

Université de Montréal

**Étude du rôle de l'auto-antigène nucléaire centromérique B
(CENP-B) et des auto-anticorps anti-CENP-B dans l'activation
des cellules musculaires lisses vasculaires**

Implication potentielle dans la pathophysiologie de la sclérose systémique

par

Geneviève Robitaille

Programme de Sciences biomédicales

Département de médecine

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Docteur
en Sciences biomédicales

Juin 2009

© Geneviève Robitaille, 2009

Université de Montréal
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

Étude du rôle de l'auto-antigène nucléaire centromérique B (CENP-B) et des auto-anticorps anti-CENP-B dans l'activation des cellules musculaires lisses vasculaires
Implication potentielle dans la pathophysiologie de la sclérose systémique

présentée par :
Geneviève Robitaille

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Réjean Lapointe, président-rapporteur
Yves Raymond, directeur de recherche
Jean-Luc Senécal, co-directeur
Claude Perrault, membre du jury
Lucie Germain, examinateur externe
Daniel Lajeunesse, représentant du doyen de la FES

Résumé

La sclérose systémique (ScS) est une maladie auto-immune dont l'un des principaux auto-anticorps, dirigé contre la protéine centromérique B (CENP-B), est fortement associé à l'hypertension artérielle pulmonaire, l'une des causes majeures de décès dû à la ScS. L'hypertension résulte de l'occlusion progressive des vaisseaux suite à une hyperactivation des cellules musculaires lisses (CML) de la paroi vasculaire. Cependant, les facteurs responsables de ce remodelage vasculaire restent inconnus. Plusieurs études récentes ont démontré que certains auto-antigènes possèdent des fonctions biologiques additionnelles lorsqu'ils se retrouvent dans le milieu extracellulaire. En effet, une fois libérés par nécrose ou apoptose, ces auto-antigènes adoptent une activité biologique qui s'apparente à celles des cytokines et peuvent ainsi participer aux processus normaux de réparation de blessure et/ou acquérir une activité pathogène qui contribue au développement de certaines maladies auto-immunes. Nos résultats suggèrent que la CENP-B peut être ajoutée à cette liste de molécules bifonctionnelles. À l'aide des techniques d'immunofluorescence, d'ELISA cellulaire et de cytométrie en flux, nous avons démontré que la CENP-B se liait spécifiquement à la surface des CML vasculaire de l'artère pulmonaire avec une plus grande affinité pour le phénotype contractile que synthétique. Cette liaison provoquait la migration des cellules ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 et 8. Les mécanismes par lesquels la protéine exerçait ces effets impliquaient la phosphorylation de FAK et Src ainsi que la voie des MAP kinases, avec ERK1/2 et p38. Des études de signalisation intracellulaire effectuées à l'aide de plusieurs

inhibiteurs spécifiques ainsi que des études de désensibilisation nous ont permis d'identifier le récepteur de la CENP-B en plus d'identifier les mécanismes complets de sa signalisation membranaire. Nous avons démontré que la CENP-B se liait de manière spécifique aux CML vasculaire via le récepteur de chémokine 3 (CCR3) pour ensuite transactiver le récepteur EGF, selon un mécanisme métalloprotéase-dépendant qui implique le relargage du HB-EGF. Cette transactivation est un processus important dans l'activation de la voie des MAP kinases ainsi que dans la sécrétion d'IL-8 induite par la CENP-B. Finalement, nous avons démontré que les auto-anticorps anti-CENP-B pouvaient abolir cette cascade de signalisation, empêchant ainsi la CENP-B d'exercer son rôle de cytokine. L'identification de la CENP-B comme ligand du CCR3 ouvre donc plusieurs perspectives quant à l'étude du rôle pathogène des auto-anticorps anti-CENP-B dans la ScS.

Mots-clés : Sclérose systémique, hypertension artérielle pulmonaire, cellules musculaires lisses vasculaires, CENP-B, auto-antigènes bifonctionnels, anti-CENP-B, CCR3, transactivation du récepteur à l'EGF

Abstract

CENP-B is a highly conserved, centromere associated protein and is a major autoantigen in systemic sclerosis (SSc). Anti-CENP-B autoantibodies are associated with prominent vascular manifestations such as pulmonary arterial hypertension (PAH) in the limited cutaneous subset of SSc. PAH occurs as a consequence of progressive obliteration of small arteries due to vascular smooth muscle cell dysfunction, migration and proliferation. However, the factors driving this obliteration are unknown. Earlier *in vitro* studies have demonstrated that some autoantigens have an additional role when they are released in the extracellular environment during the course of injurious insults resulting in cell death. Indeed, it was previously suggested that extracellular autoantigens participate in normal wound repair processes by acting like cytokines and/or chemokines and subsequently displaying pathogenic activities that contribute to the development of autoimmune diseases. Our present findings suggest that the nuclear autoantigen CENP-B can be added to this set of bifunctional molecules. The present study clearly indicates that exogenous CENP-B bound specifically to the surface of human pulmonary artery SMCs. Binding of CENP-B to SMC stimulated their migration during *in vitro* wound healing assays, as well as their secretion of interleukins 6 and 8. The mechanism by which CENP-B mediated these effects involved the focal adhesion kinase, Src, ERK1/2, and p38 MAPK pathways. Moreover, CENP-B released from apoptotic endothelial cells was found to bind to SMC, thus indicating a plausible *in vivo* source of extracellular CENP-B. Here, we also report several lines of evidence indicating that CENP-B, which has no obvious primary or

secondary structural homology to chemokines, induced SMC activation by interacting with CCR3. Moreover, the present study clearly demonstrates the involvement of EGFR in CENP-B signaling leading to IL-8 secretion. Finally, anti-CENP-B autoantibodies were found to abolish this signaling pathway, thus preventing CENP-B from transactivating EGFR and exerting its cytokine-like activities toward vascular SMCs. The present study sheds new light on the possible role of extracellular CENP-B and its potent biological effects on human pulmonary artery SMCs. The identification of CENP-B as a CCR3 ligand opens up new perspectives for the study of the pathogenic role of anti-CENP-B autoantibodies.

Keywords : Systemic sclerosis, Pulmonary artery hypertension, vascular smooth muscle cells, CENP-B, bifunctional autoantigen, anti-CENP-B, CCR3, EGFR transactivation

Table des matières

INTRODUCTION.....	24
1. SYSTÈME IMMUNITAIRE ET TOLÉRANCE.....	24
1.1. Maladies auto-immunes	27
2. LA SCLÉROSE SYSTÉMIQUE	31
2.1. Manifestations cliniques	32
2.2. Les différentes formes de la maladie	33
2.3. Épidémiologie et démographie	37
2.4. Génétique et modèles expérimentaux	38
3. PATHOPHYSIOLOGIE DE LA SCLÉROSE SYSTÉMIQUE.....	41
3.1. Cellules endothéliales	42
3.2. Cellules mononuclées	43
3.3. Fibroblastes	46
3.4. Cellules musculaires lisses vasculaires	47
4. AUTO-ANTICORPS ASSOCIÉS À LA SCS	54
4.1. Anticorps spécifiques.....	55
4.2. Auto-anticorps non-spécifiques	59
4.3. Rôles des auto-anticorps	61
4.4. Origine	63
5. AUTO-ANTIGÈNES	64
5.1. Propriétés structurales et biochimiques.....	66
5.2. Altération au cours de l'apoptose.....	66
5.3. Propriétés immunologiques et pro-inflammatoires.....	67
6. MORT CELLULAIRE ET AUTO-IMMUNITÉ	68
7. AUTO-ANTIGÈNES BIFONCTIONNELS.....	71
8. RÉCEPTEURS DE CHÉMOKINES.....	74
RÉSULTATS	80

ARTICLE NO.1 : L’AUTO-ANTIGÈNE NUCLÉAIRE CENTROMÉRIQUE B (CENP-B) SE LIE AUX CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES ET PROVOQUE LA MIGRATION CELLULAIRE ET LA SÉCRÉTION DE CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.	81
<i>Présentation de l’article no.1.....</i>	<i>82</i>
<i>Contribution des auteurs à l’article no.1.....</i>	<i>83</i>
ARTICLE NO.2 : L’AUTO-ANTIGÈNE NUCLÉAIRE CENTROMÉRIQUE B (CENP-B) SE LIE AUX CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES VIA LE RÉCEPTEUR DE CHÉMOKINE 3 (CCR3) ET TRANSACTIVE LE RÉCEPTEUR DE L’EGF.....	127
<i>Présentation de l’article no.2.....</i>	<i>128</i>
<i>Contribution des auteurs à l’article no.2.....</i>	<i>129</i>
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	169
RÔLE DE LA CENP-B DANS L’ACTIVATION DES CMLV	170
RÔLE POTENTIEL DE LA CENP-B ET DES ANTI-CENP-B DANS LA PATHOPHYSIOLOGIE DE LA SCS.....	176
VÉRIFICATION DU RÔLE DE LA CENP-B ET DES ANTI-CENP-B DANS DES MODÈLES PHYSIOLOGIQUES.....	181
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	185
BIBLIOGRAPHIE.....	188

Liste des tableaux

Tableau I.	Principaux ANA détectés dans la ScS.....	55
Tableau II.	Mécanismes impliqués dans le développement des auto-anticorps dans la ScS	63
Tableau III.	Principaux facteurs qui pourraient influencer la sélection des auto- antigènes.....	65
Tableau IV.	Auto-antigènes chimiotactiques pour les cellules dendritiques immatures..	73

Listes des figures

Figure 1.	Manifestations cliniques de la sclérose systémique.....	33
Figure 2.	Modulation phénotypique des CMLV observée <i>in vitro</i>	49
Figure 3.	Modèle de la pathogénèse de la ScS.....	53
Figure 4.	Aspects caractéristiques en IFI sur cellules HEp-2 des principaux ANA spécifiques de la ScS.....	56
Figure 5.	Mécanismes de transactivation du récepteur à l'EGF via les RCPG.....	77
Figure 6.	Hypothèse du rôle de l'auto-antigène CENP-B dans l'activation des CMLV.....	175
Figure 7.	Hypothèse des effets pathogènes des anti-CENP-B dans la pathophysiologie de la ScS.....	178

Liste des abréviations

AAC:	Anticorps anti-centromère
AACE :	Anticorps anti-cellules endothéliales
AAT:	Anticorps anti-DNA-topoisomérase I
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AIRE :	<i>Auto-immune regulator proteine</i>
ANA:	Anticorps anti-nucléaires
Anti-RNP:	Anticorps anti-RNA polymérase
APECED :	<i>Autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy</i>
APS-1 :	<i>Autoimmune polyendocrine syndrome-1</i>
BAFF :	<i>B cell-activating factor belonging to the TNF family</i>
CCR:	Récepteur de chémokine (motif C-C)
CD:	Cellules dendritiques
CE:	Cellules endothéliales
CENP-B:	Protéine centromérique B
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMLV:	Cellules musculaires lisses vasculaires
CPA :	Cellules présentatrices d'antigènes
CTLA-4:	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
DID:	Diabète insulino-dépendant
EAE :	Encoéphalo-myélite auto-immune expérimentale

EBV:	Virus de l'Epstein-Barr
EGF:	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA:	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays</i>
ERK1/2:	Extracellular signal-regulated Kinase 1 and 2
FAK:	<i>Focal adhesion Kinase</i>
GDP/GTP:	Guanosine diphosphate/Guanosine triphosphate
GvHD:	Maladie du greffon contre l'hôte
HB-EGF:	<i>Heparin-binding epidermal like growth factor</i>
Hep-2:	<i>Human Epithelioma Larynx no.2</i>
HISRS:	<i>Histidyl-tRNA synthetase</i>
HLA:	Antigène leucocytaire humain
HMGB1 :	<i>High mobility group box 1 protein</i>
HPASMC :	Cellule musculaire lisse de l'artère pulmonaire humaine
HTAP:	Hypertension artérielle pulmonaire
IFI :	Immunofluorescence indirecte
IgG:	Immunoglobuline de type G
IL:	Interleukine
IPEX :	Immune dysregulation polyendocrinopathy X-linked
LB:	Lymphocytes B
LED:	Lupus érythémateux disséminé

LT:	Lymphocytes T
LT _{reg} :	Lymphocytes T régulateurs
MAI:	Maladie(s) auto-immune(s)
MAIS:	Maladie(s) auto-immune(s) systémique(s)
MAPK:	<i>Mitogen-activated-protein kinase</i>
MEC:	Matrice extracellulaire
MMPs:	Métalloprotéases matricielles
NK:	<i>Natural killers</i>
PAH :	Hypertension artérielle pulmonaire
PFA :	Paraformaldéhyde
PR:	Polyarthrite rhumatoïde
PTPN22 :	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor 22</i>
RCPG:	Récepteurs couplés aux protéines G
RGS:	<i>Regulator of G protein signaling</i>
ScS:	Sclérose systémique
ScSl:	Sclérose systémique limitée
ScSd:	Sclérose systémique diffuse
Src :	Sarcoma
SS:	Syndrome Sjörgren
TGF- β :	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR:	Récepteur Toll-like

TNF- α : *Tumor necrosis factors alpha*

Tsk1: *Tight skin I*

À tous ceux qui ont cru en moi et qui m'ont supportée pendant ces nombreuses années
À ma famille, mon amour, mes amis,
À moi!

Remerciements

La présentation de cette thèse de doctorat est le résultat de plusieurs années de dur travail et d'acharnement. Au cours de ces cinq dernières années, il m'est arrivé de passer par une gamme complète d'émotions, en passant par l'euphorie extrême que procurent les découvertes jusqu'à la déception amère face aux échecs de la recherche. La réalisation de ce projet s'est faite grâce à la collaboration et la participation de plusieurs personnes qui ont été sollicitées pour leur compétence et qui m'ont soutenue et encouragée sans relâche. Mes remerciements vont donc à l'endroit de tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce travail.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Yves Raymond ainsi que mon co-directeur, le Dr. Jean-Luc Sénécal, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser ce doctorat au sein de leur équipe et de m'avoir guidée et éclairée tout au long de ce projet. Votre patience, votre enthousiasme et vos judicieux conseils m'ont permis de mener à terme mon projet de recherche. Merci de m'avoir transmis votre savoir et votre passion. Merci d'avoir cru en moi, et surtout, merci pour la confiance aveugle que vous m'avez octroyée au cours de ces cinq dernières années.

Merci à mes collègues et amis qui ont participé à la réalisation de ce projet. Merci au Dr. Marie-Soleil Christin-Piché pour son support technique, ses innombrables idées et discussions scientifiques interminables, mais surtout pour son support moral infaillible et sa précieuse amitié. Merci au Dr. Jill Hénault et à Julie Arcand pour leur aide scientifique, et

technique, mais surtout pour leur grande complicité. Merci à Isabelle Clément pour son extrême patience, sa bonne humeur constante et son expertise scientifique. Merci au Dr. Martial Koenig, seul représentant de la gente masculine dans notre laboratoire, pour son sens critique et ses précieux conseils. Merci également à Christian Charbonneau pour son expertise en microscopie confocale, sans qui la possibilité de faire la couverture de la revue *Arthritism & Rheumatism* aurait été impossible. Ces personnes ont toutes fourni une aide et de précieuses suggestions qui m'ont permis d'enrichir le contenu et la forme de ce présent travail.

J'aimerais témoigner toute ma gratitude et ma reconnaissance aux membres de la Société Sclérodermie Québec, qui travaillent sans relâche afin de stimuler la recherche dédiée à la sclérodermie. Il aurait certes été impossible de continuer mes études post-graduées sans leur soutien financier ainsi que ceux du Dr. Raymond et du Dr. Senécal.

Je présente aussi mes remerciements aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. C'est avec un grand plaisir que seront reçues vos remarques et suggestions dans un but évident d'amélioration.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude à tous les membres de ma famille et amis qui m'ont encouragée, m'ont supportée et soutenue tout au long de ces années. Tout d'abord un gros merci à mes parents, Pierre et Lise et ma sœur, Isabelle, pour leur support moral (et financier !!) constant ainsi que pour leurs encouragements et sans qui la réalisation de ce projet aurait été impossible. Faire un

doctorat est une chose difficile, mais vivre avec quelqu'un qui en fait un est une tâche tout aussi laborieuse...sinon plus! Merci à mon amour, Patrick, qui a toujours cru en moi et qui a partagé ma passion au quotidien. Merci de m'avoir supportée à travers toutes ces épreuves. Merci pour ta patience, merci d'avoir compris et d'avoir respecté mon choix. Maman, papa, ma sœur, mon amour, vous avez tous et chacun participé à la réalisation de ce projet. Merci de m'avoir aidée à réaliser mon rêve. Vous avez été, et serez toujours pour moi, le soutien le plus important!

Avant-propos

La sclérose systémique (ScS) est une maladie auto-immune rare, qui affecte essentiellement la peau mais aussi, dans sa forme généralisée ou systémique, les organes internes mettant en jeu le pronostic fonctionnel et vital du malade. Cette maladie est une affection généralisée du tissu conjonctif, des artérioles et des microvaisseaux, caractérisée par le développement de phénomènes de fibrose et d'oblitération vasculaire. Avec une prévalence estimée, aux Etats-Unis, de 276 cas par million d'habitants dans la population adulte et son pronostic sévère, la ScS fait encore partie des maladies orphelines à la recherche d'un traitement qui ne soit pas purement symptomatique.

Malheureusement, la ScS est encore aujourd'hui une maladie incurable et bien que plusieurs médicaments permettent de stabiliser la maladie, voire de faire régresser certains symptômes, il n'existe, à ce jour, aucun traitement capable de la guérir complètement. Au cours des 20 dernières années, la recherche a permis de mieux comprendre les mécanismes pathologiques impliqués dans la ScS, d'en faciliter le diagnostic et d'en améliorer notablement les traitements. Néanmoins, bien que les récentes avancées thérapeutiques aient permis de réduire considérablement l'incidence de complications fatales associées à la ScS, comme les crises rénales (1), cette maladie possède encore le taux de mortalité le plus élevé parmi les maladies auto-immunes rhumatismales (2).

Une meilleure compréhension de sa pathologie et des mécanismes impliqués dans son développement serait donc un atout primordial afin d'élaborer de nouvelles thérapies.

L'avènement de meilleures thérapies n'est possible qu'en poursuivant la recherche actuelle dédiée à cette maladie et, surtout, en explorant de nouvelles avenues de recherche. Le but de l'étude présentée dans cette thèse était justement d'explorer une facette encore très mal connue de la ScS, c'est-à-dire d'étudier le rôle potentiel des auto-antigènes et auto-anticorps dans le développement de certaines des manifestations cliniques associées à la maladie.

Dans la ScS, l'un des principaux auto-anticorps, dirigé contre la protéine centromérique B (CENP-B), est fortement associé à des manifestations vasculaires telles que les ulcérations digitales et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTPA), l'une des causes majeures de décès dû à la ScS. L'HTAP chez les patients sclérodermiques peut apparaître suite à des complications de la fibrose interstitielle pulmonaire, mais apparaît généralement indépendamment de la fibrose, dans la forme limitée de la maladie (3, 4). L'hypertension résulte, en partie, de l'occlusion progressive des vaisseaux suite à une hyperactivation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Cependant, les facteurs responsables de ce remodelage vasculaire ainsi que les mécanismes mis en jeu sont encore inconnus.

Le but de la recherche était donc d'évaluer s'il existe une relation directe entre la présence de l'auto-antigène CENP-B et/ou des anticorps anti-CENP-B et l'hypertension pulmonaire développée chez un sous-type de patients sclérodermiques. Plusieurs études récentes ont démontré que certains auto-antigènes possèdent des fonctions biologiques additionnelles lorsqu'ils se retrouvent dans le milieu extracellulaire. En effet, une fois

libérés par nécrose ou apoptose, ces auto-antigènes adoptent une activité biologique qui s'apparente à celles des cytokines et peuvent ainsi participer aux processus normaux de réparation de blessure et/ou acquérir une activité pathogène qui contribue au développement de certaines maladies auto-immunes. Au cours de cette étude, nous avons donc examiné les effets biologiques de l'auto-antigène CENP-B sur les cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire humaine (HPASMC), son implication potentielle dans le développement de l'HTAP ainsi que le rôle pathogène des anti-CENP-B.

Les objectifs généraux de la thèse:

1. Vérifier si l'auto-antigène centromérique B (CENP-B), associé à la forme limitée de la ScS, peut être ajouté à la liste des auto-antigènes bifonctionnels.
2. Déterminer si la CENP-B peut avoir des effets biologiques sur les CMLV, responsables de l'oblitération vasculaire observée au cours de l'HTAP.
3. Étudier les mécanismes d'action et de signalisation de la CENP-B.
4. Évaluer, dans le contexte de la ScS, quelle serait la source extracellulaire de la CENP-B.
5. Déterminer si la CENP-B et/ou les complexes CENP-B/anti-CENP-B pourraient participer au développement et/ou au maintien des manifestations vasculaires associées à la forme limitée de la maladie.

Présentation de la thèse :

Nos résultats démontrent clairement que l'auto-antigène nucléaire CENP-B possède toutes les caractéristiques d'une molécule bifonctionnelle. Une fois libéré par des cellules endothéliales en apoptose, la CENP-B peut se lier aux CMLV et induire la migration cellulaire ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (**article no.1**). Nos résultats suggèrent aussi que la CENP-B exerce ses effets en interagissant avec le récepteur CCR3 (*the chemokine C-C motif receptor 3*), pour ensuite transactiver le récepteur de l'EGF. Finalement, nous avons démontré que les auto-anticorps anti-CENP-B pouvaient abolir cette cascade de signalisation, empêchant ainsi la CENP-B d'exercer son rôle de cytokine (**article no.2**).

Globalement, les résultats présentés dans cette étude amènent donc pour la première fois, des preuves concrètes du rôle physiologique de la CENP-B dans les processus de réparation de blessure *in vitro* et nous permettent de suggérer que les auto-anticorps anti-CENP-B de patients sclérodermiques pourraient, dans certaines circonstances, agir comme agents pathogènes et participer au développement de manifestations vasculaires souvent observées au cours de la forme limitée de la ScS.

La section **Introduction** résume les données présentes dans la littérature qui nous ont amenés à nous questionner sur le rôle des auto-antigènes et des auto-anticorps dans la ScS. La section **Discussion générale**, comprend un résumé de l'ensemble des résultats obtenus durant notre étude ainsi qu'une mise en contexte avec la littérature concernant la

ScS et les sujets connexes. Finalement, la conclusion de cette thèse résume les contributions apportées par notre étude au domaine de la recherche sur la ScS et présente les perspectives d'avenir de la recherche dans ce domaine.

Sur ce, je vous souhaite à tous une bonne lecture !

Introduction

1. Système immunitaire et tolérance

Le système immunitaire est notre garde du corps ; il est le principal moyen utilisé par l'organisme pour se défendre contre les agressions extérieures, qu'elles soient d'origines pathogènes (bactéries, virus, parasites, champignons), chimiques ou physiques (blessures). Deux types de réponses sont associés au système immunitaire : la réponse innée et la réponse humorale et cellulaire acquise.

L'immunité innée (ou naturelle) est une réponse immédiate qui survient chez tout individu en l'absence d'immunisation préalable; elle constitue la première barrière de défense vis-à-vis divers corps étrangers. L'immunité innée n'est pas spécifique pour un antigène, elle a plutôt recours à des mécanismes généraux de reconnaissance moléculaire pour détecter la présence de bactérie et de virus. Elle est en grande partie assurée par les anticorps préformés, appelés anticorps naturels, et par les cellules phagocytaires (monocytes, polynucléaires) et les lymphocytes NK (*Natural killers*). Ces cellules ne possèdent pas de récepteurs spécifiques à l'antigène, en revanche, elles expriment des récepteurs spécialisés, les récepteurs Toll ou TLR (*Toll-like receptors*), qui se lient à différents composés bactériens et viraux. Bien que très importante, cette réaction ne permet pas d'installer un état d'immunité spécifique qui préviendrait les récurrences. Elle ne laisse donc aucune mémoire immunologique.

Contrairement à l'immunité innée, le développement d'une immunité adaptative (ou acquise) est basé sur la sélection clonale de lymphocytes B (LB) ou lymphocytes T (LT)

dotés de récepteurs spécifiques à l'antigène, hautement diversifiés, qui permettent au système immunitaire de reconnaître des antigènes étrangers. Au cours de cette réponse immune adaptative, les lymphocytes activés spécifiques à l'antigène prolifèrent et se différencient en cellules effectrices aptes à éliminer les pathogènes. Ce type d'immunité permet aussi de générer des lymphocytes mémoires procurant une réponse plus rapide et plus efficace en cas de réinfection. Elle permet ainsi de mettre en place une mémoire immunitaire qui conduit à une protection de longue durée vis-à-vis le pathogène ciblé.

Peu importe le type de réponse engagée, les mécanismes de défense dépendent avant tout de la capacité de distinguer le « soi » du « non-soi ». Le fait que l'organisme soit capable de développer des réponses immunitaires vis-à-vis des constituants exogènes, tout en gardant une tolérance pour les constituants de ses propres cellules, constitue l'un des paradoxes de l'immunologie. Au cours de l'évolution, le système immunitaire a su développer plusieurs stratégies afin d'éliminer les cellules potentiellement auto-réactives et ainsi induire un état de tolérance au soi. Un de ces mécanismes consiste à éliminer précocement par apoptose les lymphocytes immatures auto-réactifs dans la moelle osseuse ou dans le thymus, par un processus appelé délétion clonale ou sélection négative (5). Globalement, la grande majorité des lymphocytes ayant une forte affinité pour les antigènes du soi sont éliminés lors de cette étape. Toutefois, il persiste à l'état physiologique des cellules auto-réactives qui doivent être contrôlées par différents mécanismes de régulation afin d'empêcher l'apparition de maladies auto-immunes. C'est alors que des mécanismes de tolérance périphérique prennent le relais afin d'éviter une activation inappropriée de ce type

de cellule. Ces mécanismes de contrôle peuvent s'exercer à plusieurs niveaux. Par exemple, le remplacement des chaînes légères par un processus appelé traitement des récepteurs (*receptor editing*), peut sauver de l'élimination certaines cellules B auto-réactives contre le soi, en modifiant leur spécificité pour l'antigène (6). Les conditions d'activation des cellules immunitaires sont aussi finement contrôlées. Leur activation ne peut s'effectuer que s'il existe une coopération étroite entre les différents partenaires, notamment entre les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques (CD) et les LT, qui échangent continuellement des signaux d'activation et de co-stimulation. Si un seul maillon de cette signalisation vient à manquer, la cellule immunitaire est inactivée selon un mécanisme appelé anergie clonale (7, 8). Le contrôle s'exerce également à un autre niveau, soit après l'activation du système immunitaire, où plusieurs types cellulaires entrent en jeu afin de freiner l'apparition de réponses auto-immunes. C'est le cas entre autres des populations de lymphocytes T régulateurs (LT_{reg}). Les T_{reg} sont des cellules CD4⁺/CD25⁺ qui expriment le facteur de transcription Foxp3 et qui exercent une fonction suppressive capable d'inhiber l'activité des LT pathogènes, qu'ils soient de type Th1 ou Th2. Ces LT_{reg} agissent par la synthèse de cytokines inhibitrices, en particulier l'IL-10 et le TGFβ, mais aussi par un contact intercellulaire via la voie B7-CD28/CTLA4 (9-11). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré le rôle clé des LT_{reg} dans le maintien de l'homéostasie ainsi que dans la protection contre les maladies auto-immunes (MAI) (10-12). Le système immunitaire dispose aussi de plusieurs autres mécanismes d'immunorégulation complémentaires, tels que la production de cytokines anti-inflammatoires et la phagocytose

de cellules apoptotiques, qui permettent de limiter l'accès des auto-antigènes aux lymphocytes auto-réactifs circulants.

1.1. Maladies auto-immunes

Les sujets normaux n'engagent pas de façon durable des réponses immunes adaptatives contre leurs propres antigènes et, bien que des réponses passagères puissent intervenir contre des tissus du soi endommagés, elles provoquent rarement un surcroît de lésions tissulaires. Toutefois, dans certains cas, des réponses immunes de longue durée contre des tissus du soi peuvent apparaître et provoquer des lésions sévères caractéristiques des MAI. Ces maladies peuvent être schématiquement divisées en MAI spécifiques à certains organes ou tissus comme les thyroïdites auto-immunes, le diabète insulino-dépendant (DID), la myasthénie et l'uvéïte auto-immune ou en MAI non spécifiques appelées maladies auto-immunes systémiques (MAIS) qui comprennent entre autre le lupus érythémateux disséminé (LED), le syndrome de Sjögren (SS), la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou encore la sclérose systémique (ScS).

Près d'une cinquantaine de MAI ont été identifiées jusqu'à présent et leur prévalence globale, estimée autour de 3 %, fait de ce groupe de maladies un problème de santé publique important (13). L'origine de ces MAI est inconnue mais il existe de façon certaine une interaction des facteurs propres à l'individu (facteurs génétiques et endocriniens) avec des facteurs environnementaux.

L'importance des facteurs génétiques dans les MAI est mise en évidence par l'observation des formes familiales et surtout par la concordance de ces maladies chez les jumeaux monozygotes. A titre d'exemple, la fréquence des formes familiales du LED est évaluée entre 5 à 12 % des cas (14) et le risque de développer la maladie chez un apparenté du 1^{er} degré (parents, fratrie ou enfants) d'un patient lupique est d'environ 20 fois supérieur à celui de la population générale (15). Les études des jumeaux homozygotes montrent un taux de concordance estimé à 15 % pour la PR (16), à près de 40 % pour le DID (17) et entre 24 et 58 % pour le LED, taux qui est parmi les plus élevés dans les MAI (15).

Bien que plusieurs études d'association et de liaison aient mis en évidence un rôle prépondérant du locus *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*) dans la susceptibilité génétique d'un grand nombre de MAI (18), les résultats actuels ne permettent pas d'identifier une région d'intérêt unique. Les molécules HLA sont codées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et jouent un rôle central dans la présentation antigénique aux cellules T. Actuellement, l'implication de plusieurs autres gènes est en cours d'étude (19, 20). Ainsi, des polymorphismes génétiques retrouvés chez certains gènes impliqués dans la régulation de l'activation lymphocytaire dont *CTLA-4* (*Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4*) et *PTPN22* (*Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor 22*) ont été associés avec une susceptibilité accrue de développer certains MAI comme le DID, la PR et le LED (21-24). Des gènes codant pour des cytokines inflammatoires dont le $\text{TNF-}\alpha$ ont aussi été associés à la survenue de plusieurs MAI (25) (pour un article de revue voir ref. (19)).

Bien qu'en général la susceptibilité aux MAI soit dite polygénique, il existe quelques exemples d'affections dites monogéniques résultant de mutations ponctuelles dans un gène qui est directement impliqué dans la tolérance au soi (26). À ce jour, les trois principales sont des affections très rares caractérisées par un défaut de régulation des LT.

- ❖ Le syndrome IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*) est lié à des mutations du gène *FOXP3* (27, 28) qui code pour un facteur de transcription appelé Scurfin, nécessaire à l'activité des LT_{reg} (29). Chez les patients atteints du syndrome IPEX, les LT_{reg} ont une fonction suppressive déficiente permettant ainsi la sélection et la prolifération d'un plus grand nombre de LT auto-réactifs (30).

- ❖ Le syndrome APECED (*autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy syndrome*), appelé aussi APS-1 (*autoimmune polyendocrine syndrome-1*), est caractérisé par les mutations du gène *AIRE* (*auto-immune regulator proteine*), (31). La fonction principale de ce gène est de promouvoir l'expression d'antigènes spécifiques des tissus périphériques (insuline, thyroglobuline, protéine basique de la myéline, antigène rétinien...) dans les cellules épithéliales médullaires du thymus, processus essentiel à la sélection négative. C'est l'expression ectopique de ces antigènes tissulaires qui régule la tolérance contre différents organes tels que le pancréas et la thyroïde. Un défaut de fonctionnement du gène *AIRE* entraîne ainsi

une sélection négative déficiente causant une augmentation des LT auto-réactifs circulant (32, 33).

- ❖ Le syndrome ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*) se caractérise par des mutations du système FAS/FAS ligand régulant l'apoptose lymphocytaire. Cette déficience apoptotique provoque ainsi une accumulation de LT matures dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires. Habituellement, cette lymphoprolifération est dite bénigne mais il existe un risque accru de développer des lymphomes hodgkinien et non-hodgkinien (34).

Si la contribution de la génétique au développement des MAI est indéniable, elle est loin de tout expliquer. En effet, c'est souvent l'interaction d'une susceptibilité génétique avec des facteurs exogènes ou environnementaux qui prédispose au développement de la plupart des MAI. Ces facteurs peuvent mimer des antigènes du soi selon un phénomène appelé mimétisme moléculaire, ou encore modifier la réponse immunitaire de l'individu (35). Parmi les facteurs environnementaux souvent incriminés on retrouve les agents infectieux, notamment des virus, comme peut le suggérer le développement de la PR suite à certaines infections virales. Parmi les virus candidats, le virus d'Epstein-Barr (EBV) est souvent cité et correspond à l'un des virus dont le lien pathophysiologique avec la maladie a été le plus largement étudié (36-38). De même, certains médicaments peuvent induire l'apparition d'auto-anticorps et de manifestations cliniques apparentées aux MAI. Le modèle classique est celui du traitement par la procainamide dans l'apparition du LED (39). Il a

aussi été démontré que des médicaments plus récemment utilisés comme les anti-TNF- α peuvent induire une auto-immunité biologique, qui peut parfois même s'accompagner de manifestations cliniques (40-42). De plus, il a été suggéré qu'une exposition professionnelle et prolongée à des substances toxiques, telles que la silice, peut favoriser le développement de certaine MAI, comme la ScS (43, 44).

Les récents progrès de l'immunopathologie éclairent de plus en plus notre compréhension des MAI mais, même si nous avons une idée beaucoup plus précise de la pathogénèse et de l'étiologie de ce type de maladie, les mécanismes par lesquels les différents facteurs génétiques et environnementaux conduisent à une rupture de tolérance du système immunitaire sont encore bien mal connus.

2. La sclérose systémique

La sclérose systémique (ScS), mieux connue sous le nom de sclérodermie, est une MAIS appartenant au groupe des connectivites. Le nom sclérodermie est dérivé du grec « skleros » qui signifie dur ou induré et « derma » qui signifie peau. Par définition, la sclérodermie est donc la maladie de la « peau qui devient dure ». La première description précise de la maladie a été retrouvée dans la monographie de Carlo Curizo en 1753. Toutefois, ce n'est qu'en 1847 que Gintrac introduisit le terme actuel de sclérodermie, après avoir reconnu cette maladie comme étant majoritairement une affection de la peau (45). En 1945, Robert H. Goetz introduit le terme de sclérose systémique progressive devant l'atteinte systémique évidente qu'il avait observée au cours du processus pathologique de la

maladie (46). Le qualificatif « progressive » fut par la suite abandonné peu à peu et la plupart des études scientifiques utilisent actuellement le terme de sclérose systémique, une appellation qui sera adoptée tout au long de ce travail.

2.1. Manifestations cliniques

Le terme sclérose systémique est donc utilisé aujourd'hui pour décrire une affection généralisée du tissu conjonctif caractérisée par une atteinte cutanée, comportant une peau épaissie et sclérotique, ainsi qu'une atteinte polyviscérale. Cette maladie résulte d'une production excessive et anarchique des composants de la MEC, dont le collagène, par les fibroblastes, aboutissant à une fibrose intense, parfois même généralisée qui entraîne un durcissement et une diminution des fonctions des organes atteints. Le degré de durcissement de la peau est variable d'un patient à l'autre et la sévérité de la maladie dépend de l'ampleur de l'atteinte cutanée et des organes touchés.

Dans sa forme la plus grave, le durcissement de la peau peut couvrir une partie importante du corps et entraîner une perte fonctionnelle par diminution de la capacité de bouger les muscles, les tendons et les articulations. De manière générale, l'atteinte des mains est l'un des symptômes les plus courants de la ScS. Il en résulte un durcissement de la peau des doigts appelé sclérodactylie. Peu à peu, la peau devient tendue, indurée et prend un aspect luisant. L'atteinte cutanée limite la souplesse et la mobilité des tissus, entraînant dans la majorité des cas une contracture en flexion des doigts (Fig. 1A). Parallèlement, au niveau du visage, l'infiltration de la peau peut aussi s'accompagner d'atrophie. En termes

médicaux, il peut y avoir un faciès sclérodermique caractérisé par des yeux creux, un amincissement nasal, des plis péribuccaux, l'amincissement des lèvres et/ou une diminution de l'ouverture buccale (Fig. 1B).

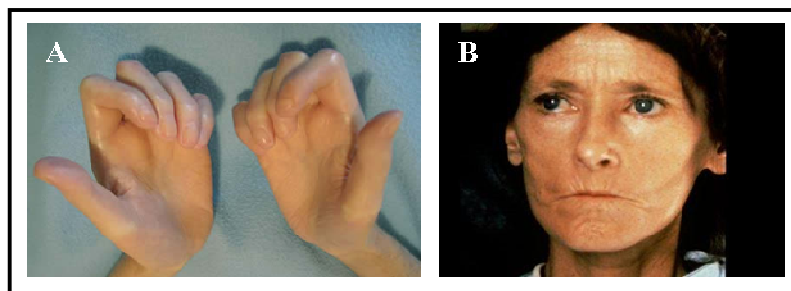


Figure 1. Manifestations cliniques de la sclérose systémique. (Propriété de *ISN Photo Repository*).

L'infiltration de collagène dans les poumons, l'intestin, le coeur ou les reins peut aussi causer une perte fonctionnelle considérable, diminuant ainsi l'espérance de vie des personnes atteintes. C'est ce phénomène de fibrose généralisée et d'accumulation de tissu fibreux de type cicatriciel dans la peau et les organes qui a valu à la ScS son surnom très éloquent de maladie qui momifie. La fibrose est souvent accompagnée de troubles vasculaires (hyperréactivité et/ou oblitération), comme le syndrome de Raynaud, les ulcérations digitales et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). En général, la maladie évolue sur plusieurs années selon l'une des deux formes principales : la sclérose systémique limitée (ScSl) ou la sclérose systémique diffuse (ScSd).

2.2. Les différentes formes de la maladie

Les deux principales formes de ScS diffèrent essentiellement par leur degré d'évolution et selon l'extension des lésions cutanées. La forme diffuse est caractérisée par

une atteinte cutanée qui touche le tronc et les membres, tandis que la forme limitée se caractérise par une atteinte cutanée qui se limite généralement aux extrémités. Toutefois, la frontière entre ces deux entités n'est pas toujours très précise et certains auteurs ont identifié des formes intermédiaires de la maladie lorsqu'il n'y a pas d'atteinte du tronc (47, 48).

La forme diffuse est reconnue comme étant beaucoup plus sévère et plus agressive que la forme limitée, à plusieurs points de vue (49) : l'atteinte de la peau peut être rapide et extensive, avec une atteinte articulaire et musculaire qui peut entraîner une perte fonctionnelle variable. Le risque d'atteinte viscérale est très élevé et une crise rénale aiguë peut survenir habituellement au cours des deux ou trois premières années qui suivent l'apparition des signes cutanés. Plus tardivement peuvent apparaître d'autres complications viscérales, essentiellement les atteintes digestives et la fibrose pulmonaire (50). L'atteinte pulmonaire constitue en fait l'une des complications les plus graves de la maladie et représente la première cause de mortalité, suivie de près par l'atteinte rénale et cardiaque (51). Le syndrome de Raynaud est aussi retrouvé dans près de 95 % des cas, alors que la prévalence dans la population en général est de 4 à 5 % (52). La sérologie est caractérisée par la présence d'anticorps anti-DNA-topoisomérase I (AAT) dans près de 30 % des cas (53). Les anticorps anti-RNA polymérase (anti-RNP) sont aussi fréquemment retrouvés et sont fortement associés à une atteinte cutanée extensive et sévère ainsi qu'à une atteinte rénale. Les patients qui possèdent un titre élevé de ce type d'auto-anticorps présentent donc généralement un moins bon pronostic vital (54, 55). La prévalence exacte de la forme

diffuse de la maladie peut varier selon les différentes études, mais on estime que la fréquence moyenne de cette forme de la maladie affecte environ 10-20 % des patients.

La forme limitée de la maladie est la plus fréquente et touche entre 50 et 60 % des malades. Elle se caractérise par une atteinte tégumentaire distale des membres, localisée surtout au niveau des doigts, des mains, des avant-bras, des pieds et du visage. Cette forme de la maladie survient généralement chez des sujets plus âgés qui souffrent du syndrome de Raynaud depuis plusieurs années (10-15 ans). Biologiquement, la ScSI est associée, dans près de 70-80 % des cas, à la présence d'anticorps anti-centromère (AAC) (53). Le syndrome de CREST est considéré comme étant une forme clinique particulière de la maladie. Cet acronyme correspond en fait à 5 symptômes souvent présents dans cette forme de la maladie ; la Calcinose sous-cutanée, un phénomène de Raynaud, une atteinte œEsophagienne, une Sclérodactylie et des Télangiectasies (56, 57). Le profil évolutif de la forme limitée de la maladie est caractérisé par une progression moins agressive, qui peut s'étendre sur plusieurs dizaines d'années. L'évolution de la maladie est donc, en général, de meilleur pronostic que la forme diffuse. Cependant, les patients peuvent développer à long terme des complications qui alourdissent le pronostic telles que des pertes digitales, une atteinte œsophagienne et l'apparition tardive d'une HTAP (58).

En effet, l'HTAP est l'une des causes majeures de décès dû à la ScS (3). Il s'agit d'une complication qui survient en moyenne après 10 ans d'évolution de la maladie et le taux de survie à un an, évalué dans les séries les plus récentes, est de l'ordre de 55 % (59).

Sa prévalence exacte au cours de la maladie est difficile à évaluer et varie entre 5 et 35 %, selon les populations étudiées et les méthodes de diagnostic utilisées (58, 60-63). La plus grande étude prospective effectuée sur une cohorte de 722 patients sclérodermiques rapportait récemment une prévalence de 12 % (64). L'HTAP est retrouvée plus fréquemment dans la forme limitée de ScS et plus particulièrement dans le syndrome de CREST, dans une proportion pouvant atteindre jusqu'à 54 % des patients (65). Dans les formes diffuses, l'HTAP peut apparaître suite à des complications de la fibrose interstitielle pulmonaire, celle-ci entraînant une amputation vasculaire pulmonaire ainsi qu'une vasoconstriction secondaire à l'hypoxie (66). Dans la forme limitée de la maladie, la pathophysiologie de l'HTAP est similaire à celle de l'HTAP primitive ou idiopathique et plusieurs mécanismes peuvent contribuer à l'occlusion progressive des vaisseaux ainsi qu'à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires : 1) la vasoconstriction artérielle, due à la présence d'une quantité accrue de molécules favorisant la contraction et l'oblitération des artères pulmonaires d'une part, et une quantité relativement insuffisante de molécules favorisant leur dilatation, d'autre part; 2) le remodelage de la paroi vasculaire pulmonaire, résultant d'une hypertrophie de la médiane des artères causée majoritairement par l'hyperactivation et la prolifération intimale des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV); 3) la formation de microthrombus in situ; 4) une inflammation périvasculaire (4, 66).

La ScS se manifeste donc de façon très variable d'un individu à l'autre et l'évolution et le pronostic vital dépendent, avant tout, du type de ScS (limitée ou diffuse), des organes

affectés et du degré d'agressivité de la maladie. Les décès sont principalement liés aux défaillances ventriculaires droites liées à l'HTAP, aux insuffisances respiratoires secondaires à la fibrose pulmonaire, aux états cachectiques comme conséquences de l'atteinte digestive avec malabsorption et aux crises rénales aiguës (67). Les taux de survie associés aux différentes formes de la maladie varient souvent selon les études effectuées. A titre d'exemple, dans une série monocentrique récente de 309 malades du Canada francophone, les taux de survie des formes limitées et diffuses après dix ans d'évolution de la maladie étaient respectivement de 89 et 62 % (48).

2.3. Épidémiologie et démographie

La ScS est une connectivite suffisamment rare pour être considérée comme une maladie orpheline par les autorités de la santé. Pourtant, cette maladie est plus fréquente que la dystrophie musculaire, la sclérose en plaques et la leucémie. La ScS a une répartition ubiquitaire mais, en raison de sa faible incidence, les études épidémiologiques sont peu nombreuses et il s'avère difficile d'en estimer la prévalence exacte. Les résultats des études épidémiologiques diffèrent selon la période d'étude, les régions ainsi qu'en fonction des populations étudiées (race et sexe). Aujourd'hui, la prévalence de la ScS dans la population adulte des États-Unis est estimée à 276 cas/million d'habitants. Malheureusement, en raison du manque d'études épidémiologiques au Québec, nous ne connaissons pas la fréquence exacte de la ScS dans notre milieu. Toutefois, en appliquant la fréquence américaine connue à notre population, nous pouvons déduire qu'il y aurait actuellement environ 10 000 patients atteints de ScS avec 150 nouveaux cas qui s'ajoutent à chaque année, au Québec.

La ScS se développe généralement entre 30 et 50 ans avec une nette prédominance féminine. Le ratio moyen femme/homme varie généralement de 4/1 à 6/1 selon les études, avec une incidence maximale qui survient généralement avant la ménopause et qui diminue progressivement chez les personnes âgées de 50 ans et plus (51, 68). La ScS se développe donc essentiellement chez les adultes d'âge mûr, mais peut aussi se manifester exceptionnellement chez l'enfant (69) et très rarement chez les individus âgés de plus de 70 ans (70).

Cette affection touche *a priori* toutes les populations, mais sa fréquence varie selon l'origine ethnique des individus. A titre d'exemple, la prévalence et l'incidence sont légèrement plus élevées chez les Afro-américains que chez les caucasiens vivants dans la même région (68). La prévalence de la maladie la plus élevée en Amérique du Nord (660 cas par million d'habitants) a récemment été rapportée au sein d'une communauté Amérindienne de l'Oklahoma (71). A l'opposé, les Japonais présentent une prévalence de la maladie relativement peu élevée qui est estimée à 30.8 cas par million d'habitants (72).

2.4. Génétique et modèles expérimentaux

La ScS est une maladie multifactorielle complexe. Il est établi que des facteurs hormonaux ou environnementaux, tels la silice et autres solvants organiques, sont associés au développement de la maladie. Bien que les arguments en faveur d'une prédisposition génétique soient relativement faibles à ce jour, certains éléments suggèrent que des facteurs génétiques tiennent une place importante dans la pathophysiologie de la maladie. Des

analyses effectuées à partir de plusieurs cohortes ont permis de mettre en évidence l'existence de formes familiales de ScS. En effet, une étude faite à partir de 703 familles américaines a permis de démontrer qu'il existait un risque accru de développer la maladie pour les apparentés de premier degré avec un taux de récurrence à 1,6 % contre 0,026 % dans la population générale (73). A l'opposée, la plus grande étude menée jusqu'à présent chez des jumeaux, dont 24 étaient monozygotes, démontre une faible concordance pour l'expression clinique de la maladie (4,7 %). Toutefois, cette étude a démontré qu'il existait une différence significative et une plus forte corrélation avec la présence d'anticorps anti-nucléaires (ANA) de l'ordre de 90 % pour les jumeaux monozygotes et 40 % pour les jumeaux dizygotes (74).

Les travaux et analyses génétiques qui ont été effectués jusqu'à présent sur la ScS ont permis de mettre en évidence plusieurs gènes candidats pouvant se subdiviser principalement en trois groupes, qui correspondent aux trois grands axes de la maladie : les gènes des acteurs de la fibrose, ceux de la réponse immune et les gènes des acteurs vasculaires. La fibrose dans la ScS constitue le stade ultime et irréversible de la maladie. Les gènes candidats comprennent ceux codant pour les protéines constituant la MEC et ses régulateurs, facteurs de croissance et cytokines (fibrilline 1, ostéonectine, TGF- β) (75-78). L'association de certains allèles des gènes du CMH de type II avec la ScS a aussi été démontrée. Le génotype des molécules HLA (DR, DQ ou DP) varie fortement selon l'ethnicité (79) et le sexe (80) mais surtout selon la présence des différents types d'auto-anticorps associés à la ScS soit, les AAT ou les AAC (81). L'HTAP est la principale

complication vasculaire pulmonaire dans la ScS et est associée à une surmortalité importante (82). Cette complication met en jeu de nombreux médiateurs et modulateurs du tonus et du remodelage artériel. Chaque gène intervenant dans ces régulations peut donc être considéré comme un gène candidat important. Ces dernières années, plusieurs gènes ont été étudiés, dont les gènes codant pour la protéine nitrique oxyde synthétase et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (83).

Les modèles animaux de la ScS sont des outils intéressants permettant de mieux comprendre l'influence de la génétique dans l'expression de la maladie. Ils permettent par exemple d'étudier un phénotype après invalidation de certains gènes d'intérêt, comme les gènes impliqués dans la fibrose. Il existe certains modèles animaux et la plupart présentent plusieurs des caractéristiques importantes de la ScS : fibrose, inflammation, lésions vasculaires, changements immunologiques. Ces modèles peuvent être séparés en plusieurs catégories dans lesquelles la fibrose peut être induite par des mutations génétiques (souris *Tsk1* et les souris MRL/lpr γ R^{-/-}), par des agents externes (chlorure de vinyle, bleomycine), ainsi que par le transfert de cellules immunitaires (GvHD : *Graft versus Host Disease*). Bien que beaucoup plus rare, il existe aussi des mutations spontanées qui favorisent le développement des différents signes cliniques apparentés à la ScS. C'est le cas des modèles aviaires UCD 200/206, qui représenterait le modèle animal qui reflète le mieux la situation clinique, histopathologique et immunologique observée dans la ScS (84-86). Cependant, les modèles animaux ne reproduisent pas toujours avec exactitude les caractéristiques de la ScS humaine et certains d'entre eux peuvent développer des pathologies supplémentaires qui ne

sont pas habituellement observées au cours de la ScS (pour des articles de revue voir les ref. (87, 88)).

3. Pathophysiologie de la sclérose systémique

La ScS est donc considérée comme une maladie auto-immune extrêmement complexe dont la pathophysiologie est encore mal comprise. A ce jour, il n'existe aucune hypothèse pathogène expliquant tous les aspects de cette maladie. Néanmoins, il est maintenant clairement établi que les différentes manifestations pathogènes et cliniques observées au cours de la maladie résultent de plusieurs dérèglements et d'anomalies touchant principalement trois types cellulaires; les cellules endothéliales (CE), les cellules mononuclées (en particulier les lymphocytes et les monocytes) et les fibroblastes, sans pour autant que l'on puisse identifier l'une de ces cellules comme étant isolément responsable du développement de la maladie. Ensemble, ces trois populations cellulaires sont donc tenues responsables de la majorité des changements pathophysiologiques associés à la ScS : la production excessive et l'accumulation progressive de protéines de la MEC dans les tissus menant à la fibrose cutanée et multi-viscérale, l'altération de la microvasculature (hyperréactivité et oblitération vasculaire) ainsi que la dérégulation des réponses immunitaires cellulaires et humorales (infiltration massive de cellules mononuclées dans les tissus et production d'auto-anticorps).

3.1. Cellules endothéliales

L'endothélium est formé d'une seule couche de cellules qui tapisse la face interne des vaisseaux sanguins. En plus de permettre les échanges entre la lumière des vaisseaux et les tissus interstitiels, l'endothélium joue un rôle fondamental dans le maintien du tonus vasculaire, en sécrétant divers agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Il régule également l'adhésion et la migration transendothéliale des cellules du système immunitaire.

Les dysfonctions vasculaires sont parmi les manifestations cliniques les plus précoces de la ScS (89). Les altérations de la microvasculature ainsi que les phénomènes d'hyperactivité vasculaires jouent un rôle très important dans le développement des lésions sclérotiques ainsi que dans celui des diverses manifestations vasculaires associées à la maladie, dont le syndrome de Raynaud, les ulcérations digitales et l'HTAP. Ces altérations vasculaires résultent en partie de la dégénérescence progressive de l'endothélium, causée entre autre par un dysfonctionnement des CE ainsi que par leur mort prématurée par apoptose. En effet, les CE retrouvées au niveau des lésions cutanées sclérodermiques perdent progressivement leur intégrité et une destruction complète de ces cellules a même été observée dans les lésions cutanées de la phase tardive de la maladie (90). De plus, les patients sclérodermiques possèdent des niveaux systémiques élevés de marqueurs de dommage vasculaire tels l'endothéline-1 et ses récepteurs (91), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (92), le facteur de von Willebrand (93, 94) et la thrombomoduline (95). Les mécanismes pathogènes aboutissant à une apoptose des CE ne sont pas complètement

élucidés. Cependant, il est possible que des anticorps anti-cellules endothéliales (AACE) y jouent un rôle important (96, 97) (voir section 4.5).

La dégénérescence de l'endothélium contribue ainsi à accroître la perméabilité vasculaire et entraîne la formation d'un infiltrat inflammatoire périvasculaire, constitué majoritairement de monocytes et de lymphocytes T, qui contribue à la genèse des lésions sclérotiques (98-100). On observe aussi à la surface des lymphocytes et des CE prélevés chez des patients sclérodermiques une augmentation de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion (101-104), nécessaires à leur migration vers les tissus interstitiels (105).

3.2. Cellules mononuclées

L'activation du système immunitaire est un autre évènement précoce et prédominant au cours de la ScS. Les monocytes sont parmi les premières cellules à migrer dans les tissus, mais ils semblent jouer un rôle important tout au long de la maladie, puisqu'ils sont retrouvés majoritairement dans les biopsies de peau prélevées tant au stade précoce de la maladie que dans des phases plus avancées (106, 107). Une fois activés et présents au niveau des tissus lésés, les monocytes/macrophages peuvent alors sécréter plusieurs facteurs solubles qui peuvent participer: 1) aux processus fibrotiques, en influençant la croissance, la différenciation et le chimiotactisme des fibroblastes; 2) à l'activation des CE, en augmentant la synthèse et l'expression d'intégrines, permettant ainsi d'accentuer la fixation des leucocytes circulant sur l'endothélium vasculaire; 3) à l'activation des CMLV ou encore 4) à

l'activation des autres cellules du système immunitaire, telles les lymphocytes T et B, perpétuant ainsi le cycle inflammatoire (108).

Selon plusieurs données expérimentales, les LT semblent aussi avoir un rôle primordial dans la pathogénèse de la maladie, puisque plusieurs populations activées ont été retrouvées chez les patients sclérodermiques. A titre d'exemple, des LT auxiliaires (CD4+) et cytotoxiques (CD8+) activés ont été retrouvés dans des biopsies cutanées (106, 109) ainsi que dans le sang périphérique des patients atteints de la maladie (110). La présence de LT mémoire a également été observée dans des biopsies de poumons prélevées chez des patients avec atteinte pulmonaire sévère (111). Ces LT activées produisent également plusieurs types de cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-17 qui peuvent stimuler les processus fibrotiques, les altérations vasculaires ainsi que la production d'auto-anticorps. (112, 113). De façon concordante, des taux augmentés de ces cytokines ont été observés dans le sérum des patients sclérodermiques (113, 114).

Même si les LT prédominent au niveau des lésions sclérodermiques, les LB sont également retrouvés en grand nombre et présentent un niveau d'activation élevée et soutenue. Cette activation chronique est caractérisée par une altération de l'homéostasie lymphocytaire, une hyperactivation polyclonale, une hypergammaglobulinémie ainsi qu'une activation des LB mémoire chez les patients atteints de la maladie (115-117). Bien que les mécanismes responsables de cette hyperactivation ne soient pas complètement élucidés, certaines anomalies dans le fonctionnement des LB pourraient en être responsables. En

effet, il a été démontré que les LB retrouvés chez les patients sclérodermiques présentaient une augmentation significative (environ 20 %) du niveau d'expression de la molécule de transduction CD19 comparativement aux sujets sains (118). Le CD19 fait partie des molécules régulées par le « *B cell-activating factor* » (BAFF), protéine qui exerce des fonctions essentielles dans la prolifération, l'activation et la survie des LB. Récemment, il a été démontré que les patients sclérodermiques présentaient des taux sériques significativement plus élevés de la molécule BAFF que les sujets sains (119). De plus, les LB sclérodermiques stimulées par BAFF démontraient une habilité accrue à produire des IgG ainsi que de l'IL-6 capable de stimuler directement les fibroblastes (119). Une altération au niveau de la fonction du CD22 a aussi été remarquée. Le CD22 est un co-récepteur qui inhibe l'activation des LB et la diminution de son expression et/ou de ses fonctions conduit à une réponse exagérée des cellules B (120).

Globalement, ces altérations pourraient donc activer les cellules B de manière chronique et provoquer un bris de tolérance envers certains auto-antigènes, favorisant ainsi la production d'auto-anticorps anti-nucléaires, retrouvés chez plus de 90 % des patients sclérodermiques (121). Certaines études en faveur de cette théorie ont récemment fourni des données intéressantes. En effet, des études effectuées chez les souris *Tight skin* ont démontré qu'une déplétion de la majorité des LB chez les nouveau-nés provoquait une diminution significative de la production d'auto-anticorps et de la fibrose cutanée, tandis qu'aucun effet marqué n'a pu être obtenu chez des souris adultes ayant déjà développé la

maladie (122). Ces données suggèrent donc que les LB sont impliqués préférentiellement dans l'initiation plutôt que dans le maintien de la ScS.

3.3. Fibroblastes

Les fibroblastes sont les cellules principales du tissu conjonctif et sont responsables de la synthèse de plusieurs composantes de la MEC, incluant le collagène. Ces cellules jouent normalement un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale des tissus ainsi que dans les processus de cicatrisation.

Au cours de la ScS, les fibroblastes subissent une activation soutenue et amplifiée et synthétisent en excès de nombreux constituants de la MEC, en particulier du collagène (123), mais aussi certains protéoglycanes (124) ainsi que la fibronectine (125), la laminine (126) et la fibrilline (127). Le remodelage progressif de l'architecture tissulaire provoqué par l'accumulation désordonnée de ces différents composants favorise ainsi l'apparition d'une fibrose, qui affecte la peau et le fonctionnement normal des différents organes. Les mécanismes responsables de cette hyperactivation ne sont pas complètement élucidés, mais de nombreux travaux ont récemment mis en évidence certains facteurs solubles synthétisés par les fibroblastes eux-mêmes, les CE ainsi que les cellules mononuclées. Parmi ces facteurs, on retrouve notamment le TGF- β , qui semble jouer un rôle prépondérant dans l'activation et la survie des fibroblastes en induisant la prolifération cellulaire et en diminuant la susceptibilité des fibroblastes à l'apoptose (128, 129). Le TGF- β peut aussi induire la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, présents en grande quantité au

niveau des lésions sclérodermiques. Ces cellules persistent généralement plus longtemps et sont responsables de la surproduction de collagène dans les tissus lésés (130, 131). Certaines anomalies intrinsèques, telles que des altérations géniques et phénotypiques, ont aussi été observées chez des fibroblastes de patients sclérodermiques. Dans cet ordre d'idée, plusieurs altérations dans les voies de signalisation régulant l'expression des gènes codant pour les composants de la MEC ont été rapportés, notamment au niveau de certains membres de la famille des Smads, impliqués dans la production du collagène de type I (132-134). Les fibroblastes sclérodermiques présentent aussi d'autres particularités qui pourraient favoriser l'accumulation de collagène chez les patients atteints de la maladie telles qu'une diminution de la production de collagénase (135), impliquée dans la dégradation de la MEC, une augmentation de la production des inhibiteurs de collagénase (136) ainsi qu'une susceptibilité accrue à certains facteurs de croissance (137).

3.4. Cellules musculaires lisses vasculaires

Les CMLV ne sont pas considérées comme étant des acteurs majeurs responsables de la fibrose observée au cours de la ScS. Néanmoins, elles peuvent aussi jouer un rôle important dans la pathogénèse de la maladie, en participant au dérèglement du contrôle du tonus vasculaire, à la genèse des lésions sclérotiques ainsi qu'à l'occlusion progressive des vaisseaux, caractéristiques de certaines maladies vasculaires telles que l'HTAP.

Les CMLV se situent dans la paroi des vaisseaux sanguins, majoritairement au niveau de la média, et jouent un rôle essentiel dans le développement et la régulation du

système vasculaire. Elles assurent d'abord la vasomotricité et le tonus artériel nécessaire au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. De plus, grâce à leur contraction ou relaxation, elles régulent le débit sanguin et participent au maintien d'une pression artérielle constante. Cependant, lors d'une insulte vasculaire, certaines CMLV vont être recrutées au niveau de la blessure afin de participer au remodelage, à la réparation et à la croissance vasculaire. Afin d'accomplir ces différentes fonctions, les CLMV possèdent la capacité de moduler leur phénotype de manière transitoire et réversible, selon un phénomène appelé modulation phénotypique (138). Ces cellules peuvent alors évoluer d'un phénotype différencié mature dit «contractile» vers un phénotype immature, dédifférencié, dit «synthétique». Ces deux phénotypes représentent en fait les extrêmes d'un éventail de phénotypes qui coexistent au niveau de la paroi vasculaire (139, 140).

Dans la média normale de la majorité des vaisseaux sanguins adultes, les CMLV se retrouvent généralement sous le phénotype contractile et sont responsables d'assurer le tonus vasculaire grâce à leurs propriétés élastiques. Ce type cellulaire se retrouve dans un état quiescent, leur activité synthétique est fortement diminuée et le répertoire protéique exprimé se limite presque exclusivement aux protéines responsables de la contraction cellulaire. A l'inverse, les CMLV synthétiques présentent une machinerie cellulaire beaucoup plus élaborée, leur permettant de proliférer, de migrer ainsi que de synthétiser de façon importante plusieurs constituants de la MEC (141). La modulation phénotypique des CMLV joue un rôle important *in vivo* lors du développement du système vasculaire, des

processus de réparation de blessure ou encore de pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose, l'HTAP et la resténose (142).

La plasticité phénotypique que possèdent les CMLV *in vivo* peut aussi être reproduite *in vitro*, selon différentes conditions de culture, en fonction de la présence de sérum ou selon la confluence cellulaire (138). En présence de sérum, les cellules adoptent un phénotype synthétique, qui se caractérise par une forme plutôt arrondie qu'on appelle épithéloïde, ainsi que par une distribution spatiale anarchique et une orientation irrégulière. En absence de sérum, les CMLV s'engagent dans un processus de modulation phénotypique et adoptent un phénotype contractile après 48 à 72 heures de culture (143). L'aspect morphologique de ces cellules est très caractéristique et diffère grandement du phénotype synthétique. Les cellules adoptent une forme allongée (*spindle shape*), la distribution spatiale est plus organisée et l'orientation est dite longitudinale (138, 139, 144) (Figure 2).

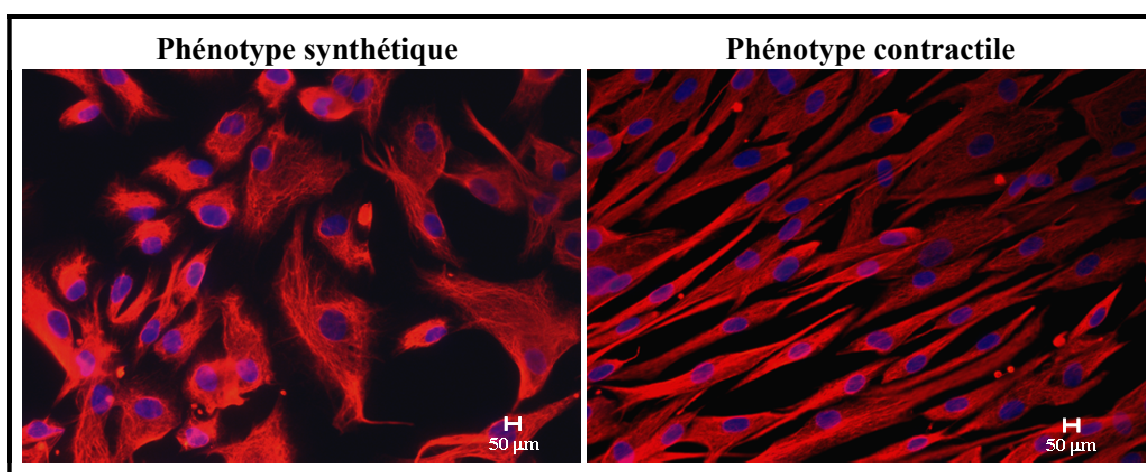


Figure 2. Modulation phénotypique des CMLV observée *in vitro*. (Figure adaptée de Robitaille et al (145)).

Ainsi, lors de dommages vasculaires, les CMLV contractiles subissent une modulation phénotypique transitoire, caractérisée par des altérations morphologiques et fonctionnelles. Les CMLV migrent d'abord de la média vers l'intima pour ensuite proliférer et sécréter des glycoprotéines, protéoglycanes, cytokines et facteurs de croissance afin de participer activement au processus de réparation de blessure. Bien que la modulation phénotypique des CMLV *in vivo* soit un élément clé dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques, très peu de facteurs responsables de cette différenciation ont été identifiés jusqu'à présent, à l'exception du PDGF-BB (*platelet-derived growth factor-BB*) (146). Certains d'entre eux pourraient être sécrétés par l'endothélium (147) ou encore par les cellules inflammatoires présentes au site même de l'insulte vasculaire (pour un article de revue, voir ref. (140)). Cependant, bien que ces stimuli puissent être susceptibles de jouer un rôle important, peu d'éléments de preuve ont été rapportés afin de démontrer leurs effets directs sur la différenciation et la maturation des CMLV, et presque rien n'est connu concernant les mécanismes précis par lesquels ils exercent leurs effets (142, 148).

Une fois la blessure réparée, les facteurs environnementaux à l'intérieur même du vaisseau sanguin retournent à une composition et un niveau physiologique normal, permettant ainsi aux CMLV de retrouver leur phénotype ainsi que leurs propriétés contractiles. Cet arrêt du signal permet alors de rétablir l'équilibre et laisse place au tissu fonctionnel (140). Toutefois, dans certaines conditions, les CMLV synthétiques perdurent au site de blessure ce qui, à long terme, peut être nuisible et néfaste pour l'organisme et peut

même contribuer au développement et/ou à la progression de maladies vasculaires. En effet, une migration soutenue, une prolifération excessive ainsi qu'une sécrétion incontrôlée de protéines de la MEC, de cytokines et facteurs de croissances peuvent provoquer un épaissement de l'intima et contribuer au rétrécissement de la lumière vasculaire. Ce remodelage vasculaire pourrait alors entraîner l'oblitération des vaisseaux, caractéristique principale de l'HTAP (140).

La ScS est donc une connectivite très complexe. Toutefois, des études récentes ont permis de mieux comprendre certains aspects de sa pathogénèse. Ainsi, il devient de plus en plus clair que les trois types majeures de cellules impliquées dans la pathogénèse de la ScS, à savoir les lymphocytes (T et B), les CE et les fibroblastes, interagissent par l'intermédiaire de multiples cytokines et facteurs de croissance ainsi que par des contacts cellulaires directs. En fait, les données les plus récentes suggèrent un modèle de pathogénèse de la ScS au cours de laquelle l'évènement le plus précoce serait un dommage aux CE périvasculaires. La dégénérescence de l'endothélium contribuerait ainsi à accroître la perméabilité vasculaire et entraînerait la formation d'un infiltrat inflammatoire dans les tissus, constitué majoritairement de monocytes/macrophages et de lymphocytes. L'activation subséquente des LB auto-réactifs ainsi que l'expansion clonale des LT participeraient aussi à perpétuer le cycle inflammatoire, de par la sécrétion soutenue de multiples cytokines pro-fibrotiques. Ces différents facteurs solubles pourraient ainsi favoriser le recrutement et l'activation des fibroblastes. Mis ensemble, ces processus résulteraient donc en une fibrose des tissus et, ultimement, en un développement de la ScS. Les manifestations vasculaires sont aussi des

complications graves observées fréquemment au cours de la maladie, dont certaines sont potentiellement mortelles. En effet, l'HTAP est une des complications de la ScS qui présente le plus mauvais pronostic. La migration des CMLV de la média vers l'intima constitue l'un des évènements précoces impliqués dans le remodelage vasculaire. En position intimale, les CMLV prolifèrent et synthétisent une matrice extracellulaire qui peut participer à la musculation artérielle. Les CMLV sont donc capables, par leurs capacités de dédifférenciation et de prolifération, à la fois d'être un acteur essentiel du processus de réparation vasculaire mais aussi de favoriser le développement d'un certain nombre de maladies vasculaires (Figure 3).

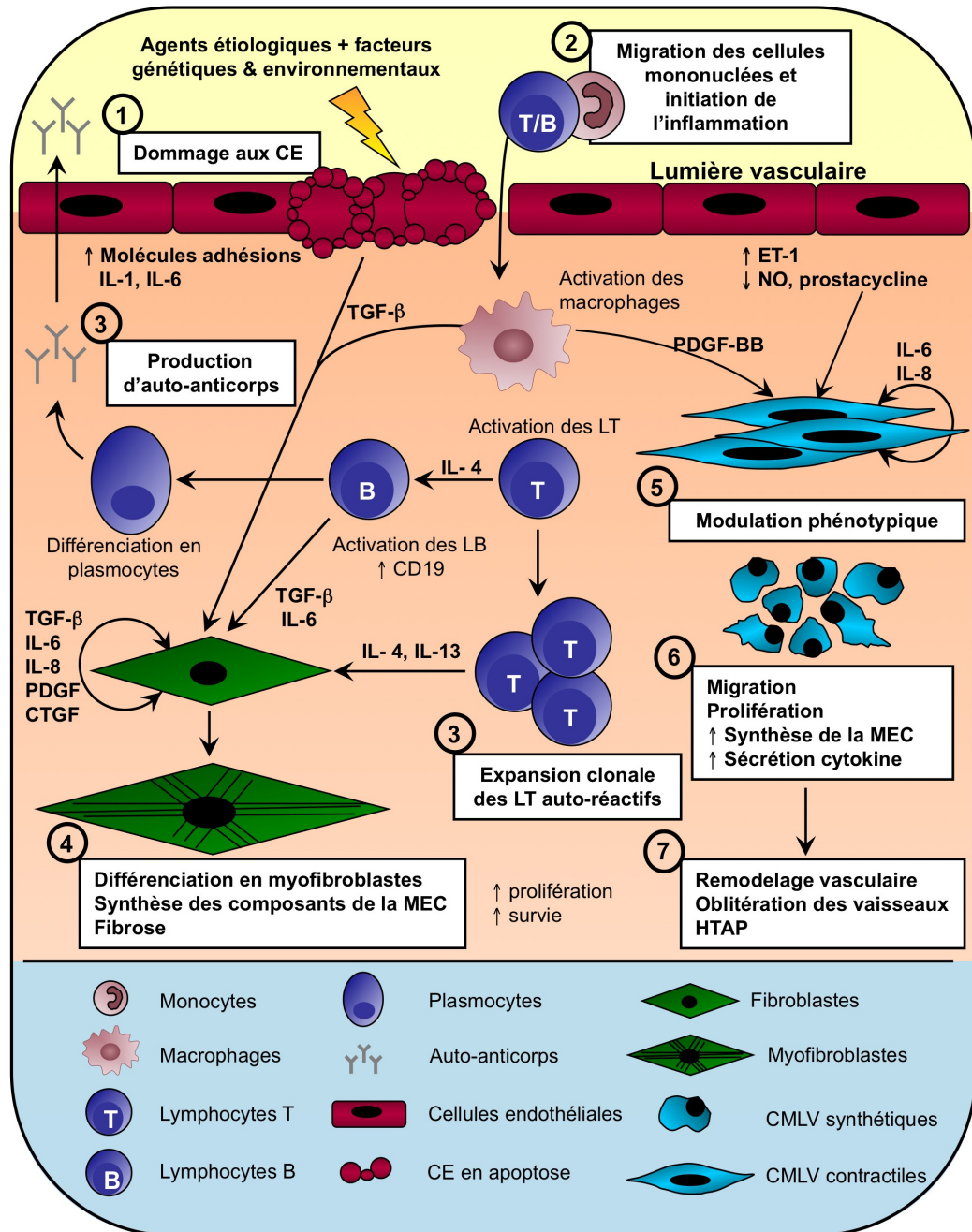


Figure 3. Modèle de la pathogénèse de la ScS. Interactions entre les CE, les cellules mononuclées, les fibroblastes et les CMLV, aboutissant à la fibrose et à l'HTAP.

4. Auto-anticorps associés à la ScS

Le diagnostic de la ScS, lorsqu'il est évoqué cliniquement, passe nécessairement par la recherche d'ANA qui se fait traditionnellement par immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules HEp-2 (*Human Epithelioma Larynx no.2*). Ces anticorps sont habituellement présents dès le début de la maladie et, bien que leur taux puisse fluctuer au cours de l'affection, ils persistent généralement inchangés tout au long de la maladie. Il n'y a pas de changement d'une spécificité à l'autre si bien que les anticorps anti-nucléaires constituent une signature biologique fidèle de la maladie. Le mécanisme d'apparition de ces ANA, leur rôle potentiel dans la pathogénèse de la ScS et leur relation avec les différentes manifestations cliniques ne sont pas complètement élucidés. En revanche, il existe une forte corrélation entre la présence d'un type d'auto-anticorps et une particularité clinique de la ScS, dont certaines ont trait au pronostic vital (121). En effet, certains de ces anticorps sont très spécifiques à la ScS et constituent des outils diagnostiques et pronostiques importants. Il s'agit des anticorps anti-centromères, anti-ADN-topoisomérase I (anti-Scl-70), anti-ARN polymérase III et les anti-Th/To (149). Ensemble, ces quatre ANA comptent pour 75 à 80 % des auto-anticorps détectés dans la maladie (149). Ces auto-anticorps sont généralement mutuellement exclusifs et chacun est associé à un groupe de patients ayant des caractéristiques cliniques particulières. Le Tableau I résume les principaux ANA et leurs associations cliniques, soit à une forme limitée, soit à une forme diffuse, ainsi qu'à certaines manifestations viscérales (pour un article de revue voir la ref. (149)).

Tableau I. Principaux ANA détectés dans la ScS (Adapté de Koenig et al (149)).

ANA spécifiques		
<u>Auto-anticorps</u>	<u>Association clinique</u>	<u>Fréquence moyenne (%)</u>
Anti-centromère (Anti-CENP-B)	ScS limitée (HTAP, pertes digitales) Syndrome de CREST	30
Anti-Th/To	ScS limitée (crises rénales, fibrose pulmonaire)	5
Anti-ADN-topoisomérase I (anti-Scl-70)	ScS diffuse (fibrose pulmonaire)	30
Anti-ARN polymérase III	ScS diffuse (crises rénales)	15
ANA non-spécifiques		
<u>Auto-anticorps</u>	<u>Association clinique</u>	<u>Fréquence moyenne (%)</u>
Anti-PM/Scl	ScS limitée et myosite Chevauchement PM/ScS	< 5
Anti-U3-RNP (anti-fibrillarine)	ScS diffuse (HTAP, atteintes digestives)	5
Anti-U1RNP	ScS limitée et diffuse Chevauchement avec d'autres connectivites	5
Anti-hUBF (NOR-90)	ScS diffuse (fibrose pulmonaire)	< 5
Anti-B23	ScS limitée et diffuse (HTAP)	< 5

4.1. Anticorps spécifiques

La figure 4 représente l'aspect caractéristique en IFI sur cellules HEP-2 des principaux ANA associés à la ScS. Globalement, ces ANA sont présents dans les populations au niveau mondial avec une fréquence moyenne respective pour les AAC, les AAT, les ARNP III et les anti-Th/To de 26.1 %, 28.6 %, 10.3 % et 3 %, (149). Cependant, il est clair qu'il existe des variables géoethniques et immunogénétiques importantes qui affectent la fréquence respective de chacun de ces auto-anticorps. Par conséquent, bien que

la présence de ces ANA dans la maladie soit universelle, il s'avère difficile voir même impossible d'en prédire la fréquence exacte d'une population à l'autre.

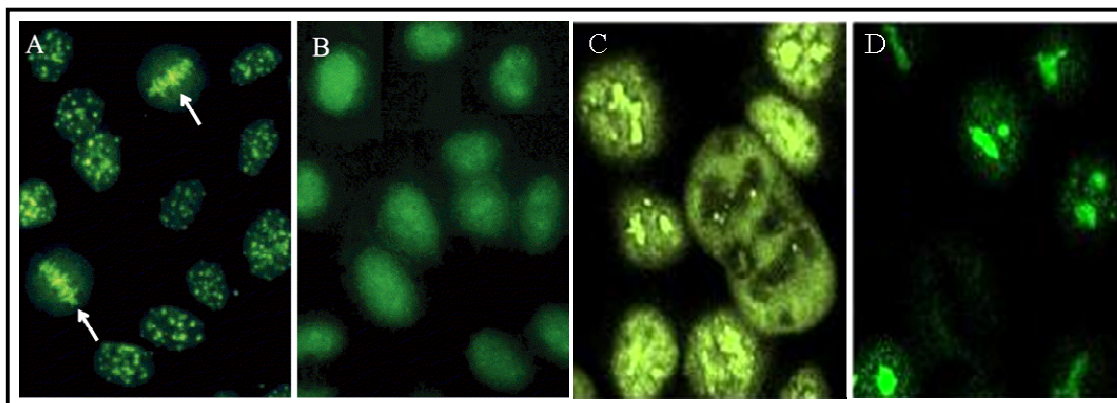


Figure 4. Aspects caractéristiques en IFI sur cellules HEp-2 des principaux ANA spécifiques observés dans la ScS. **A**, Anticorps anti-centromère montrant une fluorescence en petite tache correspondant aux centromères des chromosomes et se disposant en plaque équatoriale sur les cellules en mitose (flèches). **B**, Anticorps anti-ADN topoisomérase I montrant une fluorescence plutôt homogène du noyau. **C**, Anticorps anti-ARN polymérase III et **D**, anti-Th/To caractérisés par une fluorescence nucléolaire. (Figure adaptée de Koenig et al (149) et Hachulla et al (150)).

4.1.1. Anticorps anti-centromères

Les anticorps anti-centromère sont dirigés contre des protéines qui forment le kinétochore, structure qui lie le centromère du chromosome au fuseau mitotique pendant la division cellulaire. La présence de ce type d'anticorps dans le serum de patients sclérodermiques est facilement identifiable par des techniques d'IFI sur cellules HEp-2 et le patron de fluorescence se caractérise par un aspect moucheté et ponctiforme (Fig. 4A) (151). Les AAC décelés par IFI constituent un marqueur diagnostique et pronostic très utile devant une ScS limitée, puisqu'ils sont présents en moyenne chez 50-80 % des patients (48,

152, 153). Ils sont en plus retrouvés majoritairement (dans plus de 50%) dans un sous-groupe de patients qui développent le syndrome de CREST (152) et ne sont que très rarement retrouvés dans les formes diffuses (moins de 5 %) (154-157). Bien qu'en général le dépistage de ce type d'ANA représente un meilleur pronostic, les AAC sont associés à un risque accru de développer de l'HTAP isolée, i.e. qui n'est pas secondaire à la fibrose pulmonaire (3, 4, 158).

Earnshaw et al (159) ont démontré que les sera de patients positifs pour les AAC reconnaissent majoritairement 3 protéines centromériques (CENP) différentes : CENP-A, CENP-B et CENP-C, d'un poids moléculaire respectif de 17, 65 et 140 kDa. Il a été démontré par la suite que la CENP-B était le principal antigène centromérique, puisque des anticorps dirigés spécifiquement contre cette protéine étaient présents, à titre élevé dans tous les sera de patients anti-centromère positifs (160). Bien que la CENP-B semble être impliquée dans la formation du centromère, son rôle précis n'est pas encore clairement établi et la littérature semble plutôt divisée (161-163). La plupart des anticorps dirigés contre la CENP-B sont d'isotype IgG et reconnaissent une séquence d'acides aminés située à l'extrémité C-terminale de la protéine (164).

4.1.2. Anticorps anti-ADN-topoisomérase 1

L'ADN-topoisomérase 1 est une protéine responsable de la relaxation de la structure hélicoïdale de l'ADN pendant sa transcription et sa duplication. L'épitope majeur de l'ADN-topoisomérase I reconnu par les AAT correspond à la séquence d'acides aminés

547-565 qui se retrouve dans le domaine central de la protéine (165, 166). La détection des AAT dans le sérum des patients se fait généralement par IFI sur lignée HEp2 (Fig. 4B), par immunodiffusion ou encore par ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays*). Les AAT sont spécifiques de la ScS. Ils sont retrouvés chez 15 à 20 % des patients atteints de la maladie (48, 68, 121). Ce type d'ANA est retrouvé chez environ 40 % des patients qui développent la forme diffuse de la maladie (167, 168). Ces anticorps sont associés aux atteintes pulmonaires sévères fibrosantes (121, 169, 170) ainsi qu'à un moins bon pronostic en terme de survie, souvent attribuable à un dysfonctionnement ventriculaire secondaire à l'atteinte pulmonaire (171, 172).

Globalement, les AAC et les AAT représentent donc un intérêt majeur pour les cliniciens, puisqu'il existe une très forte corrélation entre la présence d'un de ces types d'ANA et le développement clinique d'une des formes de la ScS. Ces deux types d'anticorps sont d'ailleurs quasi mutuellement exclusifs puisqu'ils n'ont été retrouvés associés que dans 0.52% des cas (173). La spécificité de ces deux anticorps est également excellente puisque des AAC et des AAT se retrouvent rarement chez les personnes saines (< 1 %) et ne sont observés que chez respectivement 5 % et 2 % des patients atteints d'autres connectivites (121).

4.1.3. Anticorps anti-ARN polymérase et anti-Th/To

Les anticorps anti-ARNP et les anti-Th/To sont à l'origine d'une fluorescence nucléolaire sur cellules HEp-2 (Fig. 4C et D). Les anticorps anti-ARNP I et III sont très

spécifiques de la ScS et sont détectés en moyenne dans environ 20 % des cas (121, 174). Ces anticorps sont associés aux formes diffuses de la maladie dans 45 % des cas (175) et leur détection est associée à une atteinte cutanée sévère et extensive, à une atteinte rénale et cardiaque ainsi qu'à un mauvais pronostic et un taux de mortalité plus élevé (121, 171, 175-177). Les anticorps anti-Th/To sont retrouvés en moyenne chez 3 % des malades atteints de ScS et leur détection est associée généralement à une atteinte digestive, et à des lésions cutanées plutôt limitées (121, 149, 178, 179).

4.2. Auto-anticorps non-spécifiques

D'autres ANA, qui ne sont pas spécifiques de la ScS, ont également été mis en évidence. Parmi ceux-ci, certains sont dirigés contre des composants nucléolaires comme les anti-PM-Scl, les anti-fibrillarine (U3-RNP), les anti-U1-RNP, les anti-B23 et les anti-hUBF (NOR-90) (53, 149). Ces anticorps sont habituellement observés dans des syndromes de chevauchement comportant une ScS limitée. Certains auto-anticorps constituent un groupe hétérogène et leurs cibles antigéniques représentent aussi bien des composants extracellulaires et membranaires que cytoplasmiques. Parmi ces anticorps, on retrouve notamment les anticorps anti-cellules endothéliales (AACE).

Les AACE sont des auto-anticorps dirigés contre des antigènes mal définis situés à la surface des CE (180). Ces anticorps ne sont pas spécifiques de la ScS et sont également retrouvés au cours du LED, de la dermatomyosite et de la PR (180). Les AACE sont détectés en moyenne chez 44 à 84 % des patients sclérodermiques et sont associés aux

formes les plus sévères de la maladie ainsi qu'à l'HTAP (180-182). Les AACE semblent jouer un rôle important dans la pathophysiologie de la ScS. En effet, il a été démontré *in vitro* que ces anticorps pouvaient activer les CE et induire l'expression de certaines molécules d'adhésion, permettant ainsi aux cellules inflammatoires périvasculaires de se fixer plus facilement à l'endothélium (183). Certaines études ont également démontré que les AACE pouvaient provoquer l'apoptose des CE (184) et l'évidence la plus nette en faveur de cette théorie vient d'une étude effectuée sur des biopsies cutanées prélevées au cours des stades les plus précoces de la maladie. Cette étude démontre une co-localisation des AACE avec des CE en apoptose, suggérant ainsi que ce type d'anticorps joue un rôle dans l'initiation des dommages aux CE, un événement très précoce dans la ScS (89). Plus récemment, une autre étude menée sur les modèles aviaires de la maladie a démontré que le transfert de sera positifs pour les AACE chez des sujets sains entraînait une augmentation significative de l'apoptose des CE par rapport aux sera contrôles (185). Chez l'humain, il a aussi été démontré que les AACE, isolés de patients sclérodermiques, pouvaient provoquer l'externalisation de la phosphatidylsérine (marqueur précoce de l'apoptose) dans des cultures de CE de derme provenant de donneurs sains (184). Bien que la présence de ce type d'anticorps ait été répertoriée dans plusieurs types de MAIS, les réactions mises en jeu ainsi que les mécanismes qui déclenchent la mort par apoptose des CE ne sont pas parfaitement élucidés. Il a par contre été démontré que ces anticorps pouvaient exercer leur activité pathologique et entraîner une réponse cellulaire cytotoxique dépendante des anticorps en activant le complément (96, 97).

4.3. Rôles des auto-anticorps

Les ANA sont retrouvés dans plus de 90 % des cas de ScS. Les mécanismes responsables de leur apparition ainsi que leur rôle dans la pathophysiologie de la maladie sont loin d'être élucidés. Ces anticorps se sont par contre avérés fort utiles dans l'élaboration des critères de classification de la ScS. En effet, grâce à la description de plusieurs de ces anticorps très spécifiques, LeRoy et Medsger ont proposé de nouveaux critères de classification basés sur le profil immunologique des patients (186). Aujourd'hui, les ANA sont largement utilisés comme outils diagnostiques et pour le pronostic, et leur grande valeur découle surtout du fait que certains d'entre eux sont associés de manière spécifique à différents profils cliniques de la maladie. Malheureusement, seulement deux types d'ANA sont facilement caractérisés par l'ensemble des laboratoires soit, les AAC et les AAT. Le développement de nouveaux tests immunologiques et leur passage à la routine devraient permettre éventuellement d'améliorer le dépistage de la ScS.

Un auto-anticorps est pathogène sans équivoque s'il est capable de participer au développement d'une maladie ainsi qu'aux manifestations cliniques qui y sont associées. La première démonstration de la pathogénicité d'un anticorps date du début des années 1950, lorsque W.J. Harrington s'injecta le sérum d'un malade atteint de purpuras, induisant ainsi une thrombocytopenie importante (187). Depuis, d'autres auto-anticorps pathologiques ont été mis en évidence dont ceux dirigés spécifiquement contre les globules rouges dans les anémies hémolytiques auto-immunes (188) ou encore les anti-Rho et les anti-ADN double

brin dans le LED (189, 190). Toutefois, pour beaucoup d'autres auto-anticorps présents d'une manière constante dans plusieurs MAI, aucun rôle pathogène n'a encore pu leur être attribué. Des études récentes viennent cependant remettre en question le rôle uniquement passif de certains des auto-anticorps, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives quant à leur implication dans le développement des MAI.

Des études ont par exemple démontré que certains des auto-anticorps non-spécifiques de la ScS, tels que les AACE, pouvaient participer activement à certains des mécanismes pathologiques impliqués dans le développement de la maladie (voir section 4.2). Récemment, il a également été suggéré que les anti-fibrilline I, retrouvés majoritairement dans la forme diffuse de la maladie (191), jouent un rôle dans l'activation des fibroblastes en induisant la production des composants de la MEC, dont le collagène (192). De plus, des résultats forts intéressants ont récemment été obtenus sur le rôle pathogène potentiel de certains des ANA retrouvés spécifiquement dans la maladie. En effet, il a été démontré que les AAT pouvaient lier de manière spécifique les fibroblastes pour permettre ensuite l'adhésion et l'activation des cellules immunitaires avoisinantes (193, 194). Les résultats de cette étude suggèrent, pour la première fois, que les AAT jouent un rôle important dans la ScS en causant, par le recrutement de cellules monocytaires, un phénomène d'amplification de la réponse inflammatoire et de la fibrose tissulaire (193). Ces résultats ouvrent donc la porte à de nouvelles perspectives et il faut maintenant espérer que l'analyse moléculaire du rôle pathogène des ANA permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer le sombre pronostic de la ScS.

4.4. Origine

Les mécanismes impliqués dans la production des auto-anticorps au cours des MAI sont encore très mal compris et les hypothèses concernant leur origine sont souvent l'objet de controverses. Les théories les plus largement citées sont basées sur le mimétisme moléculaire, le dysfonctionnement du système immunitaire et, plus récemment, sur le rôle potentiel des auto-antigènes eux-mêmes. Le tableau II présente certaines des hypothèses qui ont été formulées afin d'expliquer l'existence des auto-anticorps dans la ScS.

Tableau II. Mécanismes impliqués dans le développement des auto-anticorps dans la ScS

<p>Dérèglement du système immunitaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - Activation polyclonale des LB (surexpression de la molécule CD19) <p>Mimétisme moléculaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - Homologies de séquence entre des antigènes du soi et des protéines virales <p>Altération moléculaire des auto-antigènes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Altération des auto-antigènes au cours de l'apoptose et/ou nécrose cellulaire - Fragmentation des auto-antigènes dans des conditions ischémiques <p>Relocalisation des auto-antigènes lors de l'apoptose cellulaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - Corps apoptotiques - Libération dans le milieu extracellulaire

Parmi les mécanismes proposés, on retrouve le mimétisme moléculaire, selon lequel la production d'auto-anticorps est consécutive à une infection virale où l'agent infectieux possède un ou des épitopes similaires à ceux d'un auto-antigène (20, 195). L'argument qu'une auto-immunité puisse être initiée par une infection est renforcé dans la ScS par le fait que certains des auto-anticorps spécifiques de la maladie, dont les AAT, ont une

réaction croisée avec les protéines UL-94 et UL-97 du cytomegalovirus (196, 197) ainsi qu'avec la protéine p30gag retrouvée chez certain rétrovirus (198). Des homologies de séquence ont aussi été rapportées entre les portions N-terminale et C-terminale de la fibrillarine et des séquences retrouvées respectivement dans le protéine P40 du virus de l'herpes de type I ainsi que dans la protéine nucléaire du EBV (199). Différentes aberrations immunologiques, telles que l'activation polyclonale des LT et des LB, pourraient également provoquer un bris de tolérance envers certains auto-antigènes, résultant en une production d'auto-anticorps.

5. Auto-antigènes

Bien que le dérèglement du système immunitaire et le mimétisme moléculaire soient deux théories largement citées et souvent incriminées, elles ne peuvent expliquer complètement le répertoire limité et spécifique des auto-anticorps retrouvés au cours des MAI. Plusieurs chercheurs se sont donc penché sur des modèles alternatifs basés sur le modèle du danger (*Danger model*), développé par Polly Matzinger (200). Cette théorie propose un modèle de la réponse immune où celle-ci est basée non pas sur le caractère étranger au soi de l'antigène, mais sur son caractère dangereux pour l'organisme. En fait, ce concept de danger soutient que n'importe quelle molécule, étrangère ou non, peut transmettre des signaux d'alarme et mener à une réaction immunitaire spécifique, dans la mesure où elle est capable d'activer les CPA spécialisées, qui vont à leur tour activer les LT et LB, entraînant une production d'auto-anticorps (200). Il s'avèrerait donc nécessaire de se

concentrer davantage sur l'origine même des signaux d'alarme afin de mieux comprendre les mécanismes qui sont impliqués dans le développement et la production d'anticorps.

Les auto-antigènes représentent un groupe de protéines du soi très restreint capables d'induire une réponse immunitaire adaptative. Sur un nombre approximatif de protéines humaines variant entre 20 000 et 60 000, seulement 1 à 2 % sont des cibles de l'auto-immunité (201). Les raisons pour lesquelles certains antigènes sont plus susceptibles que d'autres à causer un bris de tolérance et à provoquer la production d'auto-anticorps restent encore mal définies. Cependant, plusieurs concepts ont été mis de l'avant (tableau III) et certains d'entre eux seront présentés plus en détail dans les sections suivantes.

Tableau III. Principaux facteurs qui pourraient influencer la sélection des auto-antigènes
(Adapté de Plotz, PH (201)).

Propriétés structurelles et biochimiques:

- Séquences en acides aminés très chargées
- Éléments répétitifs
- Structure en hélices- α enroulées les unes sur les autres «coiled-coil»
- Séquence de liaison d'acide nucléique (ADN ou ARN)

Catabolisme, altération moléculaire et relocalisation au cours de l'apoptose:

- Clivage par les caspases, granzyme B et cathepsines
- Clivage par les nucléases
- Phosphorylation/déphosphorylation
- Transglutamination, ubiquitination, citrullination
- Relocalisation dans les corps apoptotiques
- Libération dans le milieu extracellulaire (nécrose ou apoptose)

Propriétés immunologiques et pro-inflammatoires:

- Chémoattractant
- Liaison directe avec les récepteurs des CPA (cellules dendritiques)

Concentration et micro-environnement:

- Concentration locale élevée due à une augmentation de l'expression
- Concentration locale élevée due à la persistance
- Localisation tissu-spécifique

5.1. Propriétés structurales et biochimiques

Le premier concept stipule que certaines propriétés structurales et biochimiques des cibles antigéniques pourraient initier et/ou participer à la sélection du répertoire des auto-anticorps retrouvés dans les MAI, en activant de manière efficace les CPA. Ainsi, des études ont permis de mettre en évidence certaines caractéristiques structurales retrouvées de manière plus fréquente chez plusieurs auto-antigènes (202). A titre d'exemple, il a été démontré que les auto-antigènes possédaient dans la grande majorité des cas, des séquences d'acides aminés hautement chargés, des éléments répétitifs, des séquences de liaison aux acides nucléiques ainsi qu'une fréquence plus élevée de structures «coiled-coil» (202). De façon concordante, les protéines nucléaires CENP-B et l'ADN-topoisomérase I, qui sont majoritairement ciblées dans la ScS, possèdent toutes deux plusieurs de ces caractéristiques, ce qui en ferait des cibles de choix pour le développement d'auto-anticorps (160, 203-205).

5.2. Altération au cours de l'apoptose

Dans la seconde idée proposée, des événements de mort cellulaire pourraient affecter les conditions dans lesquelles les protéines de soi rencontrent le système immunitaire, de manière à augmenter leur immunogénéicité et ainsi favoriser la production d'auto-anticorps (206-208). En effet, plusieurs études ont clairement démontré qu'au cours de l'apoptose, plusieurs auto-antigènes associés à la ScS tels que l'ADN-topoisomérase I et la CENB-B étaient clivés par différentes caspases (209) ainsi que par la granzyme B (210), révélant ainsi des épitopes cryptiques. La reconnaissance de ces nouveaux épitopes par les LB

résulterait en la production d'auto-anticorps dirigés contre les protéines natives. Cette hypothèse est soutenue par de nombreuses études qui révèlent que l'antigénicité de plusieurs protéines intracellulaires est modifiée et/ou s'accroît lorsqu'elles sont clivées (206-208, 211, 212). En plus du clivage apoptotique, les auto-antigènes peuvent subir plusieurs autres modifications post-traductionnelles au cours de l'apoptose, telles que la phosphorylation et la citrullination, qui semblent augmenter leur antigénicité, (213-216). L'apoptose donne également lieu à une relocalisation de plusieurs protéines intracellulaires, altérées ou non, vers la membrane plasmique ainsi que dans des vésicules apoptotiques, où les radicaux libres oxygénés produits peuvent fragmenter davantage certains auto-antigènes et favoriser l'apparition d'épitopes cryptiques (217, 218). Dans certains cas, il y aurait en plus libération de ces auto-antigènes dans le milieu extracellulaire, permettant ainsi de faciliter leur reconnaissance par le système immunitaire (193).

5.3. Propriétés immunologiques et pro-inflammatoires

La structure même des auto-antigènes, leur catabolisme ainsi que leur relocalisation au cours de l'apoptose sont tous des facteurs qui pourraient augmenter leur potentiel antigénique afin de favoriser leur présentation au système immunitaire, en activant de manière efficace les CPA. Récemment, des études ont mis en évidence une autre caractéristique pour le moins surprenante de certains auto-antigènes, soit celle d'induire la migration de plusieurs populations leucocytaires, en interagissant avec des récepteurs de chémokines situés à la surface des cellules (219-221). Globalement, les auto-antigènes pourraient donc constituer des signaux de danger qui pourraient amplifier les réactions

inflammatoires innées et participer au développement et à la mise en place des réponses immunes adaptatives, en favorisant le recrutement de CPA et la production d'auto-anticorps. Ce modèle permettrait ainsi d'offrir une explication plus convaincante quant au répertoire conservé et limité des auto-anticorps retrouvés dans les différentes MAI. Jusqu'à présent, uniquement certaines facettes du problème de l'auto-immunité ont été étudiées, et malheureusement aucun modèle complet et précis ne peut en être tiré. Cependant, il est maintenant clair qu'il faut se concentrer davantage sur la source même du problème soit, au niveau des auto-antigènes *per se*.

6. Mort cellulaire et auto-immunité

Les phénomènes de mort apoptotique et nécrotique sont souvent à l'origine des dommages cellulaires observés dans plusieurs types de MAI (89, 90, 185). Comme il a été mentionné précédemment, il est donc possible que ces événements de mort cellulaire soient directement reliés à l'altération, la relocalisation ou encore à la libération des auto-antigènes dans le milieu extracellulaire. Ces auto-antigènes altérés, normalement séquestrés à l'intérieur de la cellule, deviennent donc accessibles aux cellules du système immunitaire et certains d'entre eux pourraient subséquemment engager la production d'auto-anticorps. Récemment, il a aussi été démontré que certains de ces auto-antigènes, qui possèdent normalement une fonction précise à l'intérieure de la cellule, peuvent acquérir une fonction nouvelle, lorsqu'ils se retrouvent dans le milieu extracellulaire. Les sections suivantes visent donc à faire un bref résumé sur les concepts d'apoptose et de nécrose cellulaire impliqués

dans l'auto-immunité ainsi qu'à approfondir et éclaircir les notions concernant la bifonctionnalité de certains auto-antigènes.

La nécrose est un processus de mort cellulaire pathologique qui se développe généralement en réponse à des blessures graves, des traumatismes ou encore suite à l'apoptose (222). La nécrose se distingue de l'apoptose sur plusieurs points, notamment par la perte rapide de l'intégrité de la membrane cytoplasmique. D'un point de vue morphologique, la cellule et les organites (particulièrement les mitochondries) se gonflent, la chromatine nucléaire se dégrade progressivement et s'accompagne d'une fragmentation aléatoire de l'ADN. Le gonflement de la cellule provoque son éclatement et le déversement de son contenu dans le milieu extracellulaire, incluant des protéases et des signaux pro-inflammatoires qui peuvent causer des dommages aux tissus avoisinants et déclencher une réaction inflammatoire locale (223).

Contrairement à la nécrose, l'apoptose est un phénomène ordonné et programmé génétiquement qui se déroule dans un contexte physiologique normal et de manière autonome dans une ou plusieurs cellules. L'apoptose est finement régulée et certaines molécules spécialisées, telles les caspases, détruisent d'importants composants moléculaires du noyau et du cytoplasme, ce qui conduit à la mort de la cellule. Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose comme la condensation du cytoplasme, du noyau et de la chromatine, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement dynamique de la membrane plasmique ainsi qu'une perte de l'asymétrie membranaire sont alors visibles. Ce

bourgeoisement membranaire provoque ensuite la formation de corps apoptotiques pouvant contenir des constituants provenant des ribosomes, des mitochondries ou encore du noyau. Tout au long de ce processus, l'intégrité membranaire de ses vésicules est conservée, empêchant ainsi le déversement de leur contenu dans le milieu extracellulaire. En conditions normales, les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les cellules avoisinantes et les macrophages engagés dans l'élimination des cellules apoptotiques inhibent de manière active les réponses inflammatoires, en sécrétant par exemple des facteurs immunosuppresseurs tels le TGF- β ou l'IL-10 (224-226).

Par contre, dans certaines conditions, les corps apoptotiques persistent et peuvent subir une perte de l'intégrité membranaire, libérant ainsi leur contenu pro-inflammatoire dans le milieu extracellulaire (227). Ce phénomène, appelé nécrose secondaire ou apoptose tardive, est généralement dû à un dérèglement des processus phagocytaires et pourrait être observé *in vivo* en situation d'apoptose massive et lorsque les capacités phagocytaires immédiatement disponibles des macrophages sont dépassées par le nombre trop élevé de cellules apoptotiques (228). Le contenu antigénique libéré lors de la nécrose secondaire pourrait donc être perçu comme des signaux de danger et leur phagocytose pourrait ainsi provoquer la maturation des CD avoisinantes et favoriser la production d'auto-anticorps et la stimulation des LT auxiliaires (229). Ce processus pourrait ainsi briser la barrière de tolérance du soi et contribuer au développement de l'auto-immunité. La nécrose secondaire est aussi associée *in vitro* à une dégradation protéolytique supplémentaire des auto-antigènes, pouvant ainsi accentuer davantage leur immunogénéité (230).

Les conséquences immunologiques d'une surcharge de la machinerie phagocytaire ainsi qu'un défaut de clairance des cellules apoptotiques prennent de plus en plus d'intérêt dans la recherche sur l'auto-immunité. En effet, plusieurs modèles animaux et certaines MAIS ont jusqu'à présent été associés à un dérèglement de l'une ou l'autre des étapes impliquées dans ces processus (228, 231). Dans ce contexte, un niveau d'apoptose plus élevée a été observé au niveau de certains type cellulaires présents chez les patients lupiques (232) et au niveau des CE chez les patients sclérodermiques (89). De plus, certaines études ont aussi démontré que des macrophages provenant de patients lupiques présentaient une capacité de phagocytose plus faible que les sujets sains (233, 234). Il a aussi été démontré que l'absence totale de la protéine du complément C1q chez certains individus ainsi que dans des modèles murins pouvait provoquer l'apparition de signes cliniques apparentés au LED (235, 236).

7. Auto-antigènes bifonctionnels

Les cellules apoptotiques représentent donc un vaste réservoir d'auto-antigènes qui ont le potentiel d'initier le développement d'auto-anticorps chez des individus susceptibles. Plusieurs études récentes ont démontré que certains auto-antigènes associés aux MAI possèdent des fonctions biologiques additionnelles lorsqu'ils se retrouvent dans le milieu extracellulaire. En effet, une fois libérés par nécrose ou apoptose, ces auto-antigènes adoptent une activité biologique qui s'apparente à celles des cytokines et pourraient ainsi

participer aux processus normaux de réparation de blessure et/ou acquérir une activité pathogénique qui contribuerait au développement de certaines MAI.

L'auto-antigène bifonctionnel le plus largement étudié est la protéine HMGB1 (*high mobility group box 1*). Cette protéine nucléaire joue généralement un rôle important dans la formation des nucléosomes et dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes. Cependant, de façon très inattendue, cette protéine a récemment été identifiée comme étant aussi un facteur extracellulaire soluble, qui peut agir comme une cytokine pro-inflammatoire (237). Une fois dans le milieu extracellulaire, la protéine peut induire l'activation et la maturation des CD et favoriser l'angiogénèse, en activant les CE et en provoquant la migration de plusieurs autres types cellulaires, dont les CMLV (238-240). La protéine HMGB1 peut aussi être la cible d'une réponse auto-immune puisque des anticorps anti-HMGB1 ont été retrouvés chez des patients sclérodermiques (241).

Récemment, O.M Howard et son groupe de recherche ont démontré que ce caractère bifonctionnel pouvait être attribué à d'autres auto-antigènes associés aux MAI. Ils ont effectivement observé que l'histidyl-tARN synthétase (ou Jo-1) et l'asparaginyt-tARN synthétase, deux auto-antigènes contre lesquels environ 25 % des patients atteints de myosite développent des anticorps, pouvaient exercer un rôle de chemokine envers certaines populations leucocytaires. Ces enzymes ont une fonction intracellulaire bien déterminée et participent à l'aminocyclation des ARN de transferts. Cependant, une fois libérés par apoptose, certains fragments peuvent exercer une activité chimiotactique envers les CD

immatures, les monocytes et les LT (220). De manière intéressante, l'aspartyl-tARN et la lysyl-tARN synthétase, deux autres enzymes de la même famille n'ayant aucune propriété auto-antigénique, ne présentent aucune activité chimiotactique. Basé sur ces résultats, une étude menée sur plusieurs protéines du soi présentant des propriétés antigéniques a permis de démontrer que la plupart des auto-antigènes associés aux MAI présentaient une activité chimiotactique envers plusieurs cellules du système immunitaire (242). Les principaux auto-antigènes ciblés lors de cette étude ainsi que les MAI avec lesquelles ils sont associés sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV. Auto-antigènes chimiotactiques pour les cellules dendritiques immatures (Adapté de Oppenheim et al. (242)).	
Auto-antigènes	MAI associée
Fibrillarine (U3-RNP)	ScS
Topoisomérase I	ScS
«Interphotoreceptor retinoid-binding protein» (IRBP)	Uvéite
Arrestine rétinale (S-Ag)	Uvéite
Myelin basic protein	EAE/Sclérose en plaque
«Myelin oligodendrocyte glycoprotein» (MOG)	EAE/Sclérose en plaque
Protéine protéolipidique (PLP)	EAE/Sclérose en plaque
Transaldolase	EAE/Sclérose en plaque
«Islet antigen 2» (IA-2)	Diabète de type I
Transaldolase	Diabète de type I
ADN simple brin + LA	LED

EAE, encéphalo-myélite auto-immune expérimentale

Récemment, des études menées dans notre laboratoire ont aussi permis de mettre en évidence un rôle supplémentaire de l'ADN-topoisomérase I, un auto-antigène nucléaire fortement associé à la forme diffuse de la ScS. Une fois libérée par des CE en apoptose, il a été démontré que l'ADN-topoisomérase I présente dans le milieu extracellulaire pouvait lier

de façon spécifique la surface des fibroblastes avoisinants et favoriser le recrutement des AAT. Il a aussi été démontré que la présence des complexes immuns topo/anti-topo à la surface des fibroblastes pouvait induire l'adhésion et l'activation de cellules monocytaires ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques, perpétuant ainsi le cycle inflammatoire et pro-fibrotique caractéristique de la ScS (193).

8. Récepteurs de chémokines

En plus d'avoir mis en évidence leur fort potentiel chimiotactique, O.M. Howard a découvert à certains de ces auto-antigènes une autre caractéristique commune. Il ont démontré que la majorité d'entre eux interagissaient avec les populations leucocytaires via certains récepteurs de chémokines, majoritairement le CCR3 et le CCR5 et ce, malgré l'absence complète d'homologie de séquence avec leur ligands naturels (221). Les récepteurs de chémokines possèdent tous une structure tertiaire semblable : il s'agit de récepteurs transmembranaires formés de 7 hélices alpha dont l'extrémité carboxy-terminale intracellulaire est couplée à une protéine G, responsable de la transduction des signaux. Ces récepteurs font donc partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et, jusqu'à présent, environ 20 d'entre eux ont été identifiés. Récemment, l'expression de ce type de récepteur était rapportée uniquement chez les différentes populations leucocytaires. Cependant, il existe de plus en plus d'évidences expérimentales qui démontrent que certain types cellulaires non-hématopoïétiques, dont les CMLV, expriment à leur surface certains de ces récepteurs (243, 244).

L'activation des récepteurs de chémokines par différents agonistes régule de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, l'apoptose, l'angiogénèse, mais surtout la migration cellulaire. Tous ces mécanismes découlent d'une série de signaux intracellulaires qui résultent majoritairement de l'activation de la protéine G intracellulaire. A l'état inactif, la protéine G comprend trois sous-unités : α , β et γ et la sous-unité $G\alpha$ présente une forte affinité pour le GDP (guanosine diphosphate). Suite à la liaison du ligand, la structure tertiaire du récepteur est modifiée. Cet événement entraîne une diminution de l'affinité de la sous unité $G\alpha$ pour le GDP et une molécule de GTP (guanosine triphosphate) est alors échangée, provoquant ainsi la dissociation de l'hétérotrimère en une sous unité α ($G\alpha$) et un dimère $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$). Les sous-unités dissociées activent alors différents effecteurs spécifiques tels que les GTPases, l'adénylate cyclase, la phospholipase C et la voie des MAP kinases (245).

En plus de ces différents effecteurs intracellulaires, les protéines G régulent aussi l'activité de récepteurs membranaires distincts des RCPG, comme par exemple les récepteurs à activité tyrosine kinase. Dans cet ordre d'idée, des études ont récemment démontré qu'une fois activé par leur ligand, plusieurs récepteurs de chémokines pouvaient induire l'activation du récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) (246-248). Ce phénomène, appelé transactivation, a initialement été rapporté par H. Daub et son équipe sur des fibroblastes de rat (248), mais il est maintenant bien établi que la transactivation du récepteur de l'EGF par les RCPG est un phénomène observé dans de nombreux types cellulaires par le biais de différents agonistes, incluant la thrombine, l'endothéline-1, le

carbachol, l'acide lysophosphatidique, l'angiotensine II et l'eotaxin-1 (246, 248-251). Les mécanismes impliqués dans la transactivation du récepteur de l'EGF via les RCPG font l'objet de nombreuses études et, récemment, plusieurs concepts intéressants ont été proposés.

Le premier mécanisme proposé est un processus dit de transactivation extracellulaire qui fait intervenir certaines protéines intermédiaires telles que les métalloprotéases (MMPs) et les ligands physiologiques du récepteur de l'EGF incluant l'HB-EGF (*heparin-binding epidermal like growth factor*) (252). Ainsi, suite à l'activation des RCPG, la sous-unité G_{α} provoquerait l'activation de certaines métalloprotéases, capable de cliver plusieurs composants membranaires et de libérer leurs ectodomaines. Ce processus appelé « *ectodomain shedding* » provoquerait ainsi le relargage dans le milieu extracellulaire de divers facteurs de croissances de type EGF qui activeraient, à leur tour, le récepteur de l'EGF. Tout ce processus complexe serait donc un relais indispensable entre l'activation des RCPG par ses agonistes et l'induction des signaux aboutissant à la transactivation du EGF récepteur et à l'activation de la voie des MAP kinases (253, 254). A côté de ce processus de transactivation extracellulaire, un processus intracellulaire a également été décrit selon lequel différentes protéines de transduction du signal, dont les tyrosines kinases de la famille Src, pourraient intervenir en phosphorylant directement le récepteur de l'EGF (Fig. 5).

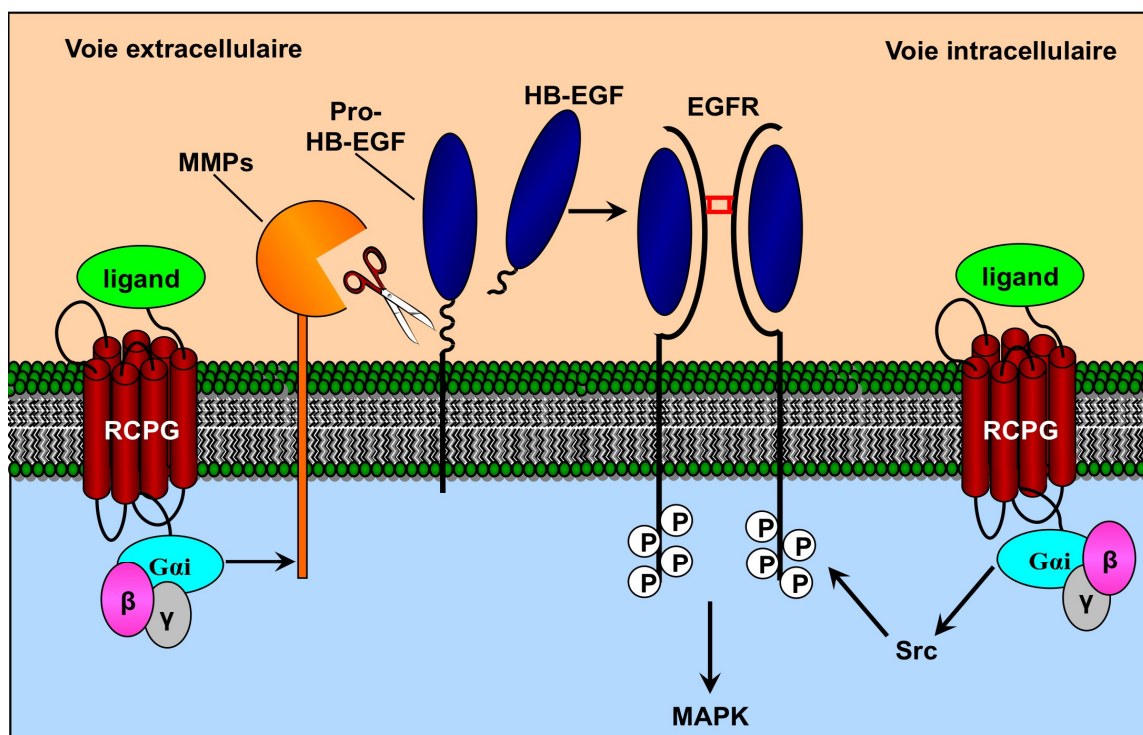


Figure 5. Mécanismes de transactivation du récepteur de l'EGF via les RCPG, par la voie extracellulaire impliquant l'activation des MMPs et la libération d'HB-EGF ou par la voie intracellulaire faisant intervenir différents médiateurs tels que Src.

L'activation d'un récepteur de chémokine par un agoniste induit non seulement le déclenchement des voies de signalisation, mais aussi une régulation de l'activité du récepteur. Ainsi, les réponses cellulaires engendrées par ces récepteurs subissent, en général, une rapide atténuation. Cet arrêt du signal est la conséquence de plusieurs mécanismes : une diminution de la concentration extracellulaire en agoniste, une désensibilisation des récepteurs activés par phosphorylation, leur internalisation par un mécanisme d'endocytose, ou encore une régulation négative (ou "*down regulation*") du nombre total de récepteurs. La cellule passe ainsi par une période réfractaire pendant laquelle elle ne peut plus répondre à une chémokine, permettant ainsi d'exercer un contrôle

sur la durée d'activation de manière à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur (245, 255).

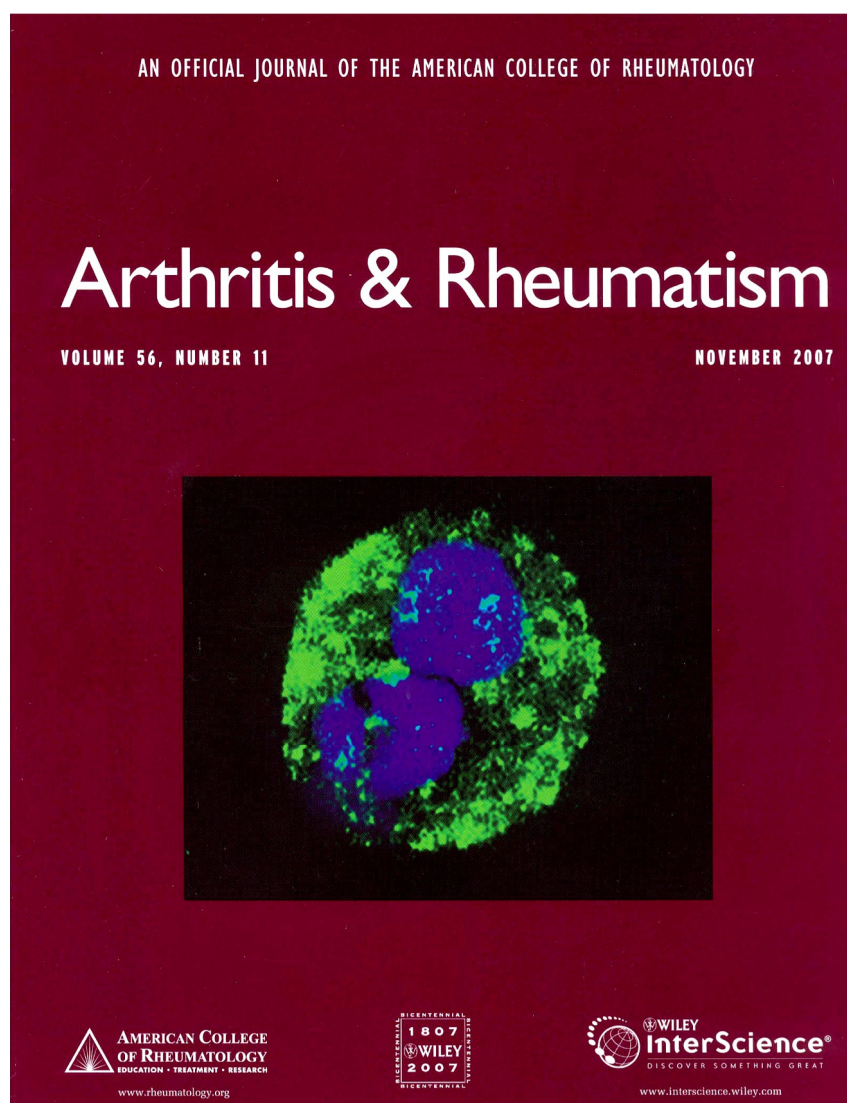
Dans des conditions physiologiques, l'arrêt du signal engendré par la stimulation des récepteurs de chémokines dépend donc de la disponibilité du ligand mais aussi de l'état du récepteur lui-même ainsi que de sa disponibilité à la surface cellulaire (256, 257). Après liaison avec l'agoniste, l'inactivation du récepteur survient suite à sa phosphorylation par différentes classes de protéines kinases (258). L'inactivation des récepteurs de chémokines se poursuit alors par leur disparition de la surface cellulaire par endocytose (255, 257). En privant le ligand de son récepteur, l'internalisation participe donc à la désensibilisation temporelle des récepteurs de chémokines. Pour la majorité d'entre eux, cette internalisation est réversible et les récepteurs séquestrés sont recyclés vers la membrane. Cette resensibilisation permet donc d'éviter une désensibilisation prolongée des récepteurs, qui aboutirait à l'incapacité pour la cellule de répondre de manière appropriée à des signaux extracellulaires. En revanche, pour d'autres récepteurs, l'internalisation est irréversible et les récepteurs sont rapidement dirigés vers les compartiments lysosomiaux où ils sont dégradés par des protéases. Le recouvrement des récepteurs à la surface cellulaire nécessite alors une nouvelle synthèse protéique ou la mobilisation de stocks intracellulaires de récepteurs intacts. La désensibilisation des RCPG peut également s'effectuer au niveau des protéines G elles-mêmes. En effet, les protéines RGS (*Regulator of G protein signaling*) peuvent accélérer l'hydrolyse du GTP de la sous-unité $G\alpha$ et provoquer ainsi l'atténuation du signal (259).

La régulation négative ou «*down regulation*» représente un autre mécanisme responsable de l'arrêt de signal des RCPG qui se caractérise par une perte du nombre total de récepteurs de la surface cellulaire. Cette diminution est le résultat d'une exposition prolongée ou répétée de la cellule à la stimulation par un agoniste ou encore la conséquence d'un traitement à long terme par certaines drogues (257). Dans les conditions physiologiques, par opposition au processus de désensibilisation du récepteur par phosphorylation/découplage et internalisation, la régulation négative représente un mécanisme adaptatif rare. Ce n'est que dans certaines circonstances pathologiques ou encore dans des conditions expérimentales *in vitro* que la régulation négative s'observe (260, 261). Le recouvrement qui s'ensuit est beaucoup plus lent (plusieurs heures voire même des jours sont parfois nécessaires) et requiert une nouvelle synthèse protéique du récepteur dégradé.

Résultats

Article no.1 : L'auto-antigène nucléaire centromérique B (CENP-B) se lie aux cellules musculaires lisses vasculaires et provoque la migration cellulaire et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Article publié dans *Arthritis & Rheumatism* :56, 3814-26, 2007



Présentation de l'article no.1.

Récemment, certaines études ont démontré le caractère bifonctionnel de plusieurs auto-antigènes associés aux MAI. En effet, une fois libérés dans le milieu extracellulaire, certains auto-antigènes peuvent adopter une activité biologique qui s'apparente à celles des cytokines et participer aux processus normaux de réparation de blessure ou encore acquérir une activité pathogène qui pourrait contribuer au développement de certaines maladies auto-immunes (219, 220, 238, 240, 242). La CENP-B est l'un des principaux auto-antigènes ciblés lors de la ScS et les anticorps anti-CENP-B sont fortement associés à la forme limitée de la maladie ainsi qu'au développement de certaines manifestations vasculaires telles que l'HTAP. Cette pathologie résulte en partie de l'occlusion progressive des vaisseaux suite à une hyperactivation des CMLV. L'étude présentée dans cet article avait donc pour but d'examiner les effets biologiques de la protéine CENP-B sur l'activation des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire humaine (HPASMC) afin d'évaluer son implication potentielle dans le remodelage vasculaire observé au cours de l'HTAP.

Les résultats les plus importants de cette étude démontrent que la protéine CENP-B se lie spécifiquement à la surface des HPASMC avec une plus grande affinité pour le phénotype contractile que synthétique. Nous avons aussi démontré que cette liaison provoquait la migration des cellules ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en activant plusieurs molécules intracellulaires telles que FAK, Src ainsi que la voie des MAP kinases, avec ERK1/2 et p38. Finalement, cette étude a aussi permis de mettre en

évidence une source possible *in vivo* de la CENP-B, puisque nous avons démontré qu'il y avait relocalisation de la protéine dans les corps apoptotiques au cours de l'apoptose ainsi que libération de la protéine dans le milieu extracellulaire.

Les résultats présentés dans cet article suggèrent donc pour la première fois que la CENP-B, un auto-antigène nucléaire associé à la forme limitée de la ScS humaine, possède toutes les caractéristiques d'une molécule bifonctionnelle et pourrait participer aux mécanismes normaux et/ou pathogènes impliquant les CML.

Contribution des auteurs à l'article no.1.

- G.R.:** Élaboration du protocole expérimental ; collecte et analyse scientifique et statistique des résultats expérimentaux ; rédaction de l'article
- J.H.:** Analyse et interprétation des données expérimentales complémentaires à l'étude.
- M.S.C.:** Analyse et interprétation des données expérimentales complémentaires à l'étude.
- Y.R.:** Élaboration du protocole expérimental ; analyse scientifique des résultats expérimentaux ; rédaction de l'article
- J.L.S.:** Élaboration du protocole expérimental ; analyse scientifique des résultats expérimentaux ; rédaction de l'article

**Article no. 1: THE NUCLEAR AUTOANTIGEN CENTROMERE
PROTEIN B (CENP-B) DISPLAYS CYTOKINE-
LIKE ACTIVITIES TOWARDS VASCULAR
SMOOTH MUSCLE CELLS**

Authors : Geneviève Robitaille, Jill Hénault, Marie-Soleil Christin, Jean-Luc Senécal and Yves Raymond

Geneviève Robitaille, MSc, PhD candidate, Jill Hénault, MSc, PhD candidate, Marie-Soleil Christin, MSc, PhD candidate, Jean-Luc Senécal, MD, FRCPC, FACP, Professor of Medicine, Yves Raymond, PhD, Professor of Medicine

Laboratory for Research in Autoimmunity, Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; and Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Supported by grants MOP-68966 and MOP-81252 (JLS, YR) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), by a grant from Sclérodermie Québec (JLS, YR), and by studentships from Sclérodermie Québec (GR, JH), CIHR (MSC) and Fonds de la recherche en santé du Québec (JH, MSC)

Running head: CENP-B binds to vascular smooth muscle cells

Address correspondence and reprint requests to:

Yves Raymond, PhD
Laboratory for Research in Autoimmunity
Notre-Dame Hospital, CHUM
1560 Sherbrooke East
Montreal QC H2L 4M1
Canada
Phone: 514-890-8000 ext. 25481
Fax : 514-412-7661

ABSTRACT

Objective. A growing number of intracellular autoantigenic polypeptides have been found to play a second biological role when they are present in the extracellular medium. We undertook this study to determine whether the CENP-B nuclear autoantigen could be added to this set of bifunctional molecules. **Methods.** Purified CENP-B or CENP-B released from apoptotic cells were tested for surface binding to a number of human cell types by cell-based ELISA, flow cytometry and indirect immunofluorescence. The biological effects of CENP-B on the migration, interleukin secretion and signaling pathways of its specific target cells were evaluated. **Results.** CENP-B was found to bind specifically to the surface of human pulmonary artery smooth muscle cells (SMC) and not to fibroblasts nor to endothelial cells (ECs). Furthermore, CENP-B bound preferentially to SMC of the contractile type rather than to the synthetic type. Binding of CENP-B to SMC stimulated their migration during *in vitro* wound healing assays, as well as their secretion of interleukins 6 and 8. The mechanism by which CENP-B mediated these effects involved the focal adhesion kinase, Src, ERK1/2, and p38 MAPK pathways. Finally, CENP-B released from apoptotic endothelial cells was found to bind to SMC, thus indicating a plausible *in vivo* source of extracellular CENP-B. **Conclusion.** These novel biological roles of the nuclear autoantigen CENP-B open up a new perspective for studying the pathogenic role of anti-CENP-B autoantibodies.

Human centromere protein B (CENP-B) is a dimeric protein composed of a DNA-binding domain at the N-terminus and a dimerization domain at the C-terminus (1). Very little is known about the functions of CENP-B and earlier attempts at defining its role in mammals have yielded conflicting results (2, 3). CENP-B is one of the targets of the highly selective autoimmune response of patients with systemic sclerosis (SSc). Indeed, anti-CENP-B autoantibodies are found in a high proportion of patients with the limited form of SSc (4-6). Patients with anti-CENP-B have a high frequency of pulmonary arterial hypertension (PAH) (7-10), which in turn appears to be caused by intimal migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (SMCs) (11-13).

Recent *in vitro* studies have suggested that some autoantigens, when they are released in the extracellular environment, have pathogenic activities that contribute to the development of autoimmune diseases (14, 15). Indeed, it was recently demonstrated that extracellular high mobility group 1 protein (HMGB1) initiates inflammation, promotes angiogenesis and stimulates the migration of adherent cells such as SMCs (16-18). Similarly, it was found that histidyl-tRNA synthetase (HisRs), which is a known autoimmune myositis specific autoantigen, acts as a chemoattractant for various leukocytes and has proinflammatory functions (15, 19). In a recent study, we demonstrated that DNA topoisomerase I, another major nuclear autoantigen associated with SSc, bound specifically to the surface of fibroblasts when presented in the culture medium (i.e., extracellularly) (20). This binding was found to subsequently recruit anti-DNA topoisomerase I autoantibodies from SSc patients which then stimulated adhesion and activation of

monocytes (20), thereby providing a source of growth factors that stimulate fibrosis, the major disease associated with anti-DNA topoisomerase I in SSc (21, 22).

Based on this last report, we hypothesized that CENP-B participates in the development of PAH by binding directly to the surface of human pulmonary artery SMCs. Vascular SMC have been characterized as capable of expressing a whole spectrum of differentiated states, the extremes of which are usually referred to as synthetic and contractile phenotypes (23, 24). Contractile SMC (i.e., the state of the vast majority of SMCs *in vivo*) proliferate at an extremely low rate and exhibit very low synthetic activity (23). However, upon vascular injury, contractile SMC are capable of undergoing reversible modification to a highly synthetic phenotype, a process referred to as phenotypic modulation (25). These SMCs strikingly increase their rate of proliferation, migration, and synthetic capacity, and play a critical role in vascular repair as well as in the etiology of a number of major vascular diseases (26). Indeed, some of the initial events in the pathogenesis of systemic arterial hypertension are the migration and proliferation of SMCs into the intima (11-13, 27). However, the factors driving this vascular remodelling are unknown and their identification is crucial in order to prevent the formation of intimal thickening.

Here we demonstrate that purified CENP-B and CENP-B released from apoptotic endothelial (ECs) cells bound specifically to the surface of SMCs with a greater affinity for the contractile than for the synthetic type. CENP-B binding subsequently stimulated the migration of HPASMC *in vitro*, and stimulated the release of the pro-inflammatory

cytokines and chemokines interleukin-6 (IL-6) and IL-8, respectively. The mechanism by which CENP-B mediated these effects involves the focal adhesion kinase (FAK), Src, ERK1/2, and p38 MAPK pathways. Thus, CENP-B has all the hallmarks of a bifunctional molecule that may participate in normal and pathogenic mechanisms where SMCs are particularly involved.

MATERIALS AND METHODS

Cell populations and reagents. Primary cell populations and their respective media were from Cambrex (Walkerville, MD). Human pulmonary artery SMCs from adults, normal human lung fibroblasts (NHLF) and human pulmonary artery ECs were used between passages 4-6. Recombinant human CENP-B and CENP-A were obtained from Diarect AG (Freiburg, Germany) and tested for purity by gel electrophoresis and immunoblotting with mouse anti-human CENP-B (mACA1; ATCC, Manassas, VA) and CENP-A (MBL, Naka-Ku Nagoya, Japan) monoclonal antibodies, respectively. Both antigens were produced using the baculovirus/insect cell expression system and were purified with nickel-nitrilotriacetic acid system under native conditions.

Antibody purification. Human IgG and anti-CENP-B were purified as previously described (20). Briefly, human IgG were purified from SSc sera by affinity chromatography using NAb Protein G Spin Chromatography Kits (Pierce, Rockford, IL), according to the manufacturer's instructions. Final IgG concentrations were determined by the Bradford dye-binding procedure. Human anti-CENP-B antibodies were purified from SSc sera by affinity chromatography on immobilized CENP-B using Vivapure Epoxy Protein Coupling Kits (VivaScience, Hannover, Germany), following manufacturer's instructions, and were then transferred into phosphate buffer saline (PBS). Final anti-CENP-B IgG concentrations were determined using Easy-Titer Human IgG Assay Kit (Pierce). SSc patients were selected from a French Canadian cohort with SSc diagnosed at the Connective Tissue Diseases and

Vascular Medicine Clinics of Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. All patients fulfilled the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) preliminary criteria for the classification of SSc (21, 28). Sera were collected as described (20).

Indirect immunofluorescence and confocal microscopy. Indirect immunofluorescence was performed as described (20). Briefly, cells were grown on glass coverslips and serum-deprived for 48 hours. Cells were incubated with CENP-B in serum free medium, washed with PBS and incubated with IgG from SSc or normal sera. Cells were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde (PFA) for 5 minutes at 4°C. IgG binding was detected with Alexa-Fluor-488-conjugated goat anti-human IgG (Molecular Probes, Eugene, OR). Hoechst 33342 was used to stain nuclei. Cells were examined with a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope using MetaMorph 4.6r9 software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) or a LSM 510 confocal laser microscope using LSM 3.5 software (Zeiss, Thornwood, NY).

Cell-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cell-based ELISA was performed on living, unfixed cells as described (20), with minor modifications. Briefly, cells were grown on collagen-coated 96-well culture microplates until confluence. Cells were incubated with CENP-B in complete medium, washed with PBS, and incubated with purified IgG from normal or SSc sera in complete medium. Antibody binding was revealed

with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and o-phenylenediamine/citrate solution. The optical density at 490 nm was read in a MRX revelation microplate-reader (Dynex, Chantilly, VA). Samples were tested in triplicate.

Flow cytometry. The procedure was done as described (20), with minor changes; cells were grown until confluence and serum-deprived for 48 hours. Adherent cells were detached with PBS/0.5% EDTA and washed with PBS. Cells were incubated with CENP-B in PBS-3% bovine serum albumin (BSA) at room temperature, washed with PBS, and incubated with IgG purified from SSc or normal control sera. IgG binding was revealed with Alexa-Fluor-488-conjugated goat anti-human IgG (Molecular Probes). Cell permeability was assessed by addition of 7-aminoactinomycin D and permeable cells were gated out. Fluorescence was detected on a FACScan and analyzed by Cellquest software (BD Biosciences, San Jose, CA).

Wound healing Assay. Human pulmonary artery SMCs were grown to confluence on glass coverslips in 12-well plates and serum-deprived for 24 hours. The cell monolayer was wounded by scraping with a micropipette tip. The injured monolayers were washed once with PBS and allowed to recover for 6 hours in serum-free medium supplemented with CENP-B or platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB; Sigma, Oakville, On) as control. SMCs were fixed with 4% PFA for 5 minutes at 4°C, permeabilized with acetone for 5

minutes at -20°C , and stained with rhodamine-phalloidin (Sigma) in PBS-3% BSA. Quantitation was performed on photographs, taken at 40X magnification, by counting the number of Hoechst-stained nuclei from cells that had migrated into the cell-free space. Cells were examined with an Axio-imagerZ1 fluorescence microscope using Axiovision 4.5 software (Zeiss). Four fields per coverslip were evaluated and all experiments were performed in duplicate. The migration index is defined as the number of cells having migrated under different experimental conditions divided by the number of cells present in the denuded control area in the absence of stimulant (i.e., spontaneous migration).

Cytokine release. Human pulmonary artery SMCs were grown in 48-well culture plates until confluence and preincubated with serum-free medium for 48 hours. Cells were incubated with CENP-B at 37°C . The supernatants were collected, centrifuged at 500g at 4°C for 5 minutes, and cytokine concentrations determined with human IL-6 and human IL-8 ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to manufacturer's instructions. Samples were run in triplicate for each condition and normalized to the basal level.

Protein analysis. Cells were grown until confluence, serum-deprived for 48 hours and incubated with CENP-B in serum-free medium at 37°C . For direct immunoblot analysis, cells were lysed in Laemmli sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer supplemented with 1 mM sodium orthovanadate. The lysates were sonicated and clarified by centrifugation. The soluble fractions collected in the

supernatant were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Protein lysates were analyzed with polyclonal antibodies to FAK, phospho-FAK (Tyr576/577), Src, phospho-Src (Tyr416), ERK1/2, phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), p38 or phospho-p38 (Thr180/Tyr182) according to manufacturer's instructions. Antibody binding was followed by chemiluminescence detection and quantification was achieved by densitometry. All antibodies were purchased from Cell Signalling Technology (Beverly, MA).

Localization of CENP-B in apoptotic blebs from human pulmonary artery ECs.

Cells were induced into apoptosis by 1 μ M staurosporine for 4 hours at 37°C in serum free medium. Culture medium was collected and dead cells were discarded by centrifugation at 500g at 4°C for 15 minutes. Large apoptotic bodies were sedimented at 20,000g at 4°C for 20 minutes, and the pellet resuspended in PBS. Apoptotic bodies were spotted on slides, fixed with PFA and permeabilized with acetone. Localisation of CENP-B was visualized by immunofluorescence as described (20). The isolated apoptotic blebs were lysed by freeze/thawing, sonicated and clarified by centrifugation. The supernatants were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked and incubated with affinity-purified anti-CENP-B (250 ng/ml). IgG binding was detected by chemiluminescence. Binding to human pulmonary artery SMCs of CENP-B present in the supernatant of apoptotic blebs was detected by flow cytometry using whole IgG purified

from anti-CENP-B positive SSc serum (50 $\mu\text{g/ml}$) and affinity-purified anti-CENP-B (25 $\mu\text{g/ml}$).

Detection of CENP-B in supernatant from apoptotic human artery pulmonary ECs. Apoptosis of human pulmonary artery ECs was induced by growth factor deprivation for 72 hours as described (20). Dead cells and large apoptotic bodies were sedimented at 20,000g at 4°C for 15 minutes, and supernatants were concentrated 50 times. Proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked and incubated with affinity-purified anti-CENP-B (250 ng/ml). IgG binding was detected as above.

Statistical analysis. Student's unpaired 2-tailed *t* test followed by a Bonferroni correction was used for multiple group comparisons after assays of CENP-B and CENP-A binding to different cell lines. Statistical tests were performed with GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

CENP-B binds to the surface of human pulmonary artery SMCs. We recently found that the SSc autoantigen DNA topoisomerase I bound specifically to the surface of fibroblasts (20). Here, we show that CENP-B, another nuclear autoantigen associated with SSc, binds specifically to the surface of human pulmonary artery SMCs. Cells were grown to 70% confluence and serum-deprived for 48 hours to stimulate phenotypic modulation from the synthetic to the contractile phenotype (29). Pure CENP-B (5 μ g/ml) was then added to live, adherent, unfixed and unpermeabilized cells. CENP-B binding was detected with whole IgG purified from an anti-CENP-B-positive SSc serum (Figure 1A). Similar results were obtained with IgG purified from all anti-CENP-B-positive SSc sera tested (n = 11). None of the IgG from anti-CENP-B-negative SSc sera (n = 6) nor normal sera (n = 5) bound to human pulmonary artery SMCs, regardless of whether CENP-B was added (data not shown). CENP-B binding was detected on the surface of human pulmonary artery SMCs, but not on human pulmonary artery ECs or NHLFs (Figure 1A). No antibody binding was detected in the absence of added CENP-B (Figure 1A). Similar results were obtained with affinity-purified anti-CENP-B (data not shown). The absence of any staining of nuclei by the anti-CENP-B confirmed that cells remained intact during the immunofluorescence procedure, since endogenous CENP-B is exclusively localized in nuclei (1).

Dose-dependent binding of CENP-B on human pulmonary artery SMCs. To quantitate CENP-B binding on human pulmonary artery SMCs, cell-based ELISAs were performed. Human pulmonary artery SMCs (the synthetic phenotype) were seeded and proliferated when exposed to 5% fetal bovine serum. One or 2 days after confluence was achieved, the cells underwent a spontaneous change in phenotype to the contractile type (29). Increasing concentrations of CENP-B (0.5 to 15 $\mu\text{g/ml}$) were then added to adherent and intact human pulmonary artery SMCs while fibroblasts NHLFs were used as a negative control. As shown in Figure 1B, CENP-B binding to the surface of human pulmonary artery SMCs was dose dependent up to a maximal response at 7.5 $\mu\text{g/ml}$, after which higher concentrations of CENP-B appeared to reduce its binding efficiency. CENP-B binding was significantly higher on human pulmonary artery SMCs than on NHLFs at all concentrations tested ($P \leq 0.006$). Low binding of CENP-B was similarly observed on human pulmonary artery ECs assayed under the same conditions (data not shown). CENP-B binding was detected with IgG purified from all anti-CENP-B positive SSc sera tested ($n = 11$) and none of the IgG from anti-CENP-B negative SSc sera ($n = 6$) nor normal sera ($n = 5$) bound to human pulmonary artery SMCs (data not shown).

Specificity of CENP-B binding. To confirm the specificity of the anti-CENP-B reaction from whole IgG purified from anti-CENP-B positive SSc sera, the reactivity of affinity-purified anti-CENP-B IgG was compared with that of whole IgG purified from the same SSc sera. The reactivity of both sources of antibodies was then assayed by cell-based

ELISA on human pulmonary artery SMCs and NHLFs, and compared with that of anti-CENP-B depleted sera. As shown in Figure 1D, whole IgG from anticentromere positive sera and affinity-purified anti-CENP-B had similar reactivities, when used in equivalent proportions, whereas this reactivity was lost in anti-CENP-B depleted sera. Moreover, to confirm the specificity of CENP-B binding on human pulmonary artery SMCs, we compared it with that of CENP-A by a cell-based ELISA. CENP-A is another centromere autoantigen with a molecular weight of 17 kd (30) and it has also been produced using the baculovirus/insect cell expression system, thus constituting a negative control. Increasing concentrations of CENP-B or CENP-A were added to human pulmonary artery SMCs. Binding of these 2 related centromere antigens was then detected with IgG purified from anti-CENP-B and anti-CENP-A double positive SSc sera, as determined by successive ELISAs on CENP-B and CENP-A (data not shown). As seen in Fig.1C, binding to the surface of human pulmonary artery SMCs was significantly higher for CENP-B than for CENP-A at concentrations > 15 nM ($P \leq 0.008$).

Phenotypic modulation of human pulmonary artery SMCs affects CENP-B binding. *In vivo*, 2 extreme morphological phenotypes of vascular SMCs have been observed, namely the epitheloid and the spindle-shaped cells (31), which appear to correlate functionally with the synthetic and contractile cell types, respectively (32). Changes in SMC phenotype can be readily observed *in vitro* during primary culture. These changes are reversible and dependent upon cell seeding density, and the presence of serum (29). In the

majority of cases, SMCs must change from the contractile to the synthetic phenotype before they are capable of division and migration. We therefore compared the binding of CENP-B to contractile and synthetic SMCs.

Human pulmonary artery SMCs were grown on coverslips to 70% confluence and either serum-deprived for 48 hours to induce the contractile type or kept in the presence of serum to maintain the synthetic type. Staining with an antibody of the vimentin member of the intermediate filament family of proteins showed that synthetic human pulmonary artery SMCs had epitheloid shapes and no well-defined long axis, while contractile human pulmonary artery SMCs were spindle-shaped (Figure 2A). Under these conditions, it was found that CENP-B bound more intensely to contractile than to synthetic human pulmonary artery SMCs (Figure 2B). To confirm these results independently, the effect of phenotypic modulation on CENP-B binding was evaluated by flow cytometry. Confluent human pulmonary artery SMCs were analyzed, and, again, results showed that CENP-B binding to the contractile SMC phenotype doubled that on synthetic SMCs (Figures 2C and D). Taken together, these data suggest that CENP-B bound to cells via a specific surface determinant the expression and/or affinity of which was increased on contractile SMCs compared with those of the synthetic type.

Migration of human pulmonary artery SMCs stimulated by CENP-B.

Proliferation and migration of vascular SMCs from the media towards the intima are key events in the pathophysiology of many vascular disorders such as PAH (33). Hence, the

effects of CENP-B on the migratory properties of human pulmonary artery SMCs were investigated. As shown in Figure 3A, a 6 hour incubation with CENP-B stimulated the migration of human pulmonary artery SMCs when tested *in vitro* in a wound-healing assay. CENP-B potently stimulated human pulmonary artery SMCs migration starting at doses as low as 100 ng/ml relative to the vehicle-treated cells (Figure 3B). Interestingly, the effect of CENP-B was close to, or comparable with, that of PDGF-BB at 10 ng/ml (34, 35). As shown in Figure 3B, a biphasic stimulatory effect was observed, with a first peak of stimulation at 500 ng/ml CENP-B, followed by a decrease at 2.5 μ g/ml CENP-B, and maximal response at a second peak of stimulation at 10 μ g/ml CENP-B. The significance of the latter findings is so far unclear and will be the focus of additional research.

Release of cytokines induced by CENP-B. Migration of vascular SMC is a complex response that occurs during several pathological processes and that involves the production and the release of soluble factors (36). Among these factors, cytokines such as IL-6 (37) and IL-8 (38) have been found to promote SMC migration. Based on these reports, the effects of CENP-B on cytokine release was evaluated. Preliminary experiments showed that 6 cytokines were modulated in culture supernatants of CENP-B treated cells, among which IL-6 and IL-8 appeared to be the most prominent candidates. To extend this observation, ELISAs were performed for both interleukins. Subconfluent cultures of serum-deprived human pulmonary artery SMCs were stimulated with 5 μ g/ml CENP-B for 3-24 hours. These time course analyses revealed that CENP-B exerted an affect on both

interleukins, represented by a bell-shaped curve (Figure 4); between 6 and 16 hours, CENP-B induced a clear increase in interleukins release. After 24 hours of stimulation, the concentrations of IL-6 decreased back to a level lower than that of unstimulated cells, while the concentration of IL-8 decreased to half of the maximal response.

Phosphorylation of FAK, Src and MAPK induced by CENP-B. The migration of vascular SMCs from the media into the neointima involves changes in intracellular signalling cascades that regulate cell movement. Several studies suggest that FAK promotes cell migration (39) by activating multiple signalling pathways involving Src family kinases (40) and MAPKs such as ERK1/2 (41) and p38 (42). Additionally, recent evidence indicates that FAK phosphorylation at both tyrosines 576 and 577 in the catalytic domain appears important for the maximal kinase activity of FAK and signalling to downstream effectors (40, 43). We therefore performed experiments to characterize the biochemical mechanisms involved in the CENP-B-mediated migration.

To determine whether FAK, Src and MAPK are activated in CENP-B-treated human pulmonary artery SMCs, cells were first stimulated with CENP-B (100 ng/ml) for 0-60 minutes, and whole cell lysates were analyzed by immunoblotting with phospho-specific antibodies. Corresponding pan-specific antibodies were used to ascertain uniformity of protein loading. As shown in Figure 5A, CENP-B treatment resulted in a time-dependent induction of FAK phosphorylation on both tyrosines 576 and 577 that was evident at 2 minutes but that returned to baseline by 10 minutes. Time course analyses also revealed that

CENP-B exerted a maximum effect on Src within 2-5 minutes, but after 20 minutes of stimulation, its level of phosphorylation decreased to that at baseline. Moreover, immunoblot analysis showed that CENP-B treatment resulted in increased levels of phosphorylated MAPK. A time course study indicates that increased ERK1/2 phosphorylation was detected at 5 minutes, with maximal increases occurring between 10 and 30 minutes of treatment, whereas p38 MAPK response occurred as early as 5 minutes, with maximum induction achieved 10 minutes after treatment and declining thereafter. As shown in Figure 5B, phosphorylation events of FAK, Src, ERK and p38 MAPK appear to be maximal at doses of CENP-B as low as 10 ng/ml.

Release of CENP-B from apoptotic ECs. CENP-B is normally sequestered in the nucleus and thus inaccessible to the extracellular environment. Therefore, this raises the question as to the possible source of extracellular CENP-B *in vivo*. Recent *in vitro* studies have demonstrated that some nuclear antigens are found concentrated in blebs of cells undergoing apoptosis (44, 45) from which they can be released in a soluble form (20). Based on these observations and since enhanced apoptosis of ECs has been suggested to be an early (and possibly the initial) event in the pathogenesis of SSc (for a review, see ref. 22), the localization of CENP-B during apoptosis was determined.

A time course analysis of growth factor deprivation revealed that after 6 hours of apoptosis, CENP-B was redistributed from the nuclear compartment to vesicles representing apoptotic blebs (Figure 6A, parts a and b). Indeed, CENP-B (green) was mostly retained

within the apoptotic bodies during early apoptosis and still colocalized with chromatin (blue). After treatment with staurosporine, a potent inducer of apoptosis, CENP-B was clearly identified inside the apoptotic blebs of ECs (green in Figure 6A, part c) but in apparent dissociation from the chromatin component (blue) to which it is normally bound (46). We next examined whether CENP-B was also released from ECs when apoptosis was induced by growth factor deprivation, a more physiological process. Fractionation of apoptotic blebs by differential centrifugation showed that, after 72 hours of growth factor deprivation, CENP-B could be detected in the concentrated culture supernatant of apoptotic ECs (Figure 6B). CENP-B present in these supernatants as well as in the supernatant from lysed apoptotic blebs of human pulmonary artery ECs displayed the typical molecular weight (80 kd) of native CENP-B (Figure 6B).

CENP-B from apoptotic ECs binds to human pulmonary artery SMCs. We next examined whether CENP-B released from apoptotic human pulmonary artery ECs was also capable of binding to human pulmonary artery SMCs. Since we observed that CENP-B was present in concentrated culture supernatant from apoptotic ECs as well as within apoptotic bodies, we accelerated and amplified the CENP-B liberation process from apoptotic blebs by freezing-thawing cycles. The lysates were clarified and the soluble fraction was added to live, unfixed and unpermeabilized human pulmonary artery SMCs. CENP-B binding was detected by flow cytometry using IgG purified from SSc anti-CENP-B positive sera (Figure 6C, middle panel). Consistent with our previous findings, CENP-B from apoptotic ECs

bound to the surface of human pulmonary artery SMCs. Similar results were obtained when affinity-purified anti-CENP-B (Figure 6C, right panel) was used, confirming that CENP-B was the protein in the apoptotic bleb lysate that specifically bound to human pulmonary artery SMCs surfaces. No binding was observed when anti-CENP-B depleted sera (data not shown) or IgG from normal sera were used (Figure 6C, left panel). Therefore, these results show that CENP-B is redistributed into apoptotic bodies from which, during late apoptosis or secondary necrosis, CENP-B can be released to the extracellular milieu. Taken together, our data suggest that CENP-B molecules can originate from apoptotic ECs, from which they would gain immediate access to neighbouring vascular SMCs

DISCUSSION

Earlier *in vitro* studies have demonstrated that some autoantigens have an additional role when they are released in the extracellular environment during the course of injurious insults resulting in cell death (14, 17-20, 47). Indeed, it was previously suggested that extracellular autoantigens participate in normal wound repair processes by acting like cytokines and/or chemokines and subsequently display pathogenic activities that contribute to the development of autoimmune diseases (14, 19). Our present findings suggest that CENP-B, a nuclear autoantigen specifically targeted in the limited form of SSc, can be added to this set of bifunctional molecules. The present study clearly indicates that exogenous CENP-B bound specifically to the surface of human pulmonary artery SMCs, and, despite the fact that the putative CENP-B receptor remains to be identified, our data indicate that it appears to be specifically enriched on contractile relative to synthetic SMC phenotypes. Moreover, the present study sheds new light on the possible role of extracellular CENP-B and its potent biological effects on human pulmonary artery SMCs.

These data represent the first demonstration of the ability of CENP-B to stimulate cell migration in a wound-healing assay, and to subsequently induce the secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. It was shown that, in response to CENP-B exposure, human pulmonary artery SMCs released IL-6 and IL-8 into the extracellular space, where they may, *in vivo*, exert their respective role in the initiation of an inflammatory response and contribute to the stimulation of SMC migration and proliferation, such as may be required during a tissue repair process. Furthermore, the

current study suggests that, upon CENP-B stimulation, the activation of the FAK-Src complex initiates the cascade and propagates the signal to other key players such as MAPK, which may then be involved in the establishment of the migratory and subsequently the pro-inflammatory phenotype of human pulmonary artery SMCs.

Human CENP-B is exclusively localized within heterochromatin, more precisely in the central domain of the centromere. Therefore CENP-B is not normally presented to cell-surface receptors. However, as we have shown above, CENP-B is redistributed into apoptotic bodies and can be released to the extracellular milieu during the course of ECs apoptosis, thus providing a source of extracellular CENP-B. This observation is consistent with previous data showing that some nuclear autoantigens are clustered in apoptotic blebs (45, 48) and can be released in a soluble form (20).

It is now well established that the vascular endothelium is involved in numerous physiological processes and ECs apoptosis occurs as an initial step in a variety of pathological situations including PAH (13, 49, 50) and scleroderma (22, 51, 52). Moreover, in response to vascular injury, ECs produce a wide spectrum of molecules that can lead to adverse phenotypic modulation of SMCs and to acquisition of characteristics that can contribute to development and progression of wound repair process as well as in the etiology of vascular disease (33, 49). According to the results of the present study, CENP-B may be one of those mediators. Indeed, our data suggest that CENP-B molecules can originate from apoptotic ECs, and, since CENP-B has a specific affinity for human pulmonary artery SMCs surfaces, it could readily bind to nearby SMCs, which would then

induce SMC migration and the release of proinflammatory cytokines. Subsequently, this chain of events could lead to a rapid and localized mobilization of SMCs, thus contributing to the initiation of wound repair processes. Further experimentation will be required to provide support for this hypothesis.

Overall, our data support the concept that the primary role of autoantigens may be to alert the immune system to danger signals from invaded and damaged tissues to facilitate repair, and an autoimmune response can result from a failure to turn off the reparative immune response that occurs only in persons with impaired immunoregulatory functions (14, 53). The ability of CENP-B to behave as a potent migratory factor makes it an interesting molecule. However, its biological potential is yet to be completely revealed and open questions remain regarding the identity of its cell surface receptor. Experiments to identify the cell surface receptor on human pulmonary artery SMCs are currently in progress in our laboratory. The discovery of CENP-B as a potential cytokine initiates a new field of investigation and opens up a new perspective for studying the pathogenic role of anti-CENP-B autoantibodies present in patients with limited cutaneous SSc (10).

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Ms Isabelle Clément for technical support and helpful advice. We thank Mr. Michal Abrahamowicz for his valuable help with statistical analyses. We are grateful to Mr. Christian Charbonneau for his imaging expertise and assistance at the Bio-Imaging Core Facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal.

REFERENCES

1. Earnshaw WC, Sullivan KF, Machlin PS, Cooke CA, Kaiser DA, Pollard TD, et al. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J Cell Biol* 1987; 817-29.
2. Hudson DF, Fowler KJ, Earle E, Saffery R, Kalitsis P, Trowell H, et al. Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *J Cell Biol* 1998; 309-19.
3. Bernat RL, Borisy GG, Rothfield NF, Earnshaw WC. Injection of anticentromere antibodies in interphase disrupts events required for chromosome movement at mitosis. *J Cell Biol* 1990; 1519-33.
4. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients. *Arthritis Rheum* 1988; 378-85.
5. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum* 1980; 617-25.
6. Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J, Tan EM. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 1627-31.
7. Salerni R, Rodnan GP, Leon DF, Shaver JA. Pulmonary hypertension in the CREST syndrome variant of progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Intern Med* 1977; 394-9.

8. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA, Jr. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003; 203-9.
9. Steen V. Advancements in diagnosis of pulmonary arterial hypertension in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2005; 3698-700.
10. Senecal JL, Henault J, Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol* 2005; 1643-9.
11. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 13S-24S.
12. Mitani Y, Ueda M, Komatsu R, Maruyama K, Nagai R, Matsumura M, et al. Vascular smooth muscle cell phenotypes in primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2001; 316-20.
13. Rabinovitch M. Pathobiology of Pulmonary Hypertension. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2007; 369-399.
14. Oppenheim JJ, Dong HF, Plotz P, Caspi RR, Dykstra M, Pierce S, et al. Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J Leukoc Biol* 2005; 854-61.
15. Howard OZ. Autoantigen signalling through chemokine receptors. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 642-6.
16. Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Sparatore B, Pedrazzi M, et al. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol* 2006; 12-5.

17. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 2005; 1-8.
18. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005; 331-42.
19. Howard OM, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 781-91.
20. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006; 963-73.
21. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR, 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)* 2002; 154-67.
22. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 557-67.
23. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995; 487-517.
24. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 1990; 966-90.

25. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979; 1-61.
26. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 767-801.
27. Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* 1986; 427-44.
28. 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* 1980; 581-90.
29. Chamley-Campbell JH, Campbell GR. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis* 1981; 347-57.
30. Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, Rothfield N. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J Clin Invest* 1986; 426-30.
31. Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Gabbiani F, Gabbiani G. Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 815-20.
32. Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol* 1981; 379-83.
33. Jeffery TK, Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 173-202.
34. Bilato C, Pauly RR, Melillo G, Monticone R, Gorelick-Feldman D, Gluzband YA, et al. Intracellular signaling pathways required for rat vascular smooth muscle cell

- migration. Interactions between basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 1995; 1905-15.
35. Facchiano A, De Marchis F, Turchetti E, Facchiano F, Guglielmi M, Denaro A, et al. The chemotactic and mitogenic effects of platelet-derived growth factor-BB on rat aorta smooth muscle cells are inhibited by basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* 2000; 2855-63.
 36. Abedi H, Zachary I. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res* 1995; 544-56.
 37. Wang Z, Newman WH. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *J Surg Res* 2003; 261-6.
 38. Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL, et al. Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 1-7.
 39. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000; 249-56.
 40. Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 1995; 954-63.
 41. Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BB-stimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 41092-9.
 42. Hedges JC, Dechert MA, Yamboliev IA, Martin JL, Hickey E, Weber LA, et al. A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 1999; 24211-9.

43. Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol* 1999; 4806-18.
44. Dieude M, Senecal JL, Raymond Y. Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 2004; 3221-31.
45. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 1317-30.
46. Masumoto H, Masukata H, Muro Y, Nozaki N, Okazaki T. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 1989; 1963-73.
47. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Muller S, Resnati M, Sanvito F, et al. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 2001; 1197-206.
48. Dieude M, Senecal JL, Rauch J, Hanly JG, Fortin P, Brassard N, et al. Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs. *Arthritis Rheum* 2002; 2695-707.
49. Stenmark KR, Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 1997; 89-144.

50. Michelakis ED. Spatio-temporal diversity of apoptosis within the vascular wall in pulmonary arterial hypertension: heterogeneous BMP signaling may have therapeutic implications. *Circ Res* 2006; 172-5.
51. Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med* 1979; 1326-35.
52. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996; 785-92.
53. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2004; 469-78.

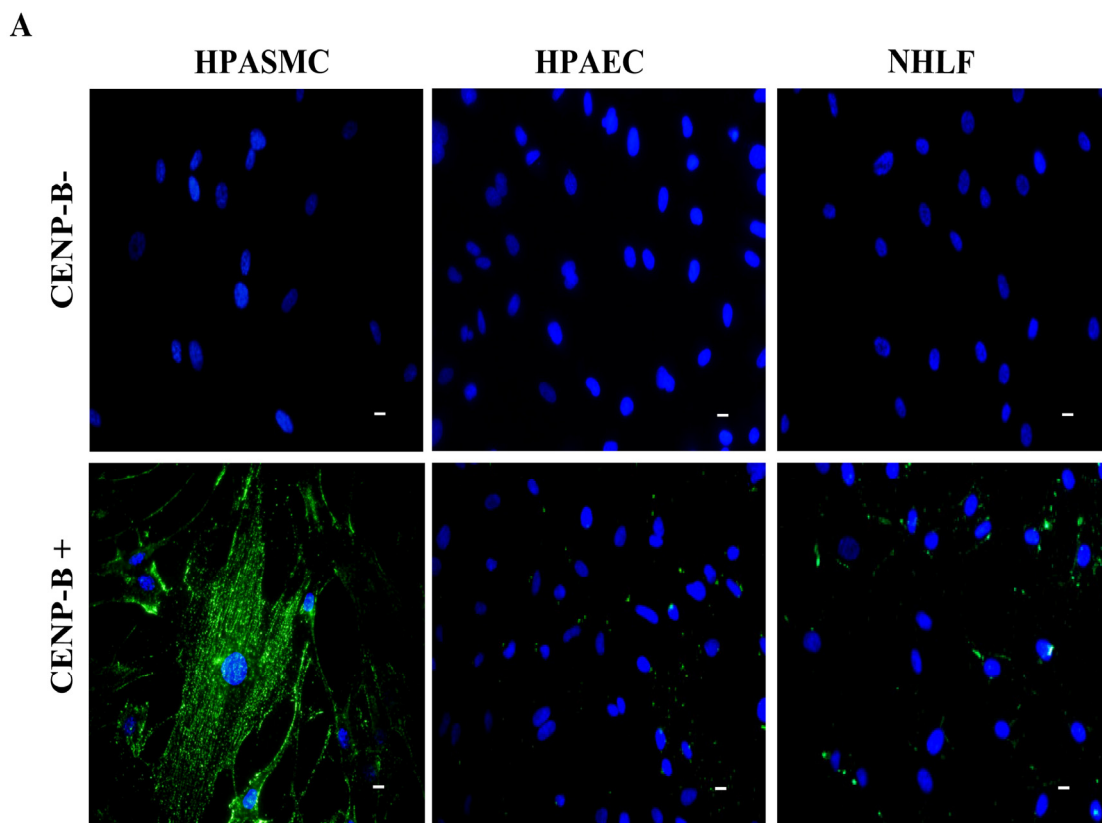


Figure 1. Specific binding of CENP-B to human pulmonary artery smooth muscle cells (SMCs). **A**, Indirect immunofluorescence. Contractile human pulmonary artery SMCs preincubated with or without 5 $\mu\text{g/ml}$ CENP-B were incubated with IgG purified from an anti-CENP-B positive systemic sclerosis (SSc) serum and goat anti-human IgG (green). Also shown are Hoechst 33342-stained nuclei (blue). Bars = 50 μm . HPASMC = human pulmonary artery smooth muscle cells. HPAEC = human pulmonary artery endothelial cells. NHLFs = normal human lung fibroblasts.

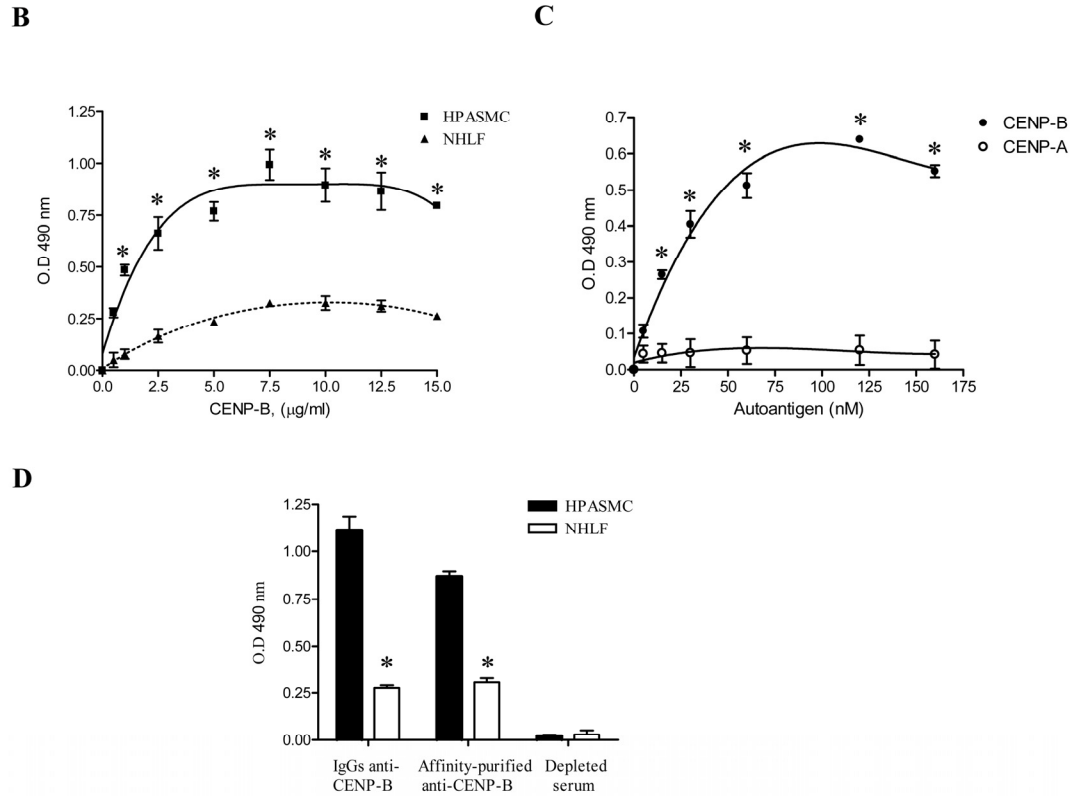


Figure 1. Specific binding of CENP-B to human pulmonary artery smooth muscle cells (SMCs). **B**, Quantification of CENP-B binding to SMCs and fibroblast by cell-based ELISA. Human pulmonary artery SMCs or NHLFs were incubated with CENP-B, and its binding was detected with IgG purified from an anti-CENP-B-positive SSC serum and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG. **C**, Quantification of CENP-B and CENP-A binding by cell-based ELISA, detected as described above. **D**, Comparison of affinity-purified anti-CENP-B IgG with whole anti-CENP-B IgG and anti-CENP-B-depleted sera by cell-based ELISA. In **B-D**, data are presented as mean \pm SEM of optical density (OD) from pooled triplicates and are representative of 3-4 independent experiments.

* = $P \leq 0.006$ versus NHLFs in **B**; * = $P \leq 0.008$ versus CENP-A in **C**; * = $P \leq 0.0001$ versus human pulmonary artery SMCs in **D**.

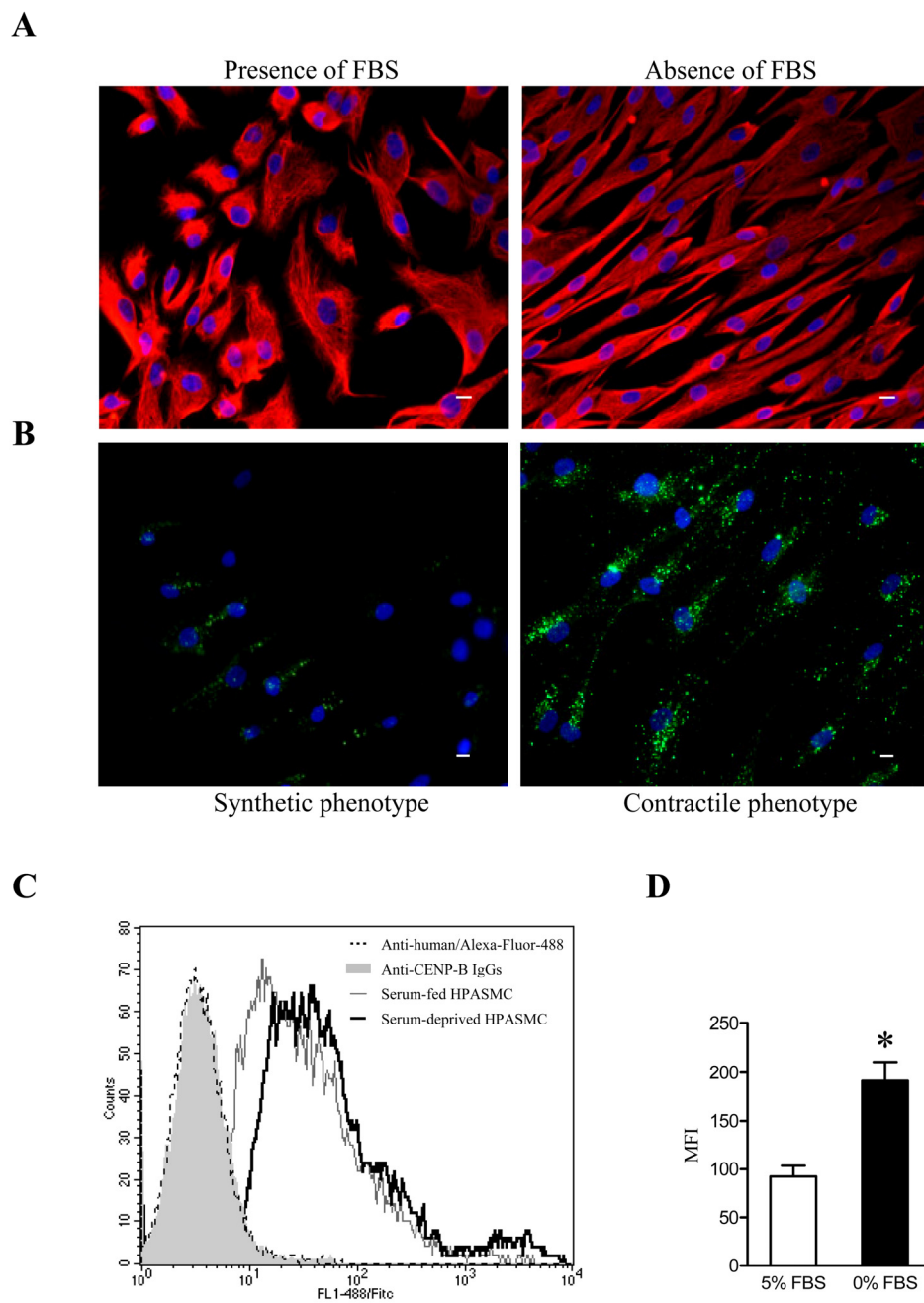
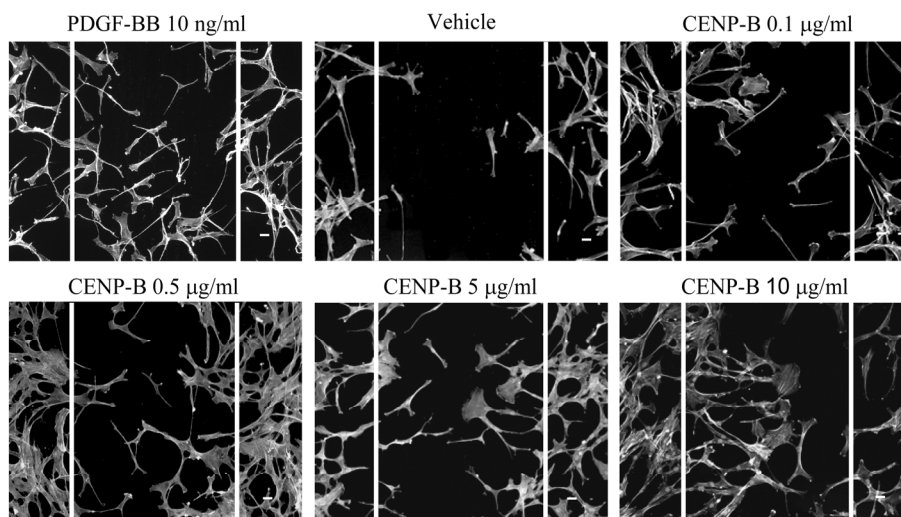


Figure 2. Phenotypic modulation of human pulmonary artery SMCs affects CENP-B binding. **A** and **B**, Human pulmonary artery SMCs were serum-deprived (contractile

phenotype) or not serum-deprived (synthetic phenotype) and incubated with an antivimentin antibody followed by goat anti-mouse IgG (red) (**A**) or preincubated with 5 $\mu\text{g/ml}$ CENP-B (**B**). Hoechst 33342 staining of nuclei (blue) and immunofluorescence was performed as in Figure 1. Bars = 50 μm . **C**, Shown are results of flow cytometry analysis of CENP-B binding to human pulmonary artery SMCs, using IgG purified from anti-CENP-B-positive SSc sera. The number of positive intact cells versus fluorescence intensity is presented for serum-deprived or serum-fed cells. Controls were incubated with secondary antibody alone (anti-human/Alexa Fluor 488) or with anti-CENP-B-positive purified IgG alone. **D**, Mean fluorescence intensity (MFI) of CENP-B binding on serum-deprived human pulmonary artery SMCs was calculated relative to that on serum-fed human pulmonary artery SMCs in each experiment. Values are the mean and SEM. * = $P \leq 0.01$ versus serum-fed human pulmonary artery SMCs. Results are representative of 3 independent experiments. FBS = fetal bovine serum; FITC = fluorescein isothiocyanate (see Figure 1 for other definitions).

A



B

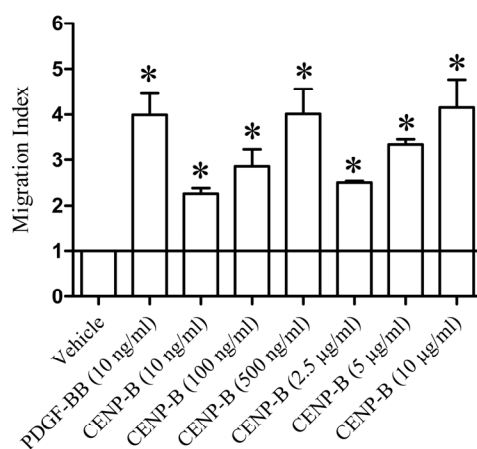


Figure 3. CENP-B stimulates the repair of a monolayer of wounded human pulmonary artery SMCs. **A**, Scraped monolayers of human pulmonary artery SMCs were incubated with CENP-B in serum free medium. Platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB;10 ng/ml) was used as a positive control. After 6 hours, migrating cells were photographed.

Bars = 50 μm . **B**, Nuclei of human pulmonary artery SMCs that had migrated into the wound were counted. The horizontal line corresponds to the number of cells migrating in the absence of any stimulator. Results are expressed as mean \pm SEM of 4 fields per coverslip, and results are representative of 3 independent experiments. * = $P \leq 0.05$ versus vehicle.

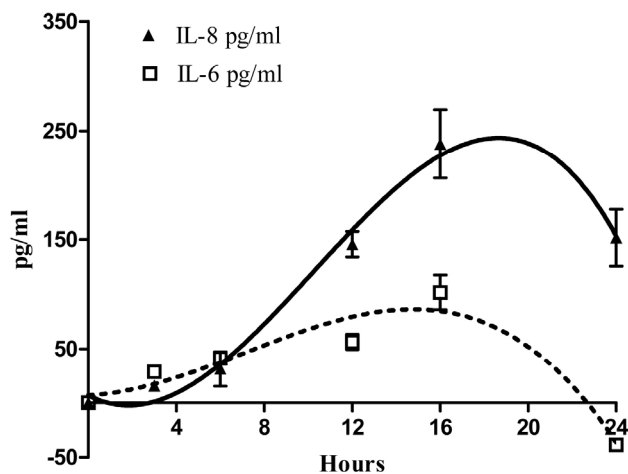


Figure 4. Time course of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 release induced by CENP-B binding. Human pulmonary artery SMCs were grown in 48-well culture plates until confluence and preincubated with serum-free medium for 48 hours. Cells were incubated with 5 μ g/ml CENP-B for the indicated periods of time. The supernatants were collected and interleukin concentrations were determined with human IL-6 and IL-8 ELISA kits. Samples were run in triplicate for each condition and normalized to the basal level of expression for each interleukin. Results are expressed as mean \pm SEM, and are representative of 3 independent experiments.

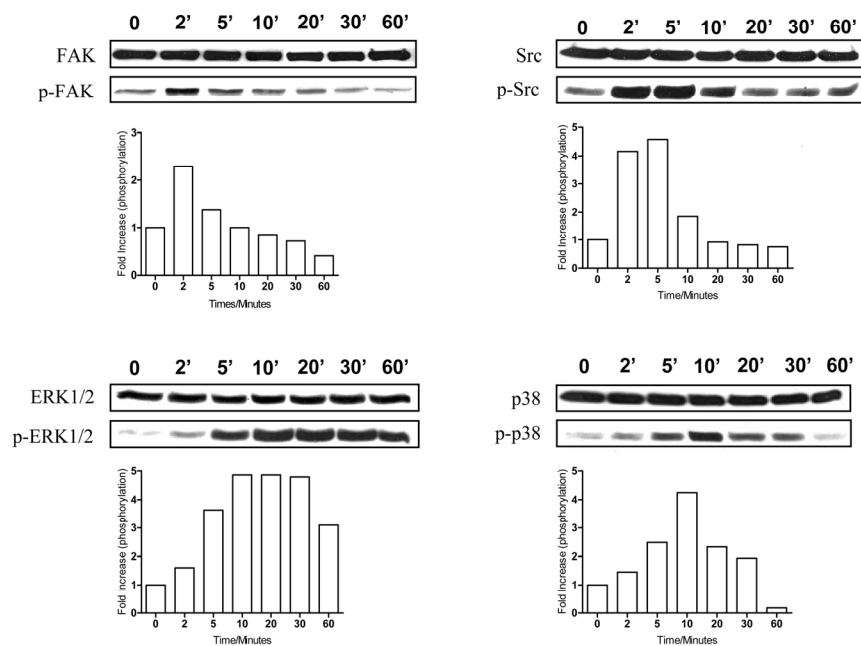
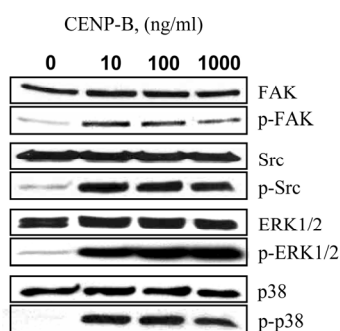
A**B**

Figure 5. CENP-B induces focal adhesion kinase (FAK), Src, ERK1/2 MAPK and p38 MAPK phosphorylation. Serum-starved human pulmonary artery SMCs were stimulated

with CENP-B (100 ng/ml) for the indicated periods of time (**A**) or with increasing concentrations of CENP-B for 5 minutes (**B**). Whole cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated phospho-specific (bottom panels) and pan-specific antibodies (top panels). Relative phosphorylation was determined by scanning densitometry for each phospho-specific antibody and is presented in the bar graphs below each blot image. Results shown are representative of 3 independent experiments.

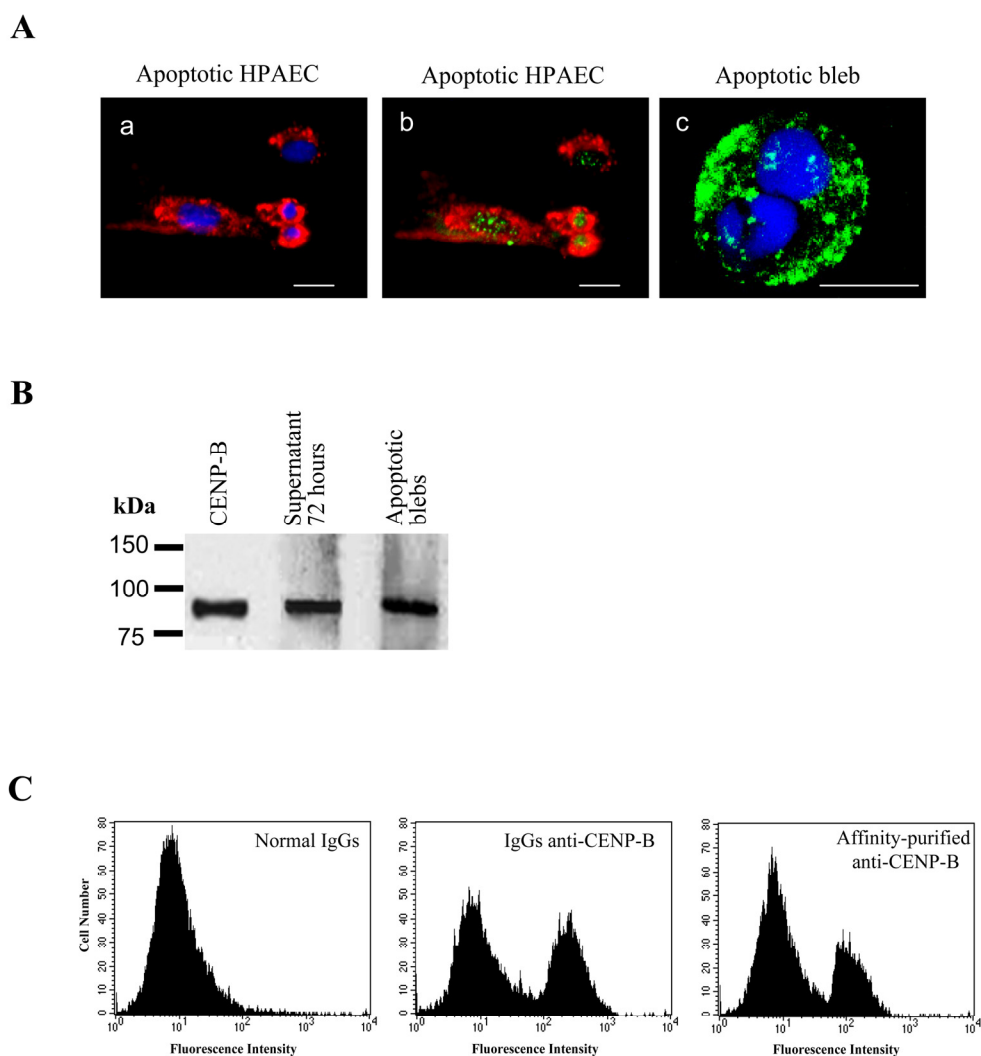


Figure 6. CENP-B from apoptotic endothelial cells (ECs) binds to human pulmonary artery SMCs. **A**, Fixed and permeabilized serum-deprived human pulmonary artery ECs (**a** and **b**) were incubated with IgG from anti-CENP-B-positive SSc sera and goat anti-human IgG (green). Also shown are Hoechst 33342-stained nuclei (blue) and wheat germ agglutinin-stained membranes (red). Fixed and permeabilized staurosporine-treated human pulmonary

artery ECs blebs (c) were double-stained with IgG purified from SSc CENP-B-positive serum (green) and Hoechst 33342 (blue). Bars = 50 μ m. **B**, CENP-B released by serum-deprived apoptotic human pulmonary artery ECs in concentrated culture supernatants and in the supernatant from lysed staurosporine-treated apoptotic blebs was detected by immunoblotting with affinity-purified anti-CENP-B. Purified CENP-B was used as a control. **C**, CENP-B from lysed apoptotic blebs was detected by flow cytometry using whole IgG from anti-CENP-B-positive SSc serum (middle) and affinity-purified anti-CENP-B (right). The binding of CENP-B to human pulmonary artery SMCs was confirmed by an increase in fluorescence intensity of CENP-B-positive SMCs. No binding was observed with normal IgG (left). Results are representative of 3 independent experiments. See Figure 1 for other definitions.

Article no.2 : L'auto-antigène nucléaire centromérique B (CENP-B) se lie aux cellules musculaires lisses vasculaires via le récepteur de chémokine 3 (CCR3) et transactive le récepteur de l'EGF.

Article accepté pour publication dans Arthritis & Rheumatism (Sous presse).

Présentation de l'article no.2

Cet article est une suite directe de l'**article no.1** et poursuit la caractérisation de la liaison de la CENP-B à la surface des CML de l'artère pulmonaire humaine. Le but de cet article était d'abord d'identifier la cible de la CENP-B à la surface des CML et ensuite d'évaluer les effets de la liaison des anti-CENP-B prélevés chez des patients sclérodermiques.

Les résultats présentés dans ce deuxième article démontrent que la CENP-B se lie spécifiquement à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires via le CCR3 pour ensuite transactiver le récepteur de l'EGF selon un mécanisme métalloprotéase-dépendant. Nous avons également démontré que les anticorps anti-CENP-B pouvaient abolir la cascade de signalisation intracellulaire déclenchée par la CENP-B, empêchant ainsi la CENP-B d'exercer son rôle de cytokine.

Les résultats présentés dans cet article ont donc permis d'identifier la CENP-B comme étant un ligand du CCR3 et ouvrent plusieurs perspectives quant à l'étude du rôle pathogène des auto-anticorps anti-CENP-B dans la ScS.

Contribution des auteurs à l'article no.2

- G.R:** Élaboration du protocole expérimental ; collecte et analyse scientifique et statistique des résultats expérimentaux ; rédaction de l'article
- M.S.C:** Analyse et interprétation des données expérimentales complémentaires à l'étude.
- I.C:** Collecte des données scientifiques.
- Y.R:** Élaboration du protocole expérimental ; analyse scientifique des résultats expérimentaux ; rédaction de l'article
- J.L.S:** Élaboration du protocole expérimental ; analyse scientifique des résultats expérimentaux ; rédaction de l'article

**Article no. 2: THE NUCLEAR AUTOANTIGEN CENTROMERE
PROTEIN B (CENP-B) TRANSACTIVATES THE EGF-
RECEPTOR VIA CHEMOKINE RECEPTOR 3 IN
VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS**

Authors : Geneviève Robitaille, Marie-Soleil Christin, Isabelle Clément, Jean-Luc Senécal and Yves Raymond

Geneviève Robitaille, MSc, PhD candidate, Marie-Soleil Christin, MSc, PhD candidate, Isabelle Clément, MSc, Jean-Luc Senécal, MD, FRCPC, FACP, Professor of Medicine, Yves Raymond, PhD, Professor of Medicine

Laboratory for Research in Autoimmunity, Notre-Dame Hospital,
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; and
Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Supported by grants MOP-68966 and MOP-81252 (JLS, YR) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), by a grant from Sclérodémie Québec (JLS, YR), and by studentships from Sclérodémie Québec (GR), CIHR (MSC) and Fonds de la recherche en santé du Québec (MSC)

Running head: CENP-B activates EGFR via CCR3 in vascular smooth muscle cells

Address correspondence and reprint requests to:
Yves Raymond, PhD
Laboratory for Research in Autoimmunity
Notre-Dame Hospital, CHUM
1560 Sherbrooke East
Montreal QC H2L 4M1
Canada
Phone: 514-890-8000 ext. 25481
Fax : 514-412-7661

ABSTRACT

Objective. We have previously found that the centromere protein B (CENP-B) nuclear autoantigen, specifically targeted by autoantibodies in the limited cutaneous form of systemic sclerosis (SSc), behaved as a potent migratory factor for human pulmonary artery smooth muscle cells (HPASMC). Other recent studies have shown that several disease-associated autoantigens induced cell migration by interacting with various chemokine receptors. Prompted by this hypothesis, we undertook this study to determine whether CENP-B interacted with chemokine receptors at the surface of HPASMC. **Methods.** To demonstrate the expression of specific chemokine receptors by HPASMC at both mRNA and protein levels, RT-PCR, immunoblotting, and flow cytometry analyses were performed. Desensitization studies and specific inhibitors were used to further identify the HPASMC surface target of CENP-B. **Results.** Our data strongly suggest that CENP-B utilized the chemokine receptor 3 (CCR3) to mediate HPASMC signalization. Moreover, several lines of evidence indicate that CENP-B binding subsequently stimulated the cross talk between CCR3 and epidermal growth factor receptor (EGFR) via a metalloprotease-dependent mechanism that involved heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) processing. Transactivation of the EGFR through CCR3 is a critical pathway that elicits MAP kinase activation and secretion of cytokines such as interleukin 8. Finally, anti-CENP-B autoantibodies were found to abolish this signaling pathway, thus preventing CENP-B from transactivating EGFR and exerting its cytokine-like activities toward

vascular SMCs. **Conclusion.** The identification of CENP-B as a CCR3 ligand opens up new perspectives for the study of the pathogenic role of anti-CENP-B autoantibodies.

G-protein coupled receptors (GPCRs) comprise the largest number of regulatory surface proteins, including chemokine receptors and most of them appear to play an important role in regulating cell migration (1). Until recently, the expression of chemokine receptors had only been described on leukocyte populations. However, increasing evidence suggests that non-haematopoietic cell types such as vascular smooth muscle cells (SMCs) are capable of binding and responding to chemokines (2, 3).

Recent *in vitro* studies have demonstrated that several autoimmune disease-associated self-antigens induced leukocyte migration by interacting with various chemoattractant G_{αi}-protein-coupled receptors (4, 5). Indeed, it has been found that histidyl-tRNA synthetase and aspartyl-tRNA synthetase, autoantigens specific to autoimmune myositis, were chemotactic for CC chemokine receptor 5 and 3 (CCR3)-expressing leukocytes, respectively (6). Similarly, uveitis antigens such as retinal S-antigen and interphotoreceptor retinoid binding protein, can be chemoattractant for lymphocytes and immature dendritic cells by interacting with chemokine receptors (7).

In a previous study, we demonstrated that the nuclear autoantigen CENP-B, specifically targeted by autoantibodies in the limited cutaneous form of systemic sclerosis (SSc), bound to the surface of human pulmonary artery smooth muscle cells (HPASMC) and subsequently stimulated their migration *in vitro*, as well as the release of pro-inflammatory cytokines including interleukin-8 (IL-8) (8). Based on this last report, and since several studies suggested that many autoantigens interact with chemokine receptors,

we hypothesized that CENP-B interacted with one or several specific chemokine receptors at the surface of HPASMC.

Several GPCRs, including chemokine receptors, have recently been demonstrated to activate receptor tyrosine kinase (RTKs) such as the epidermal growth factor receptor (EGFR), even though the GPCR agonists do not directly interact with EGFR (9). It is now well established that EGFR transactivation by GPCRs is a common phenomenon observed in many cell types through different GPCR agonists, including thrombin, endothelin-1, angiotensin-II and eotaxin-1 (CCL11) (9-13). The mechanisms of EGFR transactivation by GPCRs is so far unclear but, recently, several interesting findings have been reported concerning components putatively involved in this mechanism. The metalloprotease-dependent shedding of EGFR ligands, such as heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), has been proposed to be an attractive mechanism of EGFR transactivation in several cells, including vascular SMCs (14).

The aims of this study were therefore to identify the HPASMC surface target of CENP-B, to explore the relevant signaling pathways and to characterize the effects of anti-CENP-B binding on SMC stimulation. Here, we report several lines of evidence indicating that CENP-B interacted with CCR3 and subsequently transactivated EGFR via a metalloprotease-dependent mechanism, which involved HB-EGF processing, and resulted in increased cytokine secretion. Finally, we show that anti-CENP-B autoantibodies abolished this signaling pathway.

MATERIALS AND METHODS

Cell populations and reagents. Primary HPASMC from adults were obtained from Lonza (Allendale, NJ). Cells were grown until confluence and serum-starved to stimulate phenotypic modulation from the synthetic to the contractile phenotype. Cells were used between passages 4-6. Recombinant human CENP-B was from Diarect AG (Freiburg, Germany). Pertussis toxin was from Sigma (Oakville, On). All chemokines including recombinant human Eotaxin/CCL11 and Met-RANTES/CCL5 as well as the anti-human CCR3 neutralizing antibody and the heparin-binding EGF like growth factor (HB-EGF) neutralizing antibody were from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN). GM6001 and AG1478 were obtained from Calbiochem. (La Jolla, CA).

Protein analysis. Protein analysis was performed as described (8). Cells were grown until confluence and serum-deprived for 72 hours. Cells were then incubated in serum-free medium for 1 hour with several reagents before being stimulated with 100 ng/ml of CENP-B. For direct immunoblot analysis, cells were lysed in Laemmli SDS-PAGE sample buffer supplemented with 1 mM sodium orthovanadate. The lysates were sonicated and clarified by centrifugation. The soluble fractions were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Protein lysates were exposed to antibodies to FAK, phospho-FAK (Tyr576/577), Src, phospho-Src (Tyr416), ERK1/2, phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), p38, phospho-p38 (Thr180/Tyr182), EGFR or phospho-EGFR (Tyr845/1068) according to manufacturer's instructions. Antibody binding

was detected by chemiluminescence and quantification was achieved by densitometry. All antibodies were purchased from Cell Signalling Technology (Beverly, MA).

Wound healing assay. The procedure was performed as described (8). HPASMC were grown to confluence on glass coverslips and serum-deprived. The cell monolayer was wounded by scraping with a micropipette tip. The injured monolayers were allowed to recover for 6 hours in serum-free medium supplemented with 500 ng/ml of CENP-B. SMC were fixed, permeabilized and stained with rhodamine-phalloidin. Quantitation was performed as described (8). The migration index is defined as the number of cells having migrated under different experimental conditions divided by the number of cells present in the denuded control area in the absence of stimulant, i.e. spontaneous migration.

RT-PCR. Total cellular RNA was isolated from serum-starved HPASMC using TRIzol reagent according to manufacturer's instructions. First strand cDNA was synthesized using oligo(dT) primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON). The cDNA was amplified with primers for CCR3 (5'-TGGCGGTGTTTTTCATTTTC: 3'-CCGGCTCTGCTGTGGAT) and GADPH (5'-GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT: 3'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT). All the primers were synthesized by Alpha DNA (Montreal, Qc). The samples were amplified in a thermal cycler for 35 cycles consisting of denaturation at 94°C, annealing at 59°C and extension at 72°C. The PCR products were resolved on agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Flow cytometry. The procedure was performed as described (8), with minor changes: cells were grown until confluence and serum-deprived. Adherent cells were detached with PBS/0.5% EDTA and washed with PBS. For CCR3 staining, cells were incubated with rat monoclonal anti-CCR3 (R&D systems) in PBS-3% BSA. An irrelevant IgG2a antibody was used as an isotype control. Unbound antibody was removed by washing with PBS, and cells were incubated with PE-conjugated goat anti-rat IgG. CENP-B binding was visualized as described (8). Briefly, cells were incubated with CENP-B (5 μ g/ml), washed with PBS, and incubated with IgG purified from anti-CENP-B-positive SSc sera. IgG binding was revealed with Alexa-Fluor-488-conjugated goat anti-human IgG. Cell permeability was assessed by addition of 7AAD and permeable cells were gated out. Fluorescence was detected on a FACScan and analyzed by Cellquest software (BD Biosciences, San Jose, CA).

Cytokine release. The procedure was performed as described (8), with minor changes: HPASMC were grown in 24-well culture plates until confluence and preincubated with serum-free medium for 24 hours. Cells were incubated or not with several reagents in serum-free medium for 1 hour before being stimulated with 5 μ g/ml of CENP-B for 16 hours at 37°C. The supernatants were collected and cytokine concentrations were determined with human IL-8 ELISA detection kits (R&D Systems) according to manufacturer's instructions. Samples were run in triplicate for each condition.

Antibody purification. Human IgG were purified as previously described (15). Briefly, human IgG were purified from SSc sera by affinity chromatography using NAb

Protein G Spin Chromatography Kits (Pierce, Rockford, IL), according to the manufacturer's instructions and were then transferred into PBS. Depletion of anti-CENP-B antibodies was obtained by repeated passage of whole IgG purified from anti-CENP-B-positive SSc sera on CENP-B-adsorbed nitrocellulose membrane until they had lost their reactivity on purified CENP-B. The efficacy of anti-CENP-B antibodies depletion was controlled by immunoblotting. SSc patients were selected from a French Canadian cohort with SSc diagnosed at the Connective Tissue Diseases and Vascular Medicine Clinics of Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. All patients fulfilled the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) preliminary criteria for the classification of SSc (16, 17). Sera were collected as previously described (15).

Statistical analysis. Student's two-tailed unpaired *t* test was used in all statistical analysis. Statistical tests were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

CENP-B stimulates HPASMC in a $G_{\alpha i}$ -protein dependent manner. Based on the ability of CENP-B to behave as a potent migratory factor for HPASMC (8), and since it has been demonstrated that many chemoattractant autoantigens interact with chemokine receptors (4-7), we first investigated the possibility that CENP-B utilized a chemoattractant $G_{\alpha i}$ G-protein receptor by testing its susceptibility to pertussis toxin (PTX), an inhibitor that uncouples $G_{\alpha i}$ proteins from transmembrane receptors (18). Control and PTX-treated cells were stimulated with CENP-B and the subsequent activation of intracellular signaling cascades and of cell migration were analyzed. Treatment with PTX significantly abrogated the CENP-B-dependent activation of SMCs. Indeed, serum-starved HPASMC pretreated with PTX failed to migrate significantly in response to CENP-B (Figure 1A). Moreover, as clearly seen in Figure 1B, treatment with this inhibitor completely abolished the CENP-B dependent activation of FAK, Src and p38, and reduced by half the phosphorylation level of ERK1/2 after 10 minutes of stimulation, indicating that $G_{\alpha i}$ G-proteins were mediating their activation. Taken together, these data suggest that CENP-B interacts with HPASMC via one or several $G_{\alpha i}$ protein-linked cell surface receptors.

HPASMC express CCR3 mRNA and protein. Since many autoantigens induce leukocyte migration by interacting with chemokine receptors, particularly chemokine receptor 3 (CCR3) (4), we investigated the possibility that CENP-B utilizes this specific chemokine receptor to mediate HPASMC migration and signalization. The expression of

many chemokine receptors by vascular smooth muscle cells is subject to controversy (2, 3, 19). Hence we first determined whether serum-starved HPASMC expressed CCR3 at both mRNA and protein levels, and since CCR3 has been found predominantly on leukocytes, unfractionated human peripheral blood leukocytes were used as positive control (data not shown). RT-PCR was first performed on HPASMC with CCR3 specific primers and yielded a band of the expected size (315 bp) (Figure 2A). The expression of GAPDH was used as a control. No bands were detected when reverse transcriptase was omitted from the reactions. To establish that HPASMC express CCR3 protein, immunoblotting analysis was performed with antibodies to human CCR3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Figure 2B shows a single band at approximately 40 kDa, which corresponds to the expected size of the coding sequence. No band was observed when HRP-conjugated secondary antibody only was used. Surface expression of CCR3 by HPASMC was finally confirmed using flow cytometry (Figure 2C), and revealed a high percentage of cells expressing the receptor. Taken together, our data confirm the presence of CCR3 at the surface of serum-starved HPASMC.

Eotaxin induces down regulation of CCR3 on HPASMC. Following ligand binding to GPCRs, cellular responses are rapidly attenuated. Agonist activation of GPCRs initiates a process called desensitization, which usually involves internalization of the receptor, thus preventing further stimulation of G proteins and downstream signaling pathways (20). Eotaxin is the most potent agonist for CCR3 and it is well known to induce

the internalization of CCR3 from the surface of human eosinophils (21, 22). Based on these last reports, we examined the possibility that eotaxin induces internalization and down regulation of CCR3 from the surface of HPASMC, thereby preventing CENP-B binding and downstream signaling pathways. First, the surface expression of CCR3 following exposure of serum-starved HPASMC to eotaxin was investigated by FACS analysis. As shown in Figure 3A, CCR3 surface expression decreased following stimulation with eotaxin, suggestive of CCR3 down-regulation. Receptor down-regulation by eotaxin was observed to be concentration- and time-dependent (data not shown).

To further confirm that eotaxin induced CCR3 internalization in HPASMC, we performed FACS analysis following (1) ligand exposure at 4°C, which allows ligand binding but prevents receptor internalization and (2) phenylarsine oxide (PAO) exposure, which has widely been used as a general inhibitor of receptor internalization (23). Both treatments prevented eotaxin-induced CCR3 down-regulation (data not shown), thus confirming that eotaxin stimulation induced internalization of CCR3 on serum-deprived HPASMC. Moreover, to demonstrate that this phenomenon was specific for CCR3, the expression of CD51, an unrelated cell surface molecule, was monitored after treatment with eotaxin. The CD51 expression level did not change with eotaxin treatment (data not shown).

CCR3 desensitization prevents CENP-B binding and downstream signaling events. Experiments were undertaken to examine the desensitizing effects of eotaxin on

CENP-B binding, i.e. to determine whether CENP-B interacts directly with CCR3. Serum-starved HPASMC were stimulated with 100 nM eotaxin for 1 hour at 37°C to assess CCR3 internalization and then incubated with CENP-B (5 µg/ml). CENP-B binding was detected with whole IgG purified from anti-CENP-B-positive SSc serum as described (8). As shown in Figure 3A, CCR3 surface expression decreased following stimulation with eotaxin and this desensitization resulted in a reduction of CENP-B binding (dotted line) at the surface of HPASMC when compared to unstimulated cells (solid line).

Desensitization assays with eotaxin were performed to determine whether CENP-B induced migration and phosphorylation events by interacting with CCR3. Internalization of surface CCR3 was induced by incubating serum-starved HPASMC with eotaxin before stimulation with CENP-B. As shown in Figure 3B, the ability of HPASMC to migrate in response to CENP-B was significantly reduced when preexposed to eotaxin ($*P \leq 0.001$ versus untreated cells). Moreover, as clearly seen in Figure 3D, CCR3 desensitization with eotaxin resulted in the loss of FAK, Src and MAP kinase activation following stimulation by CENP-B. Overall, what are shown in Figure 3B and D are not the effect of eotaxin itself, rather it is the absence of effects of CENP-B after eotaxin desensitization, suggesting that CENP-B and eotaxin share a common receptor.

CCR3 antagonist and neutralizing antibody inhibit SMCs activation in response to CENP-B. To further confirm that CENP-B interacts with CCR3, we investigated whether the chemokine antagonist Met-RANTES and the anti-human CCR3

neutralizing antibody could prevent CENP-B-induced activation of HPASMC, by blocking CCR3 signaling. Met-RANTES retains the initiating methionine normally removed from the amino terminus of RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), thus turning into a potent RANTES receptor antagonist (24). Met-RANTES can antagonize the response of cells through chemokine receptor 1 (CCR1), but acts preferentially via CCR5 and CCR3 (25). Serum-starved HPASMC were treated with Met-RANTES or an anti-human CCR3 neutralizing antibody for 1 hour prior to stimulation with CENP-B. As shown in Figure 3B and D, both proteins were able to block CCR3 signalization, as expected, but also to inhibit CENP-B-induced activation of HPASMC. Indeed, both treatments resulted in a significant inhibition of migration (Figure 3B) and an effective inhibition of downstream signalization following stimulation with CENP-B (Figure 3D). Treatment with equal concentrations of an irrelevant isotype-matched antibody had no effect (data not shown). Moreover, since we have previously found that CENP-B binding to HPASMC stimulated the release of IL-8 (8), we next tested the effect of the anti-human CCR3 neutralizing antibody on IL-8 production induced by CENP-B. Again, serum-starved HPASMC were incubated with an anti-CCR3 neutralizing antibody for 1 hour before being stimulated with CENP-B. The cytokine concentration in the cultured supernatant was determined by ELISA and as shown in Figure_3C, this treatment significantly decreased the CENP-B induced release of IL-8, when compared with that of an equal concentration of an irrelevant isotype-matched antibody, suggesting that CENP-B stimulation of IL-8 production is also initiated by engagement of CCR3. Overall, our data

suggest that CENP-B interacts directly with CCR3, and this complex could be the initiator of the subsequent cascade of events leading to migration and stimulation of IL-8 production in HPASMC.

CENP-B induces phosphorylation of EGFR. Several investigators have shown that stimulation with GPCR agonists causes EGFR activation by a RTK transactivation mechanism (10, 12, 13). Our results strongly suggest that CENP-B bound to the surface of HPASMC via CCR3. Since it has been recently reported that the EGFR can be transactivated through CCR3 in bronchial epithelial cells (10), we therefore examined the involvement of EGFR in CENP-B signaling in HPASMC. Activation of the EGFR was studied using phospho-specific antibodies to EGFR phosphorylation at Tyr1068, which has been reported to be mediated by autophosphorylation, and at Tyr845, which is implicated in stabilizing the activation loop and maintaining the enzyme in an active state. As shown in Figure 4A, CENP-B treatment induced tyrosine phosphorylation of EGFR at both phosphorylation sites, in a time-dependent manner. Indeed, time course analyses revealed that CENP-B exerted a maximum effect on EGFR phosphorylation after 2 minutes of treatment the level of which declined thereafter.

EGFR inactivation inhibits CENP-B-mediated MAP kinase activation. The EGFR is a family of receptor tyrosine kinases that propagate signals via the MAP-kinase pathway (26). Therefore, to investigate the role of EGFR in CENP-B signaling, we studied

downstream effectors of active EGFR such as ERK1/2 and p38 MAPK. After pretreatment with tyrohostin AG1478, a selective EGFR inhibitor, or PTX, HPASMC were stimulated with CENP-B for 5 minutes followed by immunoblotting with phospho-specific antibodies. As shown in Figure 4B, AG1478 completely inhibited tyrosine phosphorylation of EGFR in response to CENP-B stimulation and abrogated the CENP-B-induced phosphorylation of both ERK1/2 and p38 MAP kinase. As expected, PTX strongly attenuated CENP-B stimulated EGFR and downstream MAP kinases phosphorylation (Figure 4B), suggesting that EGFR and downstream kinase activation are dependent on $G_{\alpha i}$ -mediated signaling and that CENP-B did not interact directly with the EGFR.

Recently, the mechanism of EGFR transactivation via several GPCRs has been shown to involve proteolytic cleavage by metalloproteases (MMPs), called ecto-domain shedding, of a membrane anchored EGF ligand precursor, such as HB-EGF, to release a biologically active growth factor (14). To examine the mechanism through which CENP-B induces EGFR activation, HPASMC were pretreated with either GM6001, a broad spectrum MMP inhibitor, or a HB-EGF neutralizing antibody for 1 hour before being stimulated with CENP-B. CENP-B treatment enhanced the phosphorylation of EGFR at Tyr845 as well as p38 and ERK1/2, and as shown in Figure 4C, these phosphorylation events were clearly abrogated by GM6001 treatment. Since GM6001 is a specific inhibitor of MMPs, these results indicate that MMPs play an important role in CENP-B-stimulated EGFR activation and downstream signalization. To determine whether HB-EGF shedding is involved in the transactivation of EGFR, the effect of a HB-EGF neutralizing antibody

was examined. Pretreatment with this antibody, which specifically prevents binding of HB-EGF to the EGFR, almost completely inhibited CENP-B induced EGFR transactivation in HPASMC, thus preventing further MAP kinase phosphorylation (Figure 4C). Taken together, these data strongly suggest that processing of HB-EGF as a cell-associated ligand by a GM6001-sensitive MMP is an essential component for the EGFR transactivation and subsequent MAP kinase activation induced by CENP-B in cultured HPASMC.

Effect of EGFR inactivation on cytokine secretion. Since we have previously found that CENP-B binding to HPASMC stimulated the release of IL-8 and IL-6 (8), we next tested the functional relevance of EGFR in cytokine production induced by CENP-B. Serum-starved HPASMC were incubated either with AG1478, GM6001, or a HB-EGF neutralizing antibody for 1 hour before being stimulated with CENP-B for an additional 16 hours in serum-free medium. The cytokine concentration in the cultured supernatant was determined by ELISA. As show in Figure 4D, all three treatments significantly inhibited IL-8 secretion by HPASMC, suggesting that the EGFR transactivation through a MMP-dependent pathway is necessary for the cytokine secretion induced by CENP-B. Similar results were obtained for IL-6 (data not shown).

Anti-CENP-B autoantibodies block the release of IL-8 induced by CENP-B.

Finally, we evaluated the effects of CENP-B/anti-CENP-B immune complexes on CENP-B-induced IL-8 release. CENP-B was incubated with whole IgG purified from anti-CENP-

B-positive SSc sera or with IgG purified from normal sera before being added to serum-starved HPASMC. As shown in Figure 5A, the CENP-B/anti-CENP-B immune complexes, but not CENP-B/normal IgG complexes, significantly blocked the release of IL-8 normally induced by CENP-B. These results were obtained with IgG purified from all four anti-CENP-B-positive SSc sera tested. Neither IgG from two anti-CENP-B-negative SSc sera (data not shown) nor from two normal sera (Figure 5A) had any effect on the release of IL-8 induced by CENP-B.

To determine whether the observed inhibition was due to the presence of anti-CENP-B antibodies in whole IgG purified from anti-CENP-B-positive SSc sera, anti-CENP-B antibody depletion was performed. The efficacy of anti-CENP-B depletion was first controlled by immunoblotting on purified CENP-B. As shown in Figure 5B, all of the anti-CENP-B depleted IgG tested had lost their reactivity on CENP-B when compared with that of their corresponding whole IgG. We next compared in parallel the effects of these two groups of IgG on IL-8 secretion induced by CENP-B. Again, the presence of anti-CENP-B antibodies strongly inhibited the CENP-B induced release of IL-8 (Figure 5C). However, depletion of anti-CENP-B antibodies in all four IgG preparations strongly diminished the inhibition observed in the presence of anti-CENP-B (Figure 5C), giving rise to levels of IL-8 secretion that did not differ statistically from those of CENP-B-treated cells (data not shown). Taken together, these data strongly suggest that anti-CENP-B autoantibodies abolished the effects of CENP-B on IL-8 secretion.

DISCUSSION

We have previously found that the nuclear autoantigen CENP-B, specifically targeted by autoantibodies in the limited cutaneous form of SSc, behaved as a potent migratory factor for HPASMC (8). Other *in vitro* studies have demonstrated that several autoantigens induced cell migration by interacting with various chemokine receptors (4-7). Our present findings support the view that CENP-B can be added to this set of molecules. Here, we report several lines of evidence indicating that CENP-B, which has no obvious primary or secondary structural homology to chemokines, induced SMC activation by interacting with CCR3. Moreover, the present study clearly demonstrates the involvement of EGFR in CENP-B signaling leading to IL-8 secretion. These findings provide new insights into the activities of CENP-B and indicate that this molecule has more functions than earlier envisaged.

CCR3, a member of the CC chemokine family of GPCRs, has been found predominantly on leukocytes (27-30). However, several reports have demonstrated that CCR3 is also present on non-leukocyte derived cells (19, 31, 32) and the present study provides further evidence that CCR3 has a broad spectrum of expression, since we described its presence in HPASMC. Moreover, it was shown that eotaxin induced internalization and down regulation of CCR3 from the surface of these cells, thereby preventing CENP-B binding, downstream phosphorylation events and cell migration. The CCR3 desensitization assays performed in the current study suggest that CENP-B and

eotaxin share a common receptor and that CENP-B can be added to the list of CCR3 agonists in HPASMC.

Figure 6 depicts a simplified signaling schematic, based on the series of experiments described in this study as well as in our previous study (8). Overall, our data support the view that the primary role of extracellularly-released autoantigens is to alert the immune system to danger signals from invaded and damaged tissues, in order to facilitate repair and restore homeostasis. Normal wound healing is a complex and finely tuned process that is mediated by several growth factors and cytokines. Indeed, in response to vascular injury, endothelial cells (EC) produce a wide spectrum of molecules that can lead to phenotypic modulation of SMCs and their acquisition of characteristics that can contribute to the initiation, progression and cessation of wound repair processes (33, 34). The data presented earlier suggested that CENP-B was one of these mediators. Indeed, as we have shown, CENP-B molecules can originate from apoptotic EC, and, since CENP-B has a specific affinity for HPASMC surfaces, it could readily bind to nearby SMC (8). Moreover, the present study strongly suggests that CENP-B interacts with HPASMC via CCR3. CCR3 subsequently activates MMPs, which in turn release an EGFR ligand, such as HB-EGF, that activates the EGFR. These data line up with several studies showing that stimulation of GPCRs can transactivate EGFR and lead to MAP kinase activation (10, 35) in an EGF-independent fashion called the “triple-membrane-passing-signals” mechanism (14). Subsequently, this chain of events could lead to the induction of a migratory and pro-inflammatory SMC phenotype and to a rapid and localized mobilization of SMC, thus

contributing to the initiation of wound repair processes (Figure 6, left panel). Overall, our data suggest that CENP-B has all the hallmarks of a bifunctional molecule that participates in normal mechanisms in which SMCs are particularly involved.

The question can now be raised as to the role of CENP-B and, most importantly, of its link with anti-CENP-B autoantibodies in the pathophysiology of SSc. In the present study, we show that the presence of anti-CENP-B autoantibodies abolished the effects of CENP-B on IL-8 production, thus preventing CENP-B from transactivating EGFR and exerting its cytokine-like activities towards vascular SMCs. Based on these findings, we can speculate that CENP-B/anti-CENP-B immune complexes could perturb and/or prevent the normal tissue repair processes in which CENP-B is involved, thus leading to a state of unremitting vascular remodeling, i.e. conditions that adversely affect the normal completion and cessation of the repair processes (Figure 6, right panel). This hypothesis would be in line with suggestions that the SSc pathophysiological process resembles an incomplete and ever-ongoing repair process (36). Thus, the presence of anti-CENP-B in SSc patients would be directly associated with vascular damage and directly contribute to the pathogenesis of vasculopathy in limited cutaneous SSc. This hypothesis is supported by the fact that anti-CENP-B autoantibodies are associated with a more vascular phenotype, featuring notably isolated pulmonary arterial hypertension and severe digital ischemia (37-39).

Over the past decade, many studies have documented the tight correlation that exists between autoantibody specificities and unique clinical phenotypes in SSc (40-42).

However, the issue as to whether these autoantibodies play a direct pathogenic role or merely represent markers of particular disease manifestations has not been elucidated. Our recent findings shed new light on the potential link of CENP-B with anti-CENP-B autoantibodies in SSc pathogenesis: anti-CENP-B could drive the disease toward a more severe vascular phenotype. Further studies are clearly necessary to gain a better understanding of the pathogenic role of anti-CENP-B in patients with limited cutaneous SSc as well as new insights for therapeutic intervention.

REFERENCES

1. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007;25:787-820.
2. Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, Smith G, Paterson JR, Earnshaw JJ, et al. Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:397-403.
3. Schecter AD, Calderon TM, Berman AB, McManus CM, Fallon JT, Rossikhina M, et al. Human vascular smooth muscle cells possess functional CCR5. *J Biol Chem* 2000;275:5466-71.
4. Howard OZ. Autoantigen signalling through chemokine receptors. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:642-6.
5. Oppenheim JJ, Dong HF, Plotz P, Caspi RR, Dykstra M, Pierce S, et al. Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J Leukoc Biol* 2005;77:854-61.
6. Howard OM, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med* 2002;196:781-91.
7. Howard OM, Dong HF, Su SB, Caspi RR, Chen X, Plotz P, et al. Autoantigens signal through chemokine receptors: uveitis antigens induce CXCR3- and CXCR5-expressing lymphocytes and immature dendritic cells to migrate. *Blood* 2005;105:4207-14.

8. Robitaille G, Henault J, Christin MS, Senecal JL, Raymond Y. The nuclear autoantigen CENP-B displays cytokine-like activities toward vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum* 2007;56:3814-26.
9. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996;379:557-60.
10. Adachi T, Cui CH, Kanda A, Kayaba H, Ohta K, Chihara J. Activation of epidermal growth factor receptor via CCR3 in bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:292-6.
11. Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T. Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem* 2001;276:7957-62.
12. Yang X, Zhu MJ, Sreejayan N, Ren J, Du M. Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells* 2005;20:263-70.
13. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:408-12.
14. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999;402:884-8.
15. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-

- topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006;54:963-73.
16. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR, 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)* 2002;81:154-67.
 17. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90.
 18. Fields TA, Casey PJ. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* 1997;321 (Pt 3):561-71.
 19. Kodali RB, Kim WJ, Galaria, II, Miller C, Schechter AD, Lira SA, et al. CCL11 (Eotaxin) induces CCR3-dependent smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1211-6.
 20. Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:637-58.
 21. Zimmermann N, Conkright JJ, Rothenberg ME. CC chemokine receptor-3 undergoes prolonged ligand-induced internalization. *J Biol Chem* 1999;274:12611-8.
 22. Sabroe I, Jorritsma A, Stubbs VE, Xanthou G, Jopling LA, Ponath PD, et al. The carboxyl terminus of the chemokine receptor CCR3 contains distinct domains which regulate chemotactic signaling and receptor down-regulation in a ligand-dependent manner. *Eur J Immunol* 2005;35:1301-10.

23. Hertel C, Coulter SJ, Perkins JP. A comparison of catecholamine-induced internalization of beta-adrenergic receptors and receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor in human astrocytoma cells. Inhibition by phenylarsine oxide. *J Biol Chem* 1985;260:12547-53.
24. Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, et al. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* 1996;271:2599-603.
25. Elsner J, Petering H, Hochstetter R, Kimmig D, Wells TN, Kapp A, et al. The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3. *Eur J Immunol* 1997;27:2892-8.
26. Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:177-83.
27. Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1997;99:178-84.
28. Ugucioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhis S, LaRosa GJ, et al. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 1997;100:1137-43.
29. Beaulieu S, Robbiani DF, Du X, Rodrigues E, Ignatius R, Wei Y, et al. Expression of a functional eotaxin (CC chemokine ligand 11) receptor CCR3 by human dendritic cells. *J Immunol* 2002;169:2925-36.

30. Franz-Bacon K, Dairaghi DJ, Boehme SA, Sullivan SK, Schall TJ, Conlon PJ, et al. Human thymocytes express CCR-3 and are activated by eotaxin. *Blood* 1999;93:3233-40.
31. Stellato C, Brummet ME, Plitt JR, Shahabuddin S, Barody FM, Liu MC, et al. Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2001;166:1457-61.
32. Wakugawa M, Nakamura K, Akatsuka M, Kim SS, Yamada Y, Kawasaki H, et al. Expression of CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes in vivo and in vitro--upregulation by RANTES. *J Dermatol Sci* 2001;25:229-35.
33. Jeffery TK, Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;45:173-202.
34. Stenmark KR, Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 1997;59:89-144.
35. Cussac D, Schaak S, Denis C, Paris H. alpha 2B-adrenergic receptor activates MAPK via a pathway involving arachidonic acid metabolism, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 2002;277:19882-8.
36. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Current concepts in normal and defective angiogenesis: implications for systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2007;9:173-9.
37. Salerni R, Rodnan GP, Leon DF, Shaver JA. Pulmonary hypertension in the CREST syndrome variant of progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Intern Med* 1977;86:394-9.

38. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA, Jr. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003;48:203-9.
39. Steen VD. Epidemiology and classification of scleroderma. In: Hochberg MA, Silman AJ, Smolens JS, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. *Rheumatology*. 4th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008. p.1361-7.
40. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:778-84.
41. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:35-42.
42. Boin F, Rosen A. Autoimmunity in systemic sclerosis: current concepts. *Curr Rheumatol Rep* 2007;9:165-72.

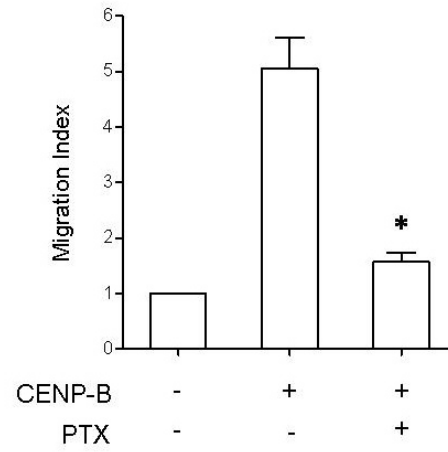
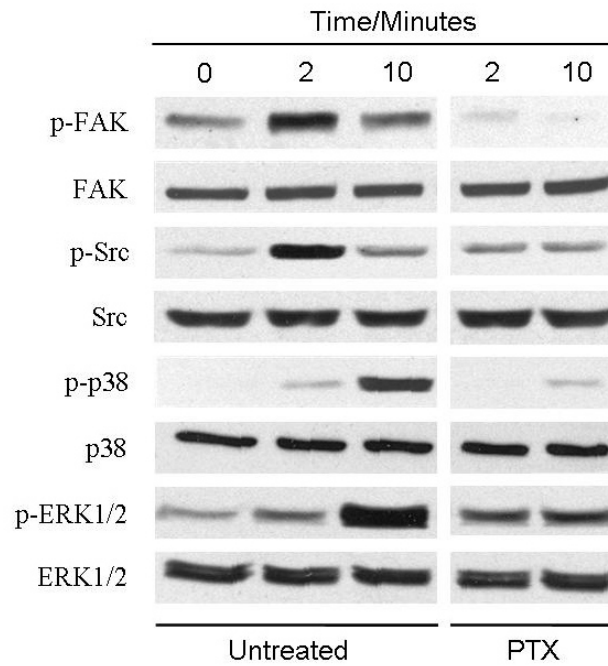
A**B**

Figure 1. CENP-B stimulates HPASMC in a $G_{\alpha i}$ -protein dependent manner. **A**, Serum-starved SMCs were pretreated with pertussis toxin (100 ng/ml) for 16 hours prior to wound

healing assay. Scraped monolayers of SMCs were then incubated with CENP-B (500 ng/ml) in serum-free medium. After 6 hours, migrating cells were photographed and the stained nuclei of SMC that had migrated into the wound were counted. Results are expressed as the mean and SEM of 4 fields per coverslip, and are representative of 3 independent experiments. *, $P \leq 0.005$ versus untreated cells. **B**, Serum-starved HPASMC were incubated or not with pertussis toxin (100 ng/ml) for 16 hours prior to CENP-B (100 ng/ml) stimulation for the indicated periods of time. Whole cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated phospho-specific (upper panel) and corresponding pan-specific antibodies (lower panel). Results shown are representative of 3 independent experiments.

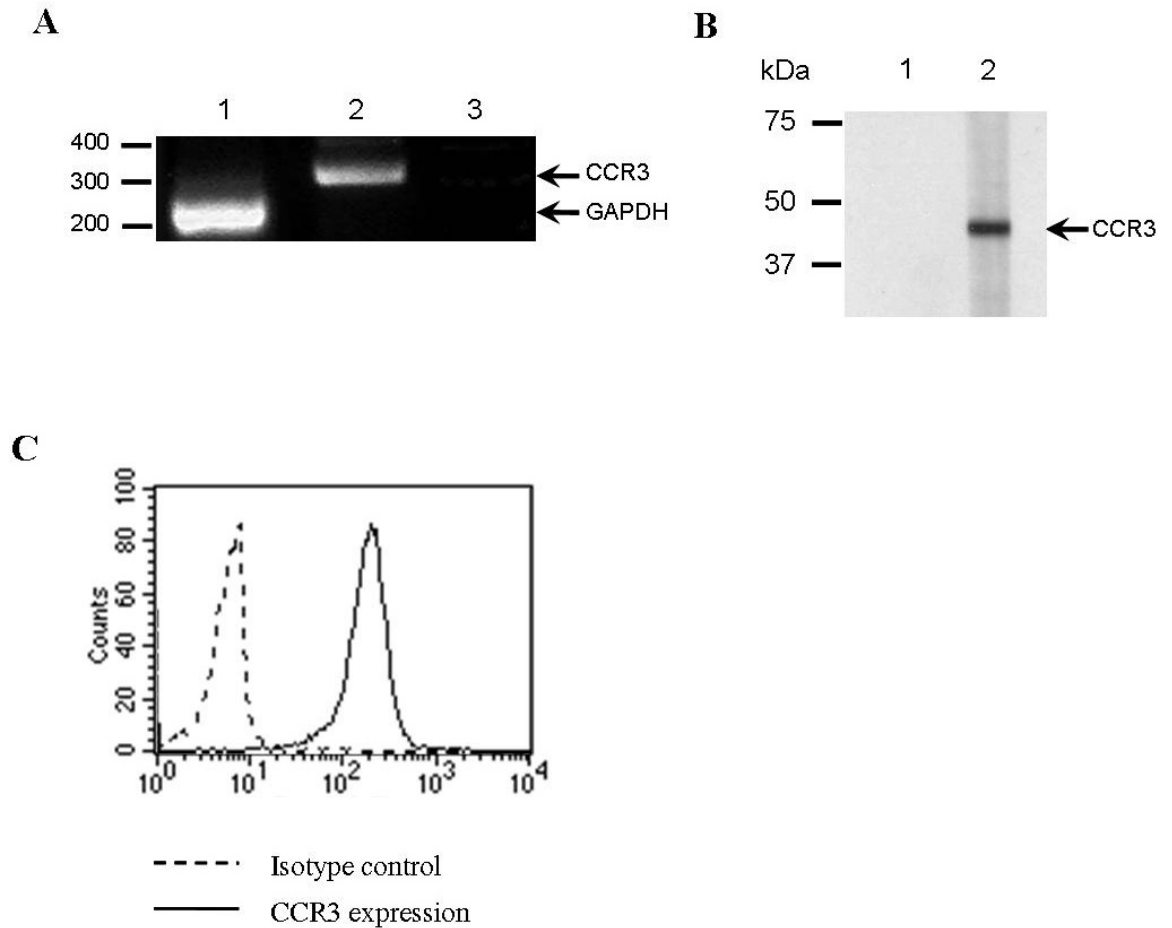


Figure 2. Detection of CCR3 expression in HPASMC. **A**, Analysis of CCR3 mRNA by RT-PCR. Total RNA from serum-starved HPASMC were amplified using a primer pair specific for 315-bp fragment derived from the human CCR3 cDNA (lane 2). In lane 1, GAPDH (235 bp) was used as a housekeeping probe and in lane 3, the reverse transcriptase was omitted. **B**, Determination of CCR3 protein production by immunoblotting. Whole cell lysates were sonicated and clarified by centrifugation. The soluble fractions collected in the supernatant were resolved on 10% SDS-PAGE and immunoblotted with a rabbit polyclonal

antibody to CCR3 (lane 2). In lane 1, HRP-conjugated secondary antibody was used as negative control. **C**, Determination of CCR3 surface expression in serum-starved HPASMC using flow cytometry. Cells were labelled with monoclonal anti-CCR3 antibody (solid line) or an isotype-matched control mAb (dotted line). The experiments shown are representative of 3 similar experiments.

Figure 3. CCR3 down regulation affects CENP-B binding and downstream signaling pathways. **A**, Shown are results of flow cytometry analysis of CCR3 cell surface expression (left panel) and CENP-B binding (right panel) using anti-CCR3 mAb and IgG purified from anti-CENP-B-positive SSc sera, respectively. The number of positive intact cells versus fluorescence intensity is presented. Controls were incubated with an isotype matched control (left panel) or with secondary antibody alone (right panel) and are depicted as dashed lines. CCR3 expression and CENP-B binding without eotaxin stimulation are represented as solid lines and after stimulation with 100 nM eotaxin for 1 hour at 37°C as dotted lines. **B**, **C** and **D**, Serum-starved HPASMCs were pretreated with eotaxin (100 nM), Met-RANTES (150 nM) or anti-human CCR3 neutralizing antibody (1 µg/ml) for 1 hour at 37°C in serum-free medium prior to stimulation with 500 ng/ml CENP-B for 6 hours in a wound healing assay (**B**), with 5 µg/ml CENP-B for 16 hours in cytokine release assays (**C**) or with 100 ng/ml CENP-B in phosphorylation assays (**D**). In **B**, results are expressed as the mean and SEM of 4 fields per coverslip, and a representative experiment is shown. * $P \leq 0.015$, ** $P \leq 0.014$, *** $P \leq 0.001$ versus untreated cells. In **C**, Samples were run in triplicate for each condition, results are expressed as mean \pm SEM and a representative experiment is shown. * $P \leq 0.0021$ versus CENP-B-treated cells. In **D**, results shown are representative of 3 independent experiments.

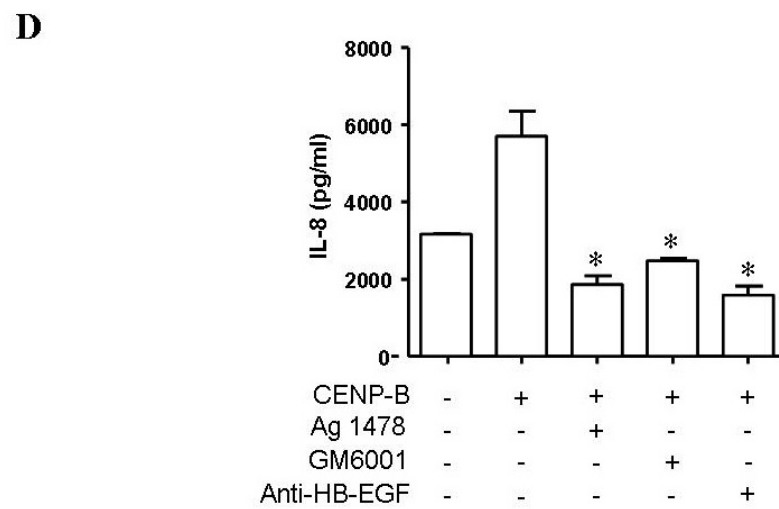
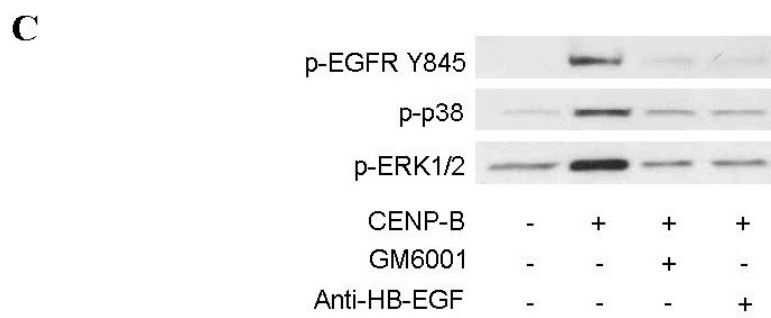
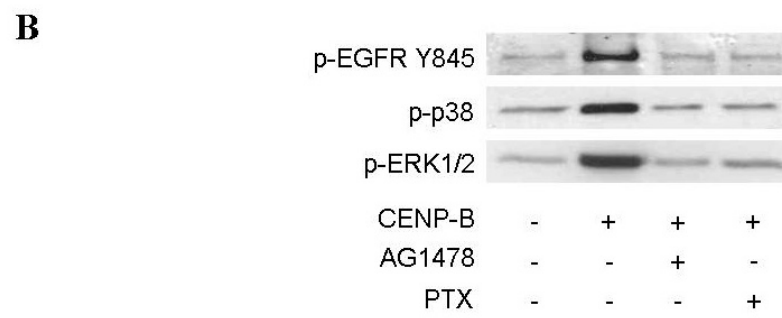
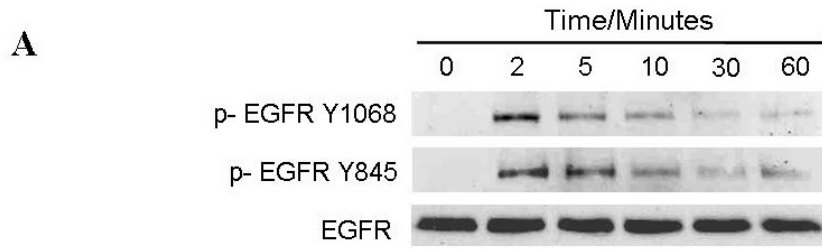
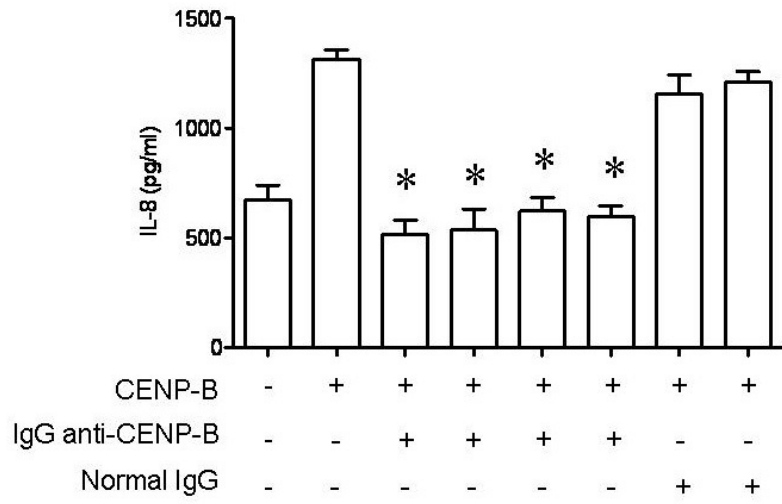
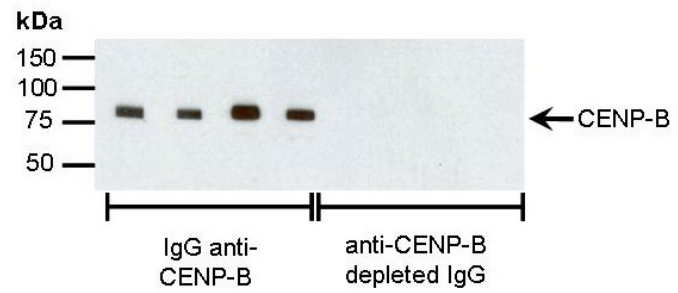


Figure 4. CENP-B induces transactivation of the EGFR in HPASMC. **A**, CENP-B induces tyrosine phosphorylation of EGFR. Serum-deprived HPASMC were stimulated with CENP-B (100 ng/ml) for the indicated periods of time. Whole cell lysates were separated by electrophoresis and immunoblotted with anti-phospho-EGFR and corresponding pan-specific antibodies. **B** and **C**, Serum-deprived HPASMC were preincubated with AG1478 (100 nM), PTX (100 ng/ml), GM6001 (20 μ M) or HB-EGF neutralizing antibody (6 μ g/ml) for 1 hour prior to stimulation with 100 ng/ml CENP-B for 5 minutes. Whole cell lysates were separated by electrophoresis and immunoblotted with the indicated phospho-specific antibodies. **D**, Effect of inhibition of EGFR activation on IL-8 production. Serum-deprived HPASMC were preincubated with AG1478 (100 nM), PTX (100 ng/ml), GM6001 (20 μ M) or HB-EGF neutralizing antibody (6 μ g/ml) for 1 hour prior to stimulation with 5 μ g/ml CENP-B for an additional 16 hours in serum-free medium. The IL-8 concentration in the supernatant was measured using human ELISA kit. Samples were run in triplicate for each condition. Results are expressed as the mean and SEM, and are representative of 3 independent experiments. * = $P \leq 0.05$ versus untreated cells.

A



B



C

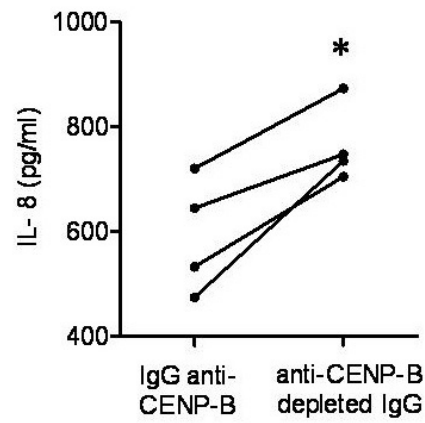


Figure 5. Effect of anti-CENP-B antibodies on CENP-B-induced cytokine release. HPASMCs were grown in 24-well culture plates until confluence and preincubated with serum-free medium for 24 hours. **A**, CENP-B (5 $\mu\text{g/ml}$) were preincubated with 100 ng/ml IgG purified from anti-CENP-B-positive SSc sera ($n = 4$) or with IgG purified from normal sera ($n = 2$) for 30 minutes at room temperature before being added to HPASMC for an additional 16 hours in serum-free medium. The supernatants were collected and IL-8 concentrations were determined using a human ELISA kit. Samples were run in triplicate for each condition and results are expressed as mean \pm SEM optical density (OD) and are representative of 3 independent experiments. **B**, The efficacy of anti-CENP-B depletion was evaluated by immunoblotting on purified CENP-B. **C**, Comparison of the effects of whole anti-CENP-B IgG with corresponding anti-CENP-B-depleted IgG on CENP-B induced IL-8 secretion, assayed as described above. Each point represents the mean of triplicates for each individual IgG preparation ($n = 4$). * = $P \leq 0.05$ versus CENP-B-treated cells in **A**; * = $P \leq 0.05$ versus whole anti-CENP-B IgG in **B**.

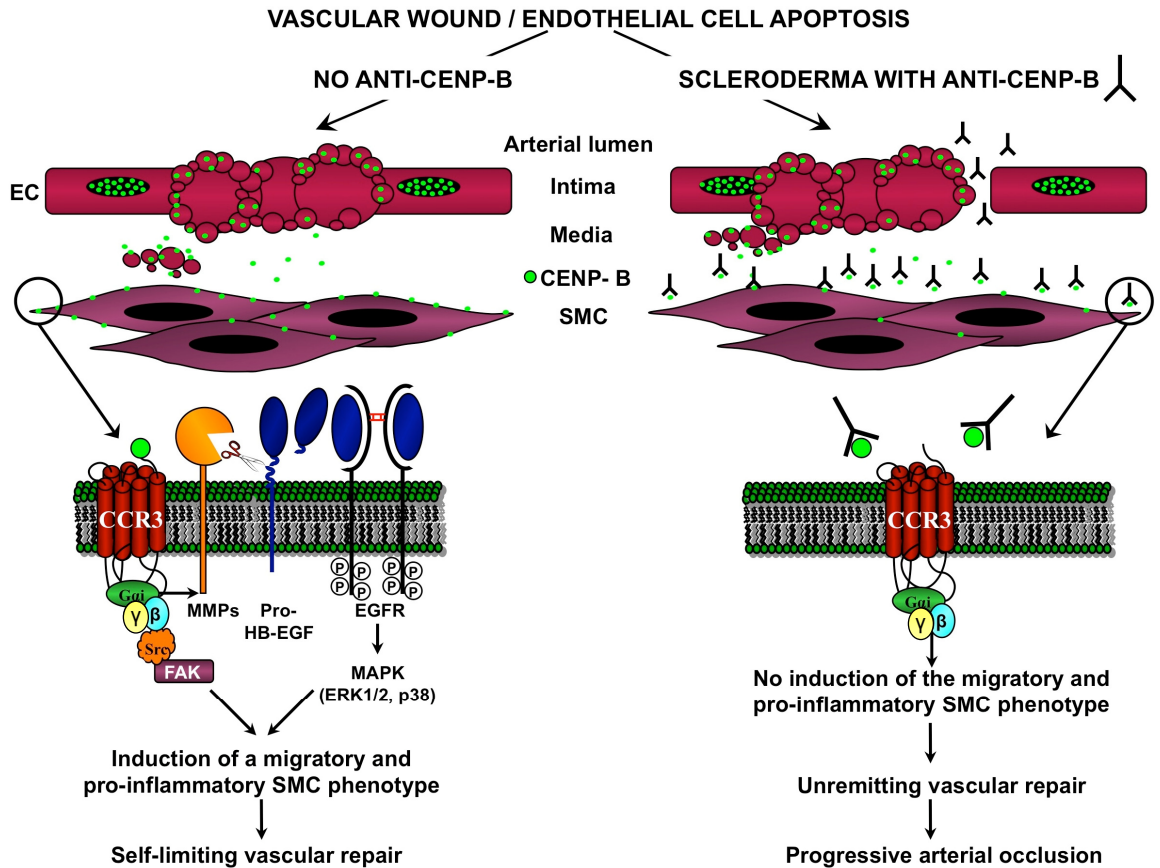


Figure 6. Proposed signaling mechanism illustrating the physiological role of CENP-B in vascular smooth muscle cells (SMC) as contributing to the initiation of wound repair processes (left panel) and its perturbation by anti-CENP-B autoantibodies (right panel). CENP-B/anti-CENP-B immune complexes could perturb and/or prevent the normal tissue repair processes where CENP-B is involved, thus leading to a state of unremitting vascular repair and subsequently the progression of arterial occlusion. EC, endothelial cells.

Discussion générale

La présence d'auto-anticorps dans la ScS est universelle et la majorité d'entre-eux sont hautement spécifiques à la maladie (121). La plupart reconnaissent des auto-antigènes intra-nucléaires et certains sont associés de manière spécifique à différents profils cliniques de la maladie. Bien que la valeur diagnostique et pronostique des auto-anticorps soit maintenant clairement établie, leur rôle dans la pathogénèse de la maladie reste encore aujourd'hui un sujet de controverse et plusieurs études ont été entreprises afin d'élucider leur rôle exact dans le développement de la ScS (193, 262), mais qu'en est-il au juste du rôle des auto-antigènes? Serait-il possible que certains des antigènes intra-nucléaires ciblés lors de la ScS aient un rôle à jouer dans la pathogénèse de la maladie ou dans le développement de certaines des manifestations cliniques qui y sont associées?

Plusieurs études ont récemment démontré que certains auto-antigènes associés aux MAI possèdent des fonctions biologiques additionnelles lorsqu'ils se retrouvent dans le milieu extracellulaire (219, 220, 238, 240, 242). En effet, il a été démontré qu'une fois libérés par nécrose ou apoptose, certains auto-antigènes adoptent une activité biologique qui s'apparente à celle des cytokines. Certains d'entre eux peuvent ainsi provoquer l'activation et la migration de plusieurs types cellulaires et participer aux processus normaux de réparation de blessure et/ou acquérir une activité pathogène qui pourrait contribuer au développement de certaines MAI. Ces études viennent donc remettre en question le rôle uniquement passif des auto-antigènes, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives quant à leur implication dans l'initiation et le développement de certains

processus physiologiques ainsi que dans celui des MAI ou des manifestations cliniques associées.

La CENP-B est l'un des principaux auto-antigènes intra-nucléaires ciblés au cours de la ScS et les auto-anticorps anti-CENP-B sont fortement associés à la forme limitée de la maladie ainsi qu'au développement de manifestations vasculaires telles que les ulcérations digitales et l'HTAP (4, 263-265). Ces pathologies résultent, en partie, de l'occlusion progressive des vaisseaux suite à une hyperactivation des CMLV. Notre étude a donc été entreprise dans le but d'évaluer le rôle et l'implication possible de l'auto-antigène CENP-B dans le développement des manifestations vasculaires qui sont fréquemment observées chez des patients sclérodermiques anti-centromère positifs.

Rôle de la CENP-B dans l'activation des CMLV

La première partie de l'étude (**article no.1**) avait donc pour but d'examiner les effets biologiques de la protéine CENP-B sur l'activation des CML de l'artère pulmonaire humaine afin d'évaluer son implication potentielle dans le remodelage vasculaire, observé au cours de l'HTAP. Ainsi, nous avons démontré que la CENP-B exogène pouvait se lier de manière spécifique à la surface des CML non-perméabilisées et ce, de manière préférentielle aux CML présentant un phénotype contractile. En plus de provoquer la migration des CMLV *in vitro*, la liaison de la CENP-B à la surface des cellules pouvait induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de types Th2, telles que l'IL-6 et l'IL-8. Une fois relâchées dans le milieu, ces cytokines pourraient alors, *in vivo*, initier une

réponse inflammatoire et amplifier les phénomènes de migration et de prolifération cellulaires.

La migration et la prolifération des CML dans l'intima artériel sont des étapes clefs dans les processus de réparation de blessures ainsi que dans le développement de pathologies vasculaires comme l'HTAP. Chez l'adulte, la fonction majeure des CML de la paroi artérielle est d'assurer le tonus vasculaire grâce à leurs propriétés contractiles et élastiques. L'acquisition de ces fonctions se fait au cours de la période embryonnaire, durant laquelle les cellules musculaires synthétiques se différencient pour devenir matures et contractiles. Cependant, certaines pathologies vasculaires peuvent engendrer une modulation phénotypique des CMLV, qui migrent alors de la media vers l'intima, prolifèrent et sécrètent glycoprotéines, protéoglycannes, facteurs de croissance et cytokines pro-inflammatoires. A titre d'exemple, les facteurs de croissance tels que le PDGF-BB et le fibroblast growth factor basique (FGFb) induisent la migration et la prolifération des CMLV, en empruntant diverses voies de signalisation, dont la cascade des MAP kinases. Ainsi, selon les résultats obtenus au cours de cette étude, il serait possible d'ajouter la CENP-B à cette liste de molécules puisqu'elle semble elle aussi, participer au développement d'un phénotype migratoire et pro-inflammatoire des CMLV.

La CENP-B est une protéine intra-nucléaire, qui possède un domaine de liaison à l'ADN et qui est localisée exclusivement dans l'hétérochromatine (203). Normalement, la CENP-B n'est donc pas présente à la surface cellulaire. Toutefois, au cours de l'apoptose des CE, la CENP-B est redistribuée à l'intérieur des corps apoptotiques et se dissocie de

l'ADN (article no.1, Fig. 6A). De plus, nos résultats ont démontré que, dans des cas d'apoptose tardive, la CENP-B est également relâchée dans le milieu extracellulaire (article no.1, Fig. 6B). En conditions physiologiques, il est donc possible que la CENP-B puisse être présente dans le milieu *in vivo*. Ce résultat est d'un grand intérêt puisque l'apoptose des CE est l'un des évènements les plus précoces détectés dans plusieurs situations pathologiques y compris l'HTAP (266-268) et la ScS (89, 269, 270).

La seconde partie de l'étude (**article no.2**) s'adressait plus particulièrement à l'identification du déterminant membranaire ciblé par la CENP-B à la surface des CMLV. Les résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent fortement que la CENP-B active les CMLV en interagissant avec le récepteur de chémokine 3 (CCR3) et ce, malgré l'absence complète d'homologie de séquence avec le ligand naturel, l'éotaxine-1. Cette étude démontre aussi clairement l'implication du récepteur de l'EGF dans la signalisation de la CENP-B conduisant à la sécrétion d'IL-8 et d'IL-6.

Le récepteur CCR3 fait partie de la grande famille des RCPG et est généralement exprimé à la surface des leucocytes tels que les éosinophiles (271), les basophiles (272), les CD immatures (273) et les LT de type Th2 (274). Toutefois, plusieurs études récentes ont démontré que le CCR3 pouvait également être exprimé à la surface des cellules épithéliales (275), des kératinocytes (72) et des CMLV de souris (276). Les résultats obtenus lors de notre étude permettent également d'ajouter les CML de l'artère pulmonaire humaine à la liste des cellules non-hématopoïétiques exprimant le CCR3. De plus, des études de signalisation intracellulaire effectuées à l'aide de plusieurs inhibiteurs spécifiques ainsi que

des études de désensibilisation nous ont permis d'identifier le CCR3 comme étant le récepteur de la CENP-B. Par conséquent, la CENP-B peut donc être considérée comme un nouvel agoniste du CCR3 au niveau des CMLV. Ces observations sont en accord avec d'autres études qui démontrent l'interaction de plusieurs auto-antigènes avec des récepteurs de chémokines (220, 221).

D'autres études ont également démontré qu'une fois activés par leur ligand, plusieurs récepteurs de chémokines, dont le CCR3, peuvent induire l'activation du récepteur de l'EGF via un mécanisme EGF-indépendant (246-248). Ce modèle, dit de transactivation extracellulaire, fait intervenir des protéines intermédiaires comme certains membres de la famille des MMPs capables de libérer les ligands physiologiques du récepteur de l'EGF tels que l'HB-EGF, le TGF- α ou l'amphiréguline à partir de leurs proformes inactives. Les ligands ainsi libérés dans le milieu peuvent ensuite activer le récepteur de l'EGF qui peut, à son tour, activer différentes voies de signalisation intracellulaire comme la voie des MAPK (252). Puisque nos résultats suggèrent fortement que la CENP-B interagit avec le CCR3, nous avons donc examiné l'implication du récepteur de l'EGF dans la signalisation induite par la CENP-B. Les résultats obtenus démontrent clairement que la CENP-B entraîne une transactivation très rapide du récepteur de l'EGF selon un mécanisme métalloprotéase-dépendant qui implique le largage du HB-EGF. Nous avons aussi démontré que cette transactivation est un signal essentiel dans l'activation de la voie des MAPK qui mène ultérieurement à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, suite à l'action de la CENP-B.

Jusqu'à présent, nos données soutiennent donc l'hypothèse du rôle primaire des auto-antigènes dans la mobilisation du système immunitaire face aux signaux de danger provenant de tissus endommagés afin de faciliter la réparation de blessures et la restauration de l'homéostasie tissulaire et vasculaire (242, 277). La réparation de blessures est un phénomène extrêmement complexe qui est finement régulé par plusieurs cytokines et facteurs de croissance. En effet, suite à une insulte vasculaire, les CE produisent un large éventail de molécules qui peuvent interagir avec les CMLV et participer à leur modulation phénotypique ainsi qu'à l'acquisition de caractéristiques qui peuvent contribuer aux processus normaux de réparation de blessures mais aussi, dans certains cas, au développement de pathologies vasculaires (268, 278). La CENP-B peut donc être considérée comme étant l'un de ces médiateurs. Il est donc possible que la CENP-B, relâchée par des CE en apoptose, puisse se lier aux CMLV avoisinantes via le CCR3 pour ensuite provoquer la transactivation du récepteur de l'EGF, la migration cellulaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires. Cette chaîne d'événements pourrait ensuite conduire à une mobilisation rapide et localisée des CMLV dans l'intima artérielle, contribuant ainsi aux processus normaux de réparation de blessures vasculaires (Fig. 6).

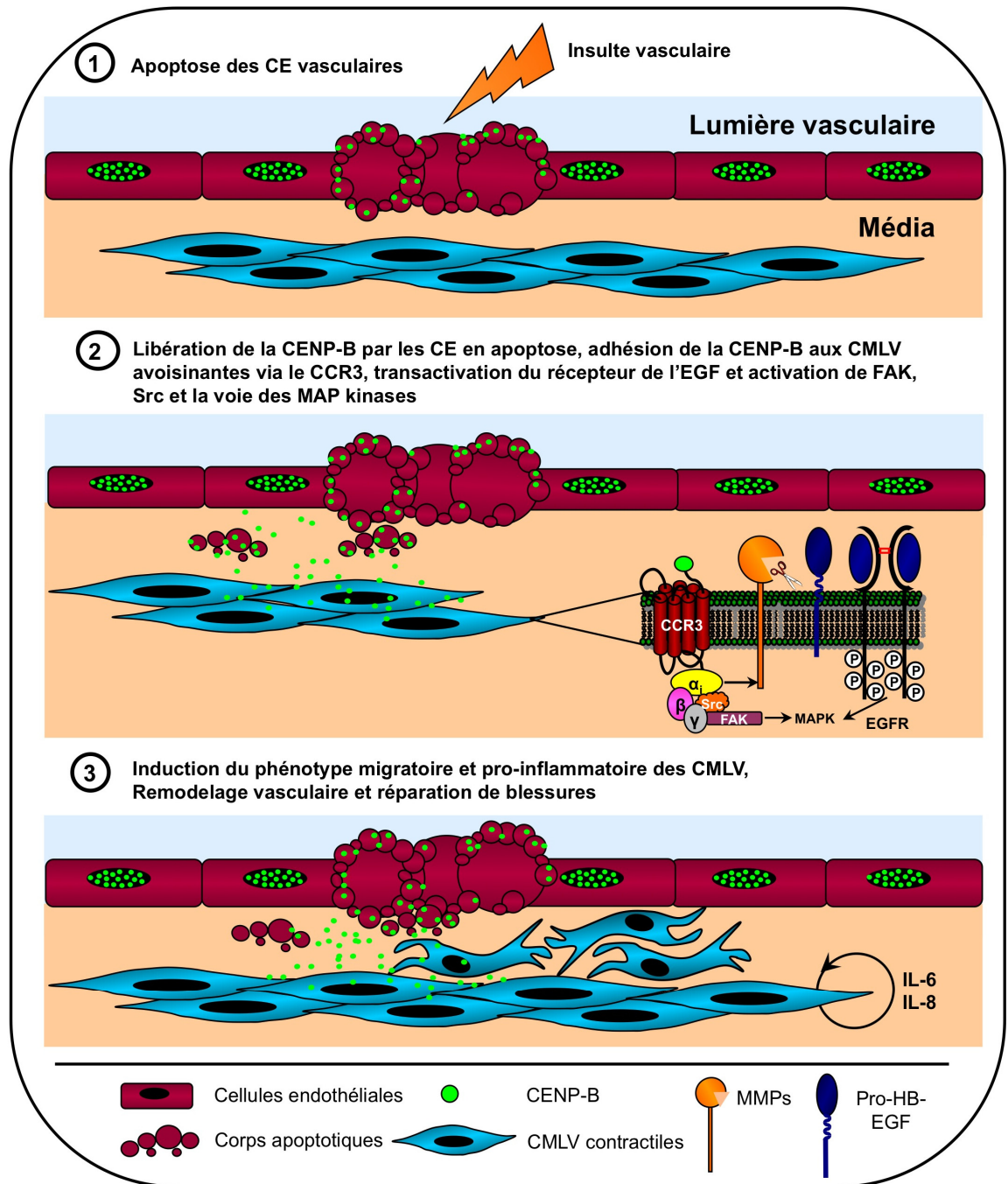


Figure 6. Hypothèse du rôle de l'auto-antigène CENP-B dans l'activation des CMLV.

Rôle potentiel de la CENP-B et des anti-CENP-B dans la pathophysiologie de la ScS

Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent donc, pour la première fois, que la CENP-B possède toutes les caractéristiques d'une molécule bifonctionnelle qui participe aux mécanismes normaux impliquant les CMLV tels que la réparation de blessures vasculaires. Une réponse auto-immune pourrait donc résulter d'un dérèglement de ce système et survenir uniquement chez les sujets dont les fonctions immuno-régulatrices sont altérées. Une apoptose massive des CE, un défaut de clairance des corps apoptotiques ou encore la présence d'anti-CENP-B pourraient ainsi perturber ou empêcher la CENP-B d'exercer son rôle physiologique. La spécificité de la liaison de la CENP-B à la surface des CMLV est en plus très intéressante. Elle soulève la possibilité que les auto-antigènes puissent diriger une réponse immunitaire vers un type cellulaire ou un tissu spécifique. Cette hypothèse pourrait expliquer l'association de certains auto-anticorps avec un regroupement précis de manifestations cliniques dans la ScS. La découverte de la CENP-B en tant que cytokine pour les CMLV ouvre donc de nouvelles perspectives de recherche et le défi consiste maintenant à définir le rôle exact de la CENP-B ainsi que celui des auto-anticorps anti-CENP-B dans la pathophysiologie de la ScS.

Le rôle physiologique de la CENP-B dans la réparation de blessures pourrait donc être compromis chez les patients sclérodermiques possédant des anti-CENP-B en circulation. En effet, au cours de notre étude, nous avons démontré que les auto-anticorps anti-CENP-B pouvaient abolir les effets de la CENP-B sur la sécrétion d'IL-8 et d'IL-6

(article 2, Fig. 5), empêchant ainsi la CENP-B d'exercer son rôle de cytokine envers les CMLV. Dans la ScS, l'apoptose des CE résulte en une perméabilisation de l'endothélium vasculaire (279). Chez les patients sclérodermiques possédant des anti-CENP-B, cette perméabilisation pourrait permettre aux auto-anticorps d'infiltrer la brèche vasculaire et de se lier à la CENP-B extracellulaire présente en circulation ou à la surface des CMLV avoisinantes, rendant ainsi la CENP-B inactive. La formation de complexes immuns CENP-B/anti-CENP-B pourrait ainsi empêcher la CENP-B d'exercer son rôle dans les processus normaux de réparation de blessures, conduisant ainsi à un état incomplet de remodelage vasculaire (Fig.7, droite). Cette hypothèse serait en accord avec certaines études qui suggèrent que la ScS résulte d'un processus pathophysiologique de cicatrisation et de réparation de blessures anormale, désordonné et chronique au niveau de la peau, du lit vasculaire ainsi que des organes internes (280).

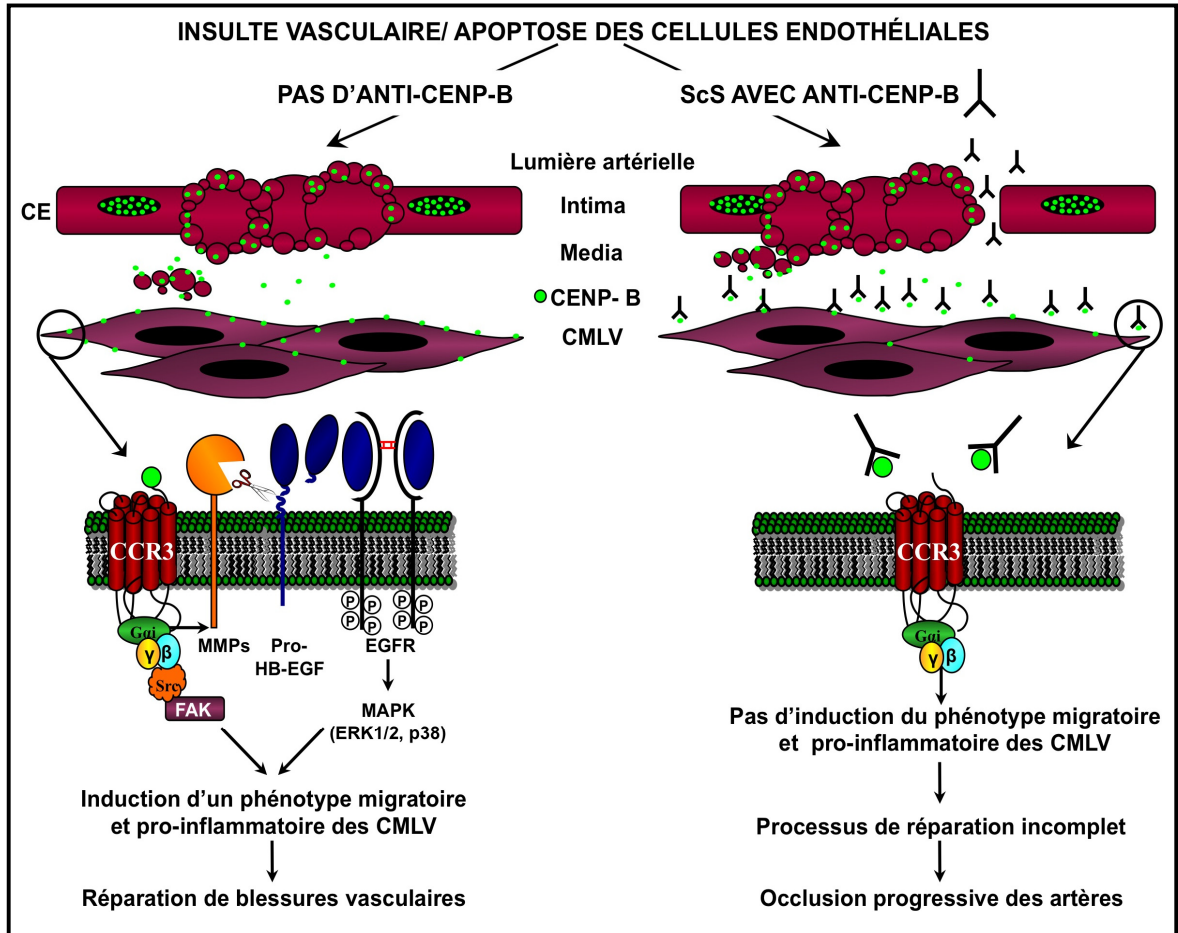


Figure 7. Hypothèse du rôle physiologique de la CENP-B dans l'activation des CMLV et dans la réparation de blessures vasculaires (gauche). Hypothèