in mice. Experimental Lung Research. 16 mars 2014;40(3):117-25.

12. Uji M, Kureya Y, Yamada K, Watanabe T, Konishi K, Asai K, et al. Effect of intratracheal administration of adipose-derived stromal cells on bleomycin-induced lung injury in a rat model. In: 33 Mechanisms of Lung Injury and Repair [Internet]. European Respiratory Society; 2015 [cité 25 août 2019]. p. PA943. Disponible sur: http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/13993003.congress-2015.PA943

13. Tashiro J, Elliot SJ, Gerth DJ, Xia X, Pereira-Simon S, Choi R, et al. Therapeutic benefits of young, but not old, adipose-derived mesenchymal stem cells in a chronic mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Translational Research. déc 2015;166(6):554-67.

14. Maria ATJ, Toupet K, Bony C, Pirot N, Vozenin M-C, Petit B, et al. Antifibrotic, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in HOCl-Induced Systemic Sclerosis: MESENCHYMAL STEM CELLS IN MURINE SSc. Arthritis & Rheumatology. avr 2016;68(4):1013-25.

15. Scuderi N, Ceccarelli S, Onesti MG, Fioramonti P, Guidi C, Romano F, et al. Human adipose-derived stromal cells for cell-based therapies in the treatment of systemic sclerosis. Cell Transplant. 2013;22(5):779-95.

16. Onesti MG, Fioramonti P, Carella S, Fino P, Marchese C, Scuderi N. Improvement of Mouth Functional Disability in Systemic Sclerosis Patients over One Year in a Trial of Fat Transplantation versus Adipose-Derived Stromal Cells. Stem Cells Int. 2016;2016:2416192.

17. Granel B, Daumas A, Jouve E, Harlé J-R, Nguyen P-S, Chabannon C, et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. Ann Rheum Dis. déc 2015;74(12):2175-82.

18. Daumas A, Magalon J, Jouve E, Truillet R, Casanova D, Giraudo L, et al. Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. Curr Res Transl Med. mars 2017;65(1):40-3.

19. Di Benedetto P, Cipriani P, Ruscitti P, Liakouli V, Giacomelli R. Adipose stromal vascular fraction and regenerative therapy in SSc: response to the article by Magalon et al. Ann Rheum Dis. 2 févr 2019;

20. Magalon J, Velier M, Simoncini S, Dignat-George F, Granel B, Paul P, et al. Response to: « Adipose stromal vascular fraction and regenerative therapy in SSc: response to the article by Magalon et al » by De Benedetto et al. Ann Rheum Dis. 20 févr 2019;

21. Manetti M. Could autologous adipose-derived stromal vascular fraction turn out an unwanted source of profibrotic myofibroblasts in systemic sclerosis? Ann Rheum Dis. 13 mars 2019;

22. Velier M, Magalon J, Simoncini S, Dignat-George F, Granel B, Paul P, et al. Response to: « Could autologous adipose-derived stromal vascular fraction turn out an unwanted source of profibrotic myofibroblasts in systemic sclerosis? » by Manetti. Ann Rheum Dis. 9 avr 2019;

23. Di Benedetto P, Panzera N, Cipriani P, Mastroiaco V, Tessitore A, Liakouli V, et al. Mesenchymal stem cells of Systemic Sclerosis patients, derived from different sources, show a profibrotic microRNA profiling. Sci Rep. 9 mai 2019;9(1):7144.

24. Lee R, Del Papa N, Introna M, Reese CF, Zemskova M, Bonner M, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells in systemic sclerosis: Alterations in function and beneficial effect on lung fibrosis are regulated by caveolin-1. Journal of Scleroderma and Related Disorders. juin 2019;4(2):127-36.

25. Virzì F, Bianca P, Giammona A, Apuzzo T, Di Franco S, Mangiapane LR, et al. Combined platelet-rich plasma and lipofilling treatment provides great improvement in facial skin-induced lesion regeneration for scleroderma patients. Stem Cell Res Ther. 23 oct 2017;8(1):236.

26. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. Methods Mol Med. 2007;140:67-81.

27. Viau S, Chabrand L, Eap S, Lorant J, Rouger K, Goudaliez F, et al. Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. PLoS ONE. 2017;12(8):e0181406.

28. Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. FASEB J. févr 2001;15(2):447-57.

29. Eglinger J, Karsjens H, Lammert E. Quantitative assessment of angiogenesis and pericyte coverage in human cell-derived vascular sprouts. Inflamm Regen. 2017;37:2.

30. Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. Blood. 1 mars 2008;111(5):2631-5.

31. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

32. Larghero J, Farge D, Braccini A, Lecourt S, Scherberich A, Foïs E, et al. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. avr 2008;67(4):443-9.

33. Griffin M, Ryan CM, Pathan O, Abraham D, Denton CP, Butler PEM. Characteristics of human adipose derived stem cells in scleroderma in comparison to sex and age matched normal controls: implications for regenerative medicine. Stem Cell Res Ther. 07 2017;8(1):23.

34. Capelli C, Zaccara E, Cipriani P, Di Benedetto P, Maglione W, Andracco R, et al. Phenotypical and Functional Characteristics of In Vitro-Expanded Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells From Patients With Systematic Sclerosis. Cell Transplant. 09 2017;26(5):841-54.

35. Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. IJMS. 19 juill 2016;17(7):1164.

36. Cipriani P, Di Benedetto P, Liakouli V, Del Papa B, Di Padova M, Di Ianni M, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) from scleroderma patients (SSc) preserve their immunomodulatory properties although senescent and normally induce T regulatory cells ($T_{reg\,s}$) with a functional phenotype: implications for cellular-based therapy: SSc-MSC preserve immunomodulatory abilities. Clin Exp Immunol. août 2013;173(2):195-206.

37. Wyman AE, Atamas SP. Sirtuins and Accelerated Aging in Scleroderma. Curr Rheumatol Rep. 17 2018;20(4):16.

38. Magalon J, Velier M, Simoncini S, François P, Bertrand B, Daumas A, et al. Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. mars 2019;78(3):391-8.

39. Cipriani P, Di Benedetto P, Ruscitti P, Liakouli V, Berardicurti O, Carubbi F, et al. Perivascular Cells in Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis Overexpress Activated ADAM12 and Are Involved in Myofibroblast Transdifferentiation and Development of Fibrosis. J Rheumatol. 2016;43(7):1340-9.

40. Nicolosi PA, Tombetti E, Maugeri N, Rovere-Querini P, Brunelli S, Manfredi AA. Vascular Remodelling and Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis. Stem Cells Int. 2016;2016:4636859.

41. Almadori A, Griffin M, Ryan CM, Hunt DF, Hansen E, Kumar R, et al. Stem cell enriched lipotransfer reverses the effects of fibrosis in systemic sclerosis. PLoS ONE. 2019;14(7):e0218068.

42. Manetti M, Romano E, Rosa I, Fioretto BS, Praino E, Guiducci S, et al. Systemic Sclerosis Serum Steers the Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells Toward Profibrotic Myofibroblasts: Pathophysiologic Implications. J Clin Med. 19 août 2019;8(8).

43. Nenasheva T, Nikolaev A, Diykanov D, Sukhanova A, Tcyganov E, Panteleev A, et al. The introduction of mesenchymal stromal cells induces different immunological responses in the lungs of healthy and M. tuberculosis infected mice. Olszewski MA, éditeur. PLoS ONE. 8 juin 2017;12(6):e0178983.

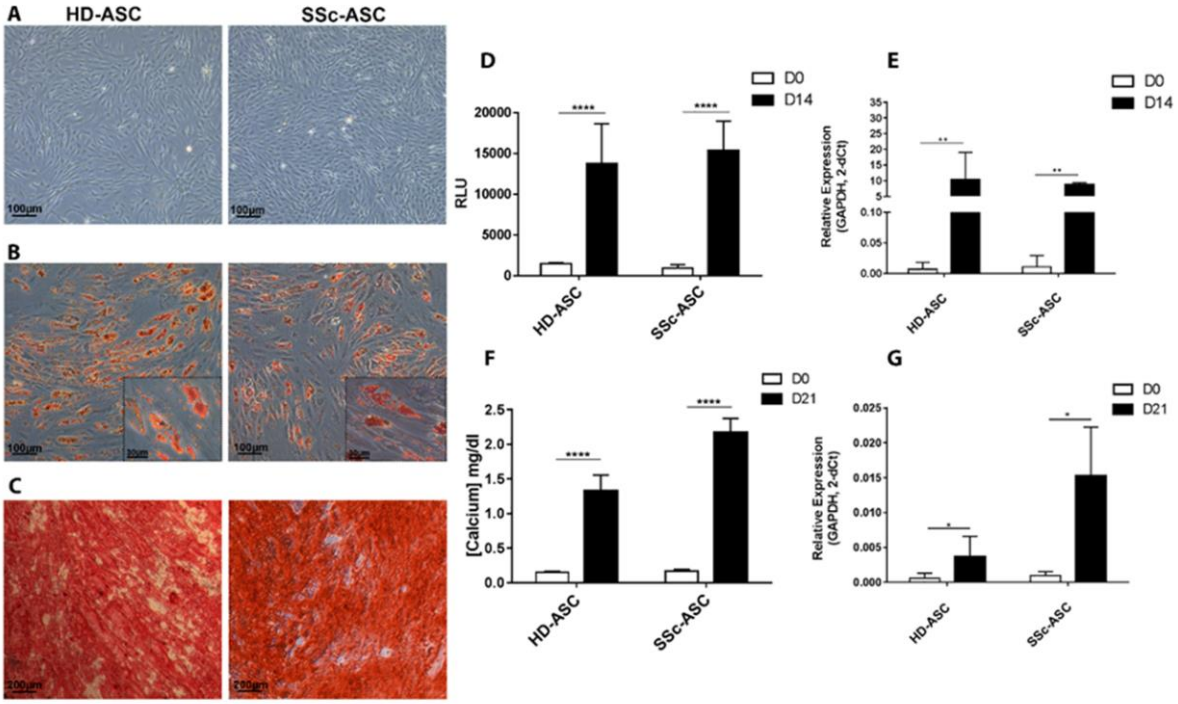


Figure 1: Adipogenic and osteogenic differentiation capacity of HD-ASC and SSc-ASC. Representative images of HD-ASC and SSc-ASC, **(A)** before differentiation (10xmagnification), **(B)** after further differentiation into the adipogenic lineage and stained with oil red O (10x and 40x magnification), **(C)** and after further differentiation into the osteogenic lineage and stained with alizarin red S (5x magnification). **(D)** Accumulation of triglycerides before (D0) and after differentiation into the adipogenic lineage (D14). **(E)** mRNA level of FABP4 before (D0) and after differentiation into the adipogenic (D14), assessed using RT-qPCR. **(F)** Calcium content in cell lysates before (D0) and after differentiation into the osteogenic lineage (D21). **(G)** mRNA level of (ALPL) in HD-ASC and SSc-ASC before (D0) and after differentiation into the osteogenic lineage (D21), assessed using RT-qPCR. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ****$p< 0.0001$

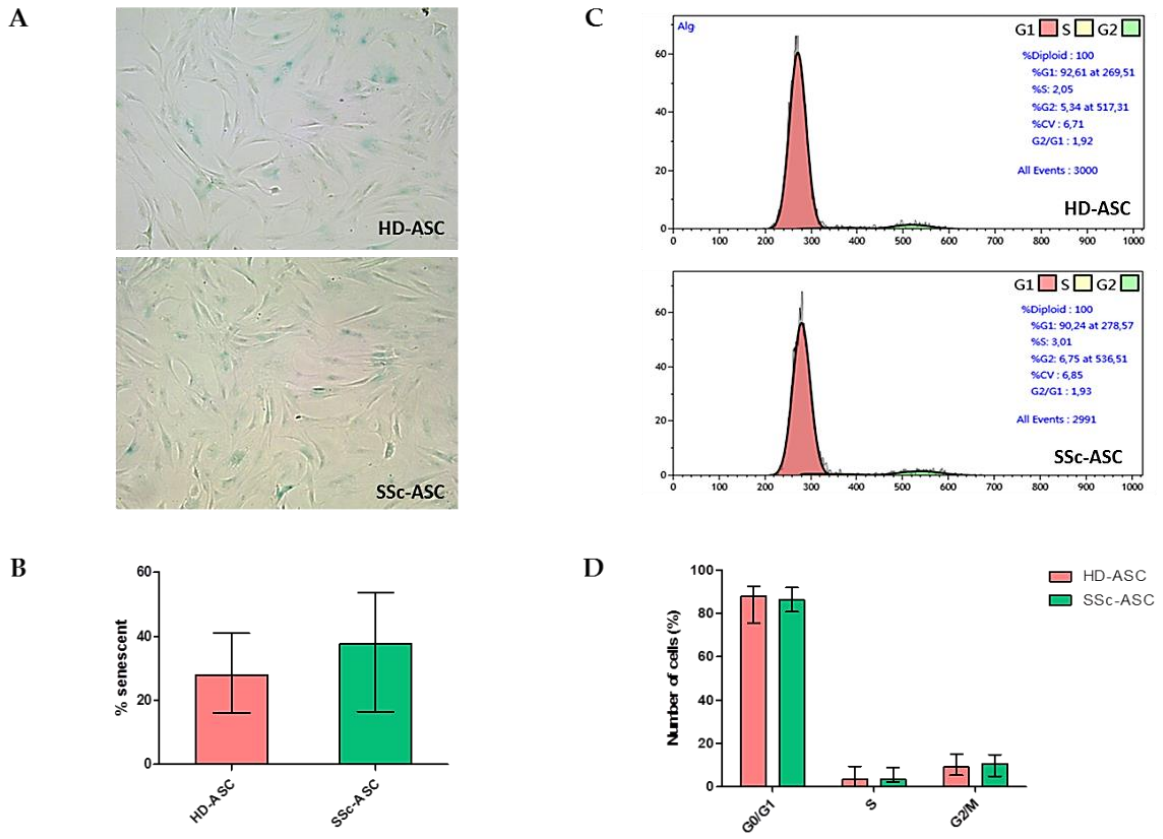


Figure 2: Senescence markers of HD-ASC (n=7) and SSc-ASC (n=7).

(A) Representative of βGal staining (20 xmagnification) (**B)** Percentage of cells positive for Senescence associated β-Galactosidase in HD-ASC (n=7) and SSc-ASC (n=7) **(C)** Representative flow cytometry data from cell cycle analysis**. (D)** Repartition (%) of HD-ASC (n=7) and SSc-ASC (n=7) in cell using propidium iodide.

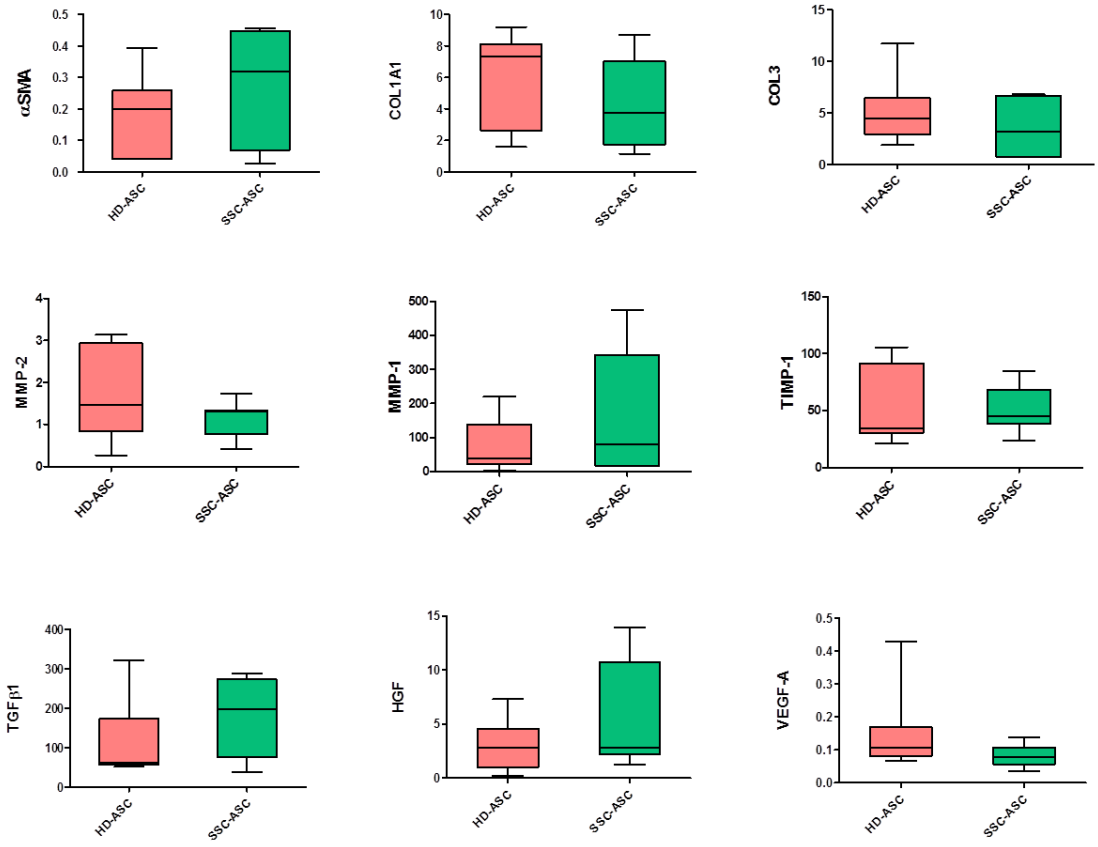


Figure 3: Relative expression of transcripts of a set of genes relevant for the pro-angiogenic and anti-fibrotic potential in expanded SSc-ASC (n=7) and HD-SSc (n=7).

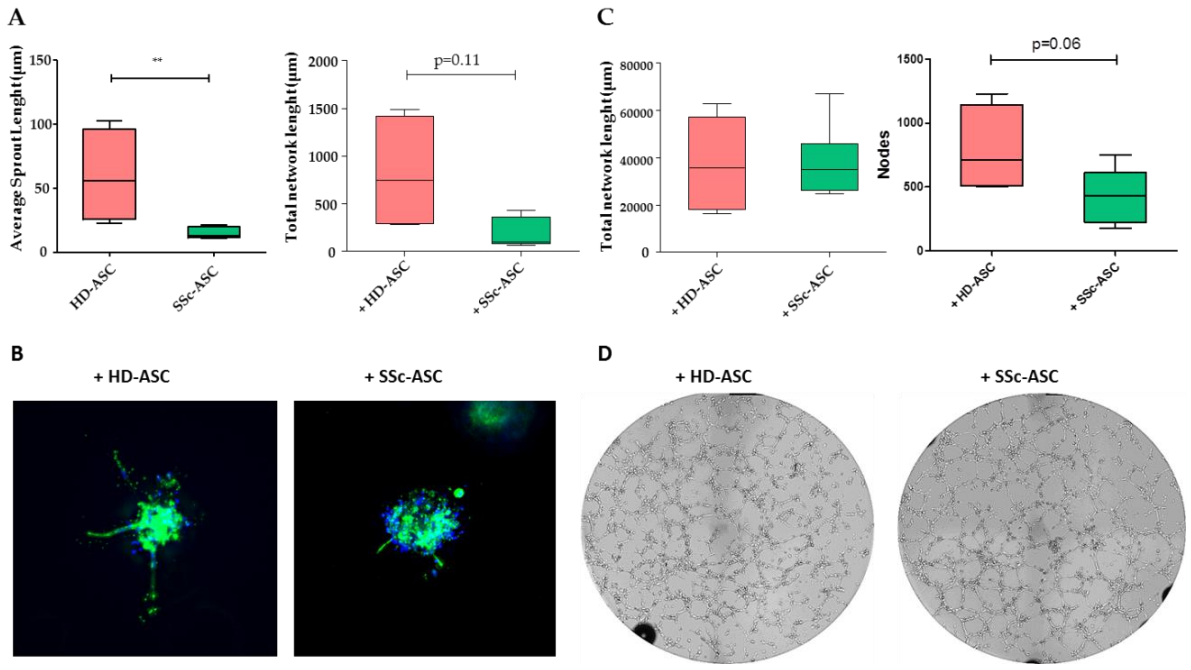


Figure 4: Pro-angiogenic paracrine effect of ASC evaluated in angiogenic in vitro assays with HMVEC-dA co-cultured with HD-ASC (n=4) and SSc- ASC (n=6)

(A) Quantification of spheroids assays (total network length and average sprout length). (**B)** Representative spheroids (20x magnification) (bleu: DAPI, green: phalloidin). (**C)** Quantification of tube formation assays (total network length and number of nodes) (**D)** Representative images of tube formation assays (10x magnification) 6 hours after seeding.

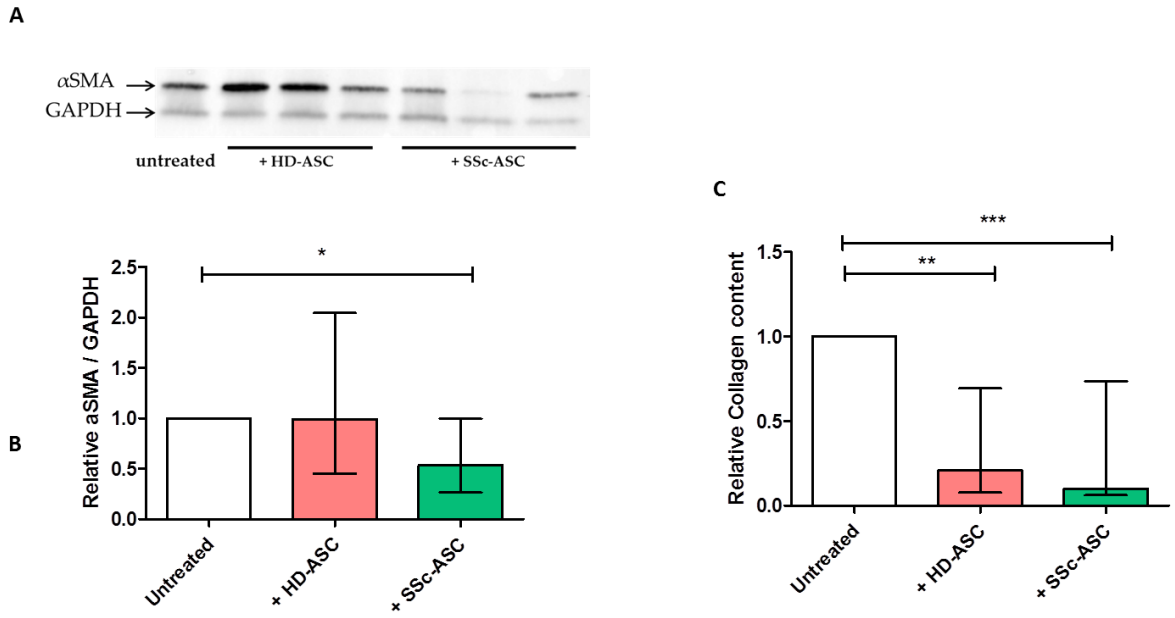


Figure 5: Anti-fibrotic paracrine effect of HD-ASC (n=4) and SSc- ASC (n=6) on DF from SSc patients (n=3)

(A) Representative immunoblot of αSMA in proteins lysates extracted from SSc-DF (n=3) after coculture and HD-ASC and SSc-ASC. (**B**) Relative αSMA/GADPH quantification normalized to the untreated SSc-DF. (**C)** Relative Collagen content in protein lysates of SSc- DF (n=2) after coculture with ASC normalized to the untreated SSc- DF.

Gene abbreviation	Reference
αSMA	Hs00426835_g1
COL1A1	Hs00164004_m1
COL3A1	Hs00943809_m1
MMP-2	Hs01548727_m1
MMP-1	Hs00899658_m1
TIMP-1	Hs01092512_g1
TGFβ1	Hs00998133_m1
HGF	Hs00300159_m1
VEGF-A	Hs00900055_m1
GAPDH	Hs02786624_g1

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

	SSc patients	HD
Gender F/M	7 / 0	7 / 0
Age (years, mean± SD)	45.8 ± 14.2	42.3 ± 13.1
Body mass index (kg/m2, mean ± SD)	22.5 ± 2.74	25.9 ± 3.11
Tobacco (yes/no)	1 / 6	3 / 3
Arterial hypertension (yes /no)	0 / 7	0 / 7
SSc subclassification (Diffuse/ Limited)	4/3	NA

Table 2: Baseline characteristics of SSc Patients and HD

	% of positive cells (means ± SD)	
Membrane Marker	**HD-ASC**	**SSc-ASC**
CD40	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
CD34	0.35 ± 0.00	0.10 ± 0.00
CD45	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00
HLA-DR	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
CD80	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
CD86	0.07 ± 0.00	0.02 ± 0.00
CD29	78.03 ± 0.14	60.07 ± 0.29
CD105	80.05 ± 0.13	72.58 ± 0.22
CD73	98.24 ± 0.00	97.32 ± 0.04
CD90	99.07 ± 0.01	97.52 ± 0.03
CD44	98.95 ± 0.01	99.79 ± 0.00
CD13	99.83 ± 0.00	99.92 ± 0.00

Table 3: Expression of membrane markers by HD-ASC and SSc-ASC assessed by flow cytometry.

Molecule (pg/ml)	SSc-ASC	HD-ASC	p-value
VEGF-A	23,85	37,31	0.2
	48,16	57,79	
	28,45	57,25	
MMP-2	29186,60	22332,18	0.70
	29712,44	30064,97	
	27005,68	25574,63	
TIMP-1	11525,52	12700,50	0.51
	11900,21	>95988	
	>95988	46185,32	
HGF	12,89	15,66	0.82
	9,91	12,89	
	9,91	6,54	
TGFβ1	650,19	688,70	0.70
	604,08	561,74	
	747,00	610,37	

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

Les résultats issus de ce travail suggèrent que le potentiel paracrine pro-angiogénique des ASC de patients sclérodermiques est maintenu malgré une empreinte de la maladie sur les stades précoces de l'angiogenèse. Aussi, et pour la première fois à notre connaissance, ce travail montre que les ASC exercent un effet paracrine anti-fibrotique en réduisant significativement l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique par les fibroblastes dermiques.

Ce travail suggère ainsi que les propriétés paracrines des ASC de patients atteints de ScS sont compatibles avec un bénéfice potentiel dans la prise en charge des manifestations ischémiques et fibrotiques associées à la ScS.

D'autres études s'intéressant à la relation entre ces activités paracrines évaluées *in vitro* et l'impact clinique de ces approches pourraient permettre de définir des tests de potency. Cette stratégie permettrait de mieux sélectionner les patients bon répondeurs à cette thérapie et d'optimiser ces thérapies innovantes prometteuses.

CONCLUSION

Le développement de thérapies cellulaires innovantes représente un véritable espoir pour les patients atteints de sclérodermie systémique. En effet, l'arsenal thérapeutique disponible reste limité dans cette maladie complexe reposant sur la combinaison de traitements immunomodulateurs et symptomatiques.

À ce jour, seule l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques a permis une réduction de la morbi-mortalité des formes sévères ou rapidement évolutives. Mais cette intensification thérapeutique avec greffe de cellules souches hématopoïétiques n'est proposée que dans les formes sévères de sclérodermie systémique après validation de l'indication par un comité d'experts.

Le développement d'approches systémiques utilisant les cellules souches mésenchymateuses se justifie aisément dans la sclérodermie systémique. En effet, ces cellules aux propriétés immunomodulatrice, pro-angiogénique et trophique semblent pouvoir agir sur la triade pathogénique de la sclérodermie systémique, à savoir la dysimmunité, l'atteinte vasculaire et la fibrose. Les essais actuellement menés avec les cellules souches mésenchymateuses reposent sur des approches allogéniques (sang de cordon ombilical et moelle osseuse) qui ont l'avantage de ne pas nécessiter de conditionnement car elles sont peu immunogènes. Néanmoins, leur devenir au long cours chez un patient souffrant d'un trouble de l'immunité tel que la sclérodermie systémique pourrait en freiner le développement. Le développement de thérapies cellulaires autologues, notamment dérivées du tissu adipeux représente ainsi une option intéressante dans l'arsenal des thérapies cellulaires appliquées à la sclérodermie systémique.

Dans le traitement de handicap de la main et du visage associés à la sclérodermie systémique, différentes approches dérivées du tissu adipeux ont été testées. Le tissu adipeux non manipulé a montré des résultats prometteurs dans les lésions péri-orales mais cette approche n'est pas transposable au handicap de la main à cause du risque d'ischémie. L'injection de la fraction vasculaire stromale dépourvue des adipocytes a en revanche montré une excellente tolérance dans l'essai SCLERADEC. Pour autant, les résultats de l'essai randomisé contre placebo SCLERADEC II n'ont pas mis en évidence de différence significative sur le critère principal de jugement (amélioration du score fonctionnel de la main de Cochin à 3 mois).

Par ailleurs, l'administration locale de cellules souches mésenchymateuses autologues dérivées du tissu adipeux au niveau du visage et des membres des patients sclérodermiques a

montré un impact favorable sur les processus de régénération tissulaire, reposant principalement sur des mécanismes paracrines.

Cependant l'approche autologue, si elle est avantageuse en termes de sécurité d'utilisation, questionne néanmoins sur un possible impact délétère du contexte pathologique de la sclérodermie systémique sur les propriétés thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses présentes dans le tissu adipeux.

Les résultats préliminaires présentés dans la partie expérimentale de ce travail suggèrent que les cellules souches mésenchymateuses contenues dans le tissu adipeux conservent un potentiel paracrine pro-angiogénique et anti-fibrotique malgré une empreinte de la maladie.

Pour conclure, il n'existe probablement pas de thérapie cellulaire « optimale » capable de résoudre à la fois les dysfonctionnements immunitaires qui font le lit de la sclérodermie systémique et les lésions d'ischémie et de fibrose déjà développées.

A l'ère de la médecine personnalisée et des thérapies combinées, il semblerait que la thérapie cellulaire ne fasse pas exception et soit destinée à être adaptée aux caractéristiques physiopathologiques du patient et à être associées en fonction l'objectif souhaité. Cette perspective ne sera possible que par une meilleure compréhension de la physiopathologie de la sclérodermie systémique et des mécanismes sous-tendant l'efficacité des thérapies cellulaires.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barnes, J. & Mayes, M. D. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* **24**, 165–170 (2012).

2. Ranque, B. & Mouthon, L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* **9**, A311-318 (2010).

3. Hachulla, E. & Launay, D. Diagnosis and classification of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **40**, 78–83 (2011).

4. D'Amico, F., Skarmoutsou, E. & Mazzarino, M. C. The sex bias in systemic sclerosis: on the possible mechanisms underlying the female disease preponderance. *Clin Rev Allergy Immunol* **47**, 334–343 (2014).

5. Elhai, M., Meune, C., Avouac, J., Kahan, A. & Allanore, Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)* **51**, 1017–1026 (2012).

6. Mayes, M. D. *et al.* Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* **48**, 2246–2255 (2003).

7. Elhai, M. *et al.* Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1897–1905 (2017).

8. Godard, D. The needs of patients with systemic sclerosis--what are the difficulties encountered? *Autoimmun Rev* **10**, 291–294 (2011).

9. Allanore, Y., Dieude, P. & Boileau, C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 203–210 (2010).

10. Feghali-Bostwick, C., Medsger, T. A. & Wright, T. M. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* **48**, 1956–1963 (2003).

11. Rodriguez-Reyna, T. S. *et al.* HLA Class I and II Blocks Are Associated to Susceptibility, Clinical Subtypes and Autoantibodies in Mexican Systemic Sclerosis (SSc) Patients. *PLoS ONE* **10**, e0126727 (2015).

12. Furukawa, H. *et al.* Human Leukocyte Antigen and Systemic Sclerosis in Japanese: The Sign of the Four Independent Protective Alleles, DRB1*13:02, DRB1*14:06, DQB1*03:01, and DPB1*02:01. *PLoS ONE* **11**, e0154255 (2016).

13. Xu, Y., Wang, W., Tian, Y., Liu, J. & Yang, R. Polymorphisms in STAT4 and IRF5 increase the risk of systemic sclerosis: a meta-analysis. *Int. J. Dermatol.* **55**, 408–416 (2016).

14. Altorok, N. & Kahaleh, B. Epigenetics and systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* **37**, 453–462 (2015).

15. Marie, I. & Gehanno, J.-F. Environmental risk factors of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* **37**, 463–473 (2015).

16. Marie, I. *et al.* Association of occupational exposure with features of systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* **72**, 456–464 (2015).

17. Marie, I. *et al.* Systemic sclerosis and exposure to heavy metals: A case control study of 100 patients and 300 controls. *Autoimmun Rev* **16**, 223–230 (2017).

18. Kettaneh, A. *et al.* Occupational exposure to solvents and gender-related risk of systemic sclerosis: a metaanalysis of case-control studies. *J. Rheumatol.* **34**, 97–103 (2007).

19. Janowsky, E. C., Kupper, L. L. & Hulka, B. S. Meta-analyses of the relation between silicone breast implants and the risk of connective-tissue diseases. *N. Engl. J. Med.* **342**, 781–790 (2000).

20. Volkmann, E. R. *et al.* Association of Systemic Sclerosis With a Unique Colonic Microbial Consortium. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* **68**, 1483–1492 (2016).

21. Andréasson, K., Alrawi, Z., Persson, A., Jönsson, G. & Marsal, J. Intestinal dysbiosis is common in systemic sclerosis and associated with gastrointestinal and extraintestinal features of disease. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 278 (2016).

22. Viswanath, V., Phiske, M. M. & Gopalani, V. V. Systemic sclerosis: current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifestations. *Indian J Dermatol* **58**, 255–268 (2013).

23. Trojanowska, M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 453–460 (2010).

24. Sgonc, R. *et al.* Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J. Clin. Invest.* **98**, 785–792 (1996).

25. Rabquer, B. J. *et al.* The proadhesive phenotype of systemic sclerosis skin promotes myeloid cell adhesion via ICAM-1 and VCAM-1. *Rheumatology (Oxford)* **48**, 734–740 (2009).

26. Ignarro, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* **3**, 31–36 (1989).

27. Vancheeswaran, R. *et al.* Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J. Rheumatol.* **21**, 1838–1844 (1994).

28. Cutolo, M., Pizzorni, C., Secchi, M. E. & Sulli, A. Capillaroscopy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 1093–1108 (2008).

29. Avouac, J. *et al.* Correlations between angiogenic factors and capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R55 (2013).

30. Del Papa, N. *et al.* Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **54**, 2605–2615 (2006).

31. Benyamine, A. *et al.* Increased serum levels of fractalkine and mobilisation of CD34+CD45- endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 60 (2017).

32. Hebbar, M. *et al.* Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **43**, 889–893 (2000).

33. Macko, R. F. *et al.* Increased circulating concentrations of the counteradhesive proteins SPARC and thrombospondin-1 in systemic sclerosis (scleroderma). Relationship to platelet and endothelial cell activation. *J. Rheumatol.* **29**, 2565–2570 (2002).

34. van Bon, L. *et al.* Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 433–443 (2014).

35. Manetti, M. *et al.* Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ. Res.* **109**, e14-26 (2011).

36. Kuwana, M., Okazaki, Y., Yasuoka, H., Kawakami, Y. & Ikeda, Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* **364**, 603–610 (2004).

37. Mok, M. Y. *et al.* Low circulating level of CD133+KDR+cells in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **28**, S19-25 (2010).

38. Andrigueti, F. V., Arismendi, M. I., Ebbing, P. C. C. & Kayser, C. Decreased numbers of endothelial progenitor cells in patients in the early stages of systemic sclerosis. *Microvasc. Res.* **98**, 82–87 (2015).

39. Kuwana, M. & Okazaki, Y. Brief report: impaired in vivo neovascularization capacity of endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* **66**, 1300–1305 (2014).

40. Zhu, S. *et al.* Transcriptional regulation of Bim by FOXO3a and Akt mediates scleroderma serum-induced apoptosis in endothelial progenitor cells. *Circulation* **118**, 2156–2165 (2008).

41. Manetti, M. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. (2017).

42. Jimenez, S. A. Role of endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of the vascular alterations in systemic sclerosis. *ISRN Rheumatol* **2013**, 835948 (2013).

43. Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. C. & Ten Dijke, P. TGF-β-Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).

44. Kirk, T. Z., Mark, M. E., Chua, C. C., Chua, B. H. & Mayes, M. D. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J. Biol. Chem.* **270**, 3423–3428 (1995).

45. van Caam, A., Vonk, M., van den Hoogen, F., van Lent, P. & van der Kraan, P. Unraveling SSc Pathophysiology; The Myofibroblast. *Front Immunol* **9**, 2452 (2018).

46. Mori, Y., Chen, S.-J. & Varga, J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **48**, 1964–1978 (2003).

47. Servettaz, A. *et al.* [Systemic sclerosis: pathophysiology of a multifaceted disease]. *Presse Med* **35**, 1903–1915 (2006).

48. Kawakami, T. *et al.* Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 47–51 (1998).

49. Kubo, M., Ihn, H., Yamane, K. & Tamaki, K. Up-regulated expression of transforming growth factor beta receptors in dermal fibroblasts in skin sections from patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* **44**, 731–734 (2001).

50. Fertin, C. *et al.* Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol* **37**, 823–829 (1991).

51. Ong, C. J. *et al.* A role for T helper 2 cells in mediating skin fibrosis in tight-skin mice. *Cell Immunol* **196**, 60–68 (1999).

52. Biondi, M. L., Marasini, B., Bianchi, E. & Agostoni, A. Plasma free and intraplatelet serotonin in patients with Raynaud's phenomenon. *Int J Cardiol* **19**, 335–339 (1988).

53. Dees, C. *et al.* Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J Exp Med* **208**, 961–972 (2011).

54. Servettaz, A. *et al.* Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. *Am. J. Pathol.* **177**, 187–196 (2010).

55. Kuroda, K. & Shinkai, H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch. Dermatol. Res.* **289**, 567–572 (1997).

56. Svegliati, S. *et al.* Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem* **280**, 36474–36482 (2005).

57. Maurer, B. *et al.* MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **62**, 1733–1743 (2010).

58. Honda, N. *et al.* miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin beta3. *Am J Pathol* **182**, 206–216 (2013).

59. Makino, K. *et al.* The downregulation of microRNA let-7a contributes to the excessive expression of type I collagen in systemic and localized scleroderma. *J Immunol* **190**, 3905–3915 (2013).

60. Kraling, B. M., Maul, G. G. & Jimenez, S. A. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* **63**, 48–56 (1995).

61. Ishikawa, O. & Ishikawa, H. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* **19**, 1202–1206 (1992).

62. Ho, Y. Y., Lagares, D., Tager, A. M. & Kapoor, M. Fibrosis--a lethal component of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 390–402 (2014).

63. Seibold, J. R., Giorno, R. C. & Claman, H. N. Dermal mast cell degranulation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **33**, 1702–1709 (1990).

64. Roumm, A. D., Whiteside, T. L., Medsger, T. A. J. & Rodnan, G. P. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* **27**, 645–653 (1984).

65. Mavalia, C. *et al.* Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol* **151**, 1751–1758 (1997).

66. Valentini, G. *et al.* Peripheral blood T lymphocytes from systemic sclerosis patients show both Th1 and Th2 activation. *J Clin Immunol* **21**, 210–217 (2001).

67. 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* **24**, 328–332 (1997).

68. Mehra, S., Walker, J., Patterson, K. & Fritzler, M. J. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* **12**, 340–354 (2013).

69. Matsushita, T. *et al.* Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* **54**, 192–201 (2006).

70. Bosello, S. *et al.* B cells in systemic sclerosis: a possible target for therapy. *Autoimmun Rev* **10**, 624–630 (2011).

71. Shima, Y. *et al.* The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 2408–2412 (2010).

72. Bhattacharyya, S., Wei, J. & Varga, J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 42–54 (2011).

73. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* **23**, 581–590 (1980).

74. LeRoy, E. C. *et al.* Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* **15**, 202–205 (1988).

75. Denton, C. P. & Khanna, D. Systemic sclerosis. *Lancet* **390**, 1685–1699 (2017).

76. LeRoy, E. C. & Medsger, T. A. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **28**, 1573–1576 (2001).

77. van den Hoogen, F. *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1747–1755 (2013).

78. Czompoly, T., Simon, D., Czirjak, L. & Nemeth, P. Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* **8**, 692–696 (2009).

79. Perosa, F. *et al.* Anti-centromere protein A antibodies in systemic sclerosis: Significance and origin. *Autoimmun Rev* **15**, 102–109 (2016).

80. Sobanski, V. *et al.* Prevalence of anti-RNA polymerase III antibodies in systemic sclerosis: New data from a French cohort and a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol* **66**, 407–417 (2014).

81. Rannou, F. *et al.* Assessing disability and quality of life in systemic sclerosis: construct validities of the Cochin Hand Function Scale, Health Assessment Questionnaire (HAQ), Systemic Sclerosis HAQ, and Medical Outcomes Study 36-Item Short Form Health Survey. *Arthritis Rheum* **57**, 94–102 (2007).

82. Magalon, G. *et al.* Regenerative Approach to Scleroderma with Fat Grafting. *Clin Plast Surg* **42**, 353–364, viii–ix (2015).

83. Wells, A. U., Steen, V. & Valentini, G. Pulmonary complications: one of the most challenging complications of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **48 Suppl 3**, iii40-44 (2009).

84. Bussone, G. & Mouthon, L. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* **10**, 248–255 (2011).

85. Le Pavec, J., Launay, D., Mathai, S. C., Hassoun, P. M. & Humbert, M. Scleroderma lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* **40**, 104–116 (2011).

86. Hachulla, E. *et al.* The three-year incidence of pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis in a multicenter nationwide longitudinal study in France. *Arthritis Rheum* **60**, 1831–1839 (2009).

87. Launay, D. *et al.* Survival in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Ann Rheum Dis* **72**, 1940–1946 (2013).

88. Sitia, S. *et al.* Cardiovascular involvement in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* **8**, 281–286 (2009).

89. Mouthon, L. *et al.* Scleroderma renal crisis: a rare but severe complication of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **40**, 84–91 (2011).

90. Bussone, G., Bérezné, A., Pestre, V., Guillevin, L. & Mouthon, L. The scleroderma kidney: progress in risk factors, therapy, and prevention. *Curr Rheumatol Rep* **13**, 37–43 (2011).

91. Gyger, G. & Baron, M. Systemic Sclerosis: Gastrointestinal Disease and Its Management. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **41**, 459–473 (2015).

92. Tiev, K. P. & Cabane, J. Digestive tract involvement in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* **11**, 68–73 (2011).

93. Rosato, E. *et al.* Nutritional status measured by BMI is impaired and correlates with left ventricular mass in patients with systemic sclerosis. *Nutrition* **30**, 204–209 (2014).

94. Codullo, V. *et al.* Disease-related malnutrition in systemic sclerosis: evidences and implications. *Clin Exp Rheumatol* **33**, S190-194 (2015).

95. Doerfler, B. *et al.* Medical Nutrition Therapy for Patients With Advanced Systemic Sclerosis (MNT PASS): A Pilot Intervention Study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **41**, 678–684 (2017).

96. Harrison, E., Herrick, A. L., Dibb, M., McLaughlin, J. T. & Lal, S. Long-term outcome of patients with systemic sclerosis requiring home parenteral nutrition. *Clin Nutr* **34**, 991–996 (2015).

97. Stanga, Z. *et al.* Home parenteral nutrition is beneficial in systemic sclerosis patients with gastrointestinal dysfunction. *Scand J Rheumatol* **45**, 32–35 (2016).

98. Clements, P. J., Allanore, Y., Khanna, D., Singh, M. & Furst, D. E. Arthritis in systemic sclerosis: systematic review of the literature and suggestions for the performance of future clinical trials in systemic sclerosis arthritis. *Semin Arthritis Rheum* **41**, 801–814 (2012).

99. Scussel-Lonzetti, L. *et al.* Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore)* **81**, 154–167 (2002).

100. Le, E. N., Wigley, F. M., Shah, A. A., Boin, F. & Hummers, L. K. Long-term experience of mycophenolate mofetil for treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1104–1107 (2011).

101. Pope, J. E. *et al.* A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* **44**, 1351–1358 (2001).

102. Panopoulos, S. T. *et al.* Mycophenolate versus cyclophosphamide for progressive interstitial lung disease associated with systemic sclerosis: a 2-year case control study. *Lung* **191**, 483–489 (2013).

103. Sircar, G., Goswami, R. P., Sircar, D., Ghosh, A. & Ghosh, P. Intravenous cyclophosphamide vs rituximab for the treatment of early diffuse scleroderma lung disease: open label, randomized, controlled trial. *Rheumatology (Oxford)* **57**, 2106–2113 (2018).

104. Didier, K. *et al.* [Updates in systemic sclerosis pathogenesis: Toward new therapeutic opportunities]. *Rev Med Interne* (2019). doi:10.1016/j.revmed.2019.05.016

105. Lam, G. K., Hummers, L. K., Woods, A. & Wigley, F. M. Efficacy and safety of etanercept in the treatment of scleroderma-associated joint disease. *J. Rheumatol.* **34**, 1636–1637 (2007).

106. Khanna, D. *et al.* Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in systemic sclerosis: results from the open-label period of a phase II randomised controlled trial (faSScinate). *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 212–220 (2018).

107. Rice, L. M. *et al.* Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* **125**, 2795–2807 (2015).

108. Gordon, J. K. *et al.* Belimumab for the Treatment of Early Diffuse Systemic Sclerosis: Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Trial. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* **70**, 308–316 (2018).

109. Spiera, R. *et al.* OP0126 A phase 2 study of safety and efficacy of anabasum (JBT-101) in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **76**, 105–105 (2017).

110. Distler, O. *et al.* Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N. Engl. J. Med.* **380**, 2518–2528 (2019).

111. Distler, O. *et al.* RISE-SSc: Riociguat in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Respir Med* **122 Suppl 1**, S14–S17 (2017).

112. Magalon, J. *et al.* Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018. *Revue Francophone des Laboratoires* **2018**, 34–43 (2018).

113. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).

114. Hoffman, L. M. & Carpenter, M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 699–708 (2005).

115. Gurdon, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* **10**, 622–640 (1962).

116. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).

117. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4**, 267–274 (1976).

118. Roux, S., Leotot, J., Chevallier, N., Bierling, P. & Rouard, H. [Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects]. *Transfus Clin Biol* **18**, 1–12 (2011).

119. Till, J. E. & McCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213–222 (1961).

120. Binks, M. *et al.* Phase I/II trial of autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis: procedure related mortality and impact on skin disease. *Ann. Rheum. Dis.* **60**, 577–584 (2001).

121. de Buys, P., Khanna, D. & Furst, D. E. Hemopoietic stem cell transplantation in rheumatic diseases--an update. *Autoimmun Rev* **4**, 442–449 (2005).

122. Pugnet, G. *et al.* Indications et suivi des autogreffes de cellules souches hématopoïétiques dans les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bulletin du Cancer* **104**, S169–S180 (2017).

123. Alexander, T. *et al.* Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* **113**, 214–223 (2009).

124. Farge, D. *et al.* Analysis of immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **52**, 1555–1563 (2005).

125. Abrahamsson, S. & Muraro, P. A. Immune re-education following autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmunity* **41**, 577–584 (2008).

126. Snowden, J. A. *et al.* Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: updated guidelines of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **47**, 770–790 (2012).

127. Muraro, P. A. *et al.* Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* **13**, 391–405 (2017).

128. Talekar M.K.,. Immune Reconstitution After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation for the Pediatric Hematologist/Oncologist* (2018).

129. Tsukamoto, H. *et al.* Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. *Rheumatology (Oxford)* **50**, 944–952 (2011).

130. Baraut, J. *et al.* Peripheral blood regulatory T cells in patients with diffuse systemic sclerosis (SSc) before and after autologous hematopoietic SCT: a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* **49**, 349–354 (2014).

131. Michel, L. *et al.* Evolution of serum cytokine profile after hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients. *Bone Marrow Transplant.* **51**, 1146–1149 (2016).

132. Sullivan, K. M. *et al.* Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* **378**, 35–47 (2018).

133. Massey, J. C., Sutton, I. J., Ma, D. D. F. & Moore, J. J. Regenerating Immunotolerance in Multiple Sclerosis with Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Front Immunol* **9**, 410 (2018).

134. Slobodin, G. & Rimar, D. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* **52**, 194–201 (2017).

135. Delemarre, E. M. *et al.* Autologous stem cell transplantation aids autoimmune patients by functional renewal and TCR diversification of regulatory T cells. *Blood* **127**, 91–101 (2016).

136. Roord, S. T. A. *et al.* Autologous bone marrow transplantation in autoimmune arthritis restores immune homeostasis through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* **111**, 5233–5241 (2008).

137. Swart, J. F. *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol* **13**, 244–256 (2017).

138. Burt, R. K. *et al.* Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet* **378**, 498–506 (2011).

139. van Laar, J. M. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA* **311**, 2490–2498 (2014).

140. Del Papa, N., Pignataro, F., Zaccara, E., Maglione, W. & Minniti, A. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Treatment of Systemic Sclerosis. *Front Immunol* **9**, 2390 (2018).

141. Oliveira, M. C. *et al.* Does *ex vivo* CD34+ positive selection influence outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients? *Bone Marrow Transplantation* **51**, 501–505 (2016).

142. Moore, J. *et al.* A pilot randomized trial comparing CD34-selected versus unmanipulated hemopoietic stem cell transplantation for severe, refractory rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 2301–2309 (2002).

143. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).

144. Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H.-F. & Lian, Q. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy: Current Status and Perspectives. *Cell Transplant* **23**, 1045–1059 (2014).

145. Abreu, S. C., Weiss, D. J. & Rocco, P. R. M. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: a therapeutic option in respiratory diseases? *Stem Cell Res Ther* **7**, 53 (2016).

146. Spees, J. L., Lee, R. H. & Gregory, C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther* **7**, 125 (2016).

147. Krause, D. S. *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369–377 (2001).

148. Theise, N. D. On experimental design and discourse in plasticity research. *Stem Cell Rev* **1**, 9–13 (2005).

149. Rehman, J. *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292–1298 (2004).

150. Nakagami, H. *et al.* Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2542–2547 (2005).

151. Planat-Benard, V. *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656–663 (2004).

152. De Luca, A. *et al.* Role of the EGFR ligand/receptor system in the secretion of angiogenic factors in mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* **226**, 2131–2138 (2011).

153. Crisostomo, P. R. *et al.* Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **294**, C675-682 (2008).

154. Liew, A. & O'Brien, T. Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia. *Stem Cell Res Ther* **3**, 28 (2012).

155. Ni, K. *et al.* PD-1/PD-L1 Pathway Mediates the Alleviation of Pulmonary Fibrosis by Human Mesenchymal Stem Cells in Humanized Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **58**, 684–695 (2018).

156. Donizetti-Oliveira, C. *et al.* Adipose tissue-derived stem cell treatment prevents renal disease progression. *Cell Transplant* **21**, 1727–1741 (2012).

157. Wu, Y. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int Wound J* **11**, 701–710 (2014).

158. Horton, J. A. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation. *Stem Cells* **31**, 2231–2241 (2013).

159. Maria, A. T. J. *et al.* Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *J. Autoimmun.* **70**, 31–39 (2016).

160. Chen, W. *et al.* Adipose tissue-derived stem cells ameliorates dermal fibrosis in a mouse model of scleroderma. *Asian Pac J Trop Med* **10**, 52–56 (2017).

161. Le Blanc, K. *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**, 1439–1441 (2004).

162. Bartholomew, A. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* **30**, 42–48 (2002).

163. Di Nicola, M. *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838–3843 (2002).

164. Nauta, A. J. & Fibbe, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110**, 3499–3506 (2007).

165. Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C. & Guinan, E. C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* **75**, 389–397 (2003).

166. Mohammadpour, H., Pourfathollah, A. A., Zarif, M. N. & Tahoori, M. T. TNF-α modulates the immunosuppressive effects of MSCs on dendritic cells and T cells. *Int. Immunopharmacol.* **28**, 1009–1017 (2015).

167. Rosado, M. M. *et al.* Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells Dev.* **24**, 93–103 (2015).

168. Hwu, P. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* **164**, 3596–3599 (2000).

169. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–1822 (2005).

170. Akiyama, K. *et al.* Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* **10**, 544–555 (2012).

171. Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 383–396 (2012).

172. Guiducci, S. *et al.* Autologous mesenchymal stem cells foster revascularization of ischemic limbs in systemic sclerosis: a case report. *Ann. Intern. Med.* **153**, 650–654 (2010).

173. Christopeit, M. *et al.* Marked improvement of severe progressive systemic sclerosis after transplantation of mesenchymal stem cells from an allogeneic haploidentical-related donor mediated by ligation of CD137L. *Leukemia* **22**, 1062–1064 (2008).

174. Keyszer, G. *et al.* Treatment of severe progressive systemic sclerosis with transplantation of mesenchymal stromal cells from allogeneic related donors: report of five cases. *Arthritis Rheum.* **63**, 2540–2542 (2011).

175. Zhang, H. *et al.* Sustained benefit from combined plasmapheresis and allogeneic mesenchymal stem cells transplantation therapy in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 165 (2017).

176. Szekanecz, Z. *et al.* Combined plasmapheresis and high-dose intravenous immunoglobulin treatment in systemic sclerosis for 12 months: follow-up of immunopathological and clinical effects. *Clin. Rheumatol.* **28**, 347–350 (2009).

177. Szúcs, G., Szamosi, S., Aleksza, M., Veres, K. & Soltész, P. [Plasmapheresis therapy in systemic sclerosis]. *Orv Hetil* **144**, 2213–2217 (2003).

178. Liang, J. *et al.* Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study. *Stem Cell Res Ther* **9**, 312 (2018).

179. Farge, D. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. *Haematologica* **95**, 284–292 (2010).

180. Asahara, T. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964–967 (1997).

181. Asahara, T. *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* **85**, 221–228 (1999).

182. Tongers, J., Roncalli, J. G. & Losordo, D. W. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res* **79**, 200–206 (2010).

183. Kalka, C. *et al.* Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3422–3427 (2000).

184. Schatteman, G. C., Hanlon, H. D., Jiao, C., Dodds, S. G. & Christy, B. A. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* **106**, 571–578 (2000).

185. Zaccone, V. *et al.* Focus on biological identity of endothelial progenitors cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **19**, 4047–4063 (2015).

186. Yoder, M. C. *et al.* Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* **109**, 1801–1809 (2007).

187. Ingram, D. A. *et al.* Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* **105**, 2783–2786 (2005).

188. Psaltis, P. J. & Simari, R. D. Vascular wall progenitor cells in health and disease. *Circ. Res.* **116**, 1392–1412 (2015).

189. Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C. & Lima, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* **83**, S192-203 (2007).

190. Crandall, D. L., Hausman, G. J. & Kral, J. G. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* **4**, 211–232 (1997).

191. Nseir, I. *et al.* Use of adipose tissue and stromal vascular fraction in hand surgery. *Orthop Traumatol Surg Res* **103**, 927–932 (2017).

192. Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211–228 (2001).

193. Bank, J., Fuller, S. M., Henry, G. I. & Zachary, L. S. Fat grafting to the hand in patients with Raynaud phenomenon: a novel therapeutic modality. *Plast. Reconstr. Surg.* **133**, 1109–1118 (2014).

194. Del Papa, N. *et al.* Regional implantation of autologous adipose tissue-derived cells induces a prompt healing of long-lasting indolent digital ulcers in patients with systemic sclerosis. *Cell Transplant* **24**, 2297–2305 (2015).

195. Del Papa, N. *et al.* Regional grafting of autologous adipose tissue is effective in inducing prompt healing of indolent digital ulcers in patients with systemic sclerosis: results of a monocentric randomized controlled study. *Arthritis Res. Ther.* **21**, 7 (2019).

196. Consorti, G., Tieghi, R. & Clauser, L. C. Frontal linear scleroderma: long-term result in volumetric restoration of the fronto-orbital area by structural fat grafting. *J Craniofac Surg* **23**, e263-265 (2012).

197. Roh, M. R., Jung, J. Y. & Chung, K. Y. Autologous fat transplantation for depressed linear scleroderma-induced facial atrophic scars. *Dermatol Surg* **34**, 1659–1665 (2008).

198. Sautereau, N. *et al.* Efficacy of Autologous Microfat Graft on Facial Handicap in Systemic Sclerosis Patients. *Plast Reconstr Surg Glob Open* **4**, e660 (2016).

199. Del Papa, N. *et al.* Autologous fat grafting in the treatment of fibrotic perioral changes in patients with systemic sclerosis. *Cell Transplant* **24**, 63–72 (2015).

200. Virzi, F. *et al.* Combined platelet-rich plasma and lipofilling treatment provides great improvement in facial skin-induced lesion regeneration for scleroderma patients. *Stem Cell Res Ther* **8**, 236 (2017).

201. Philandrianos, C. *et al.* Combined PRP and microfat graft for facial disability in systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord* **2**, 7–11 (2017).

202. Bourin, P. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **15**, 641–648 (2013).

203. Zhu, X., Shi, W., Tai, W. & Liu, F. The comparition of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* **350**, 277–287 (2012).

204. Yoshimura, K. *et al.* Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* **32**, 48–55; discussion 56-57 (2008).

205. Rigotti, G. *et al.* Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* **119**, 1409–22; discussion 1423-1424 (2007).

206. Traktuev, D. O. *et al.* Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res* **104**, 1410–1420 (2009).

207. Bora, P. & Majumdar, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther* **8**, 145 (2017).

208. Harada, Y. *et al.* Transplantation of freshly isolated adipose tissue-derived regenerative cells enhances angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. *Biomed. Res.* **34**, 23–29 (2013).

209. Guo, J. *et al.* Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **69**, 180–188 (2016).

210. Domergue, S. *et al.* Comparison between Stromal Vascular Fraction and Adipose Mesenchymal Stem Cells in Remodeling Hypertrophic Scars. *PLoS ONE* **11**, e0156161 (2016).

211. Hirose, Y. *et al.* Comparison of trophic factors secreted from human adipose-derived stromal vascular fraction with those from adipose-derived stromal/stem cells in the same individuals. *Cytotherapy* **20**, 589–591 (2018).

212. Serratrice, N. *et al.* New fat-derived products for treating skin-induced lesions of scleroderma in nude mice. *Stem Cell Res Ther* **5**, (2014).

213. Granel, B. *et al.* Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Ann Rheum Dis* **74**, 2175–2182 (2015).

214. Daumas, A. *et al.* Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. *Curr Res Transl Med* **65**, 40–43 (2017).

215. http://ir.cytori.com/investor-relations/news/news-details/2017/Cytori-Announces-Top-Line-24--and-48-Week-Results-from-the-STAR-Trial-of-Habeo-Cell-Therapy-in-Patients-with-Scleroderma/default.aspx.

216. Scuderi, N. *et al.* Human adipose-derived stromal cells for cell-based therapies in the treatment of systemic sclerosis. *Cell Transplant* **22**, 779–795 (2013).

217. Onesti, M. G. *et al.* Improvement of Mouth Functional Disability in Systemic Sclerosis Patients over One Year in a Trial of Fat Transplantation versus Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem Cells Int* **2016**, 2416192 (2016).

218. van Rhijn-Brouwer, F. C. C. *et al.* A randomised placebo-controlled double-blind trial to assess the safety of intramuscular administration of allogeneic mesenchymal stromal cells for digital ulcers in systemic sclerosis: the MANUS Trial protocol. *BMJ Open* **8**, e020479 (2018).

219. Magalon, J. *et al.* Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 391–398 (2019).

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.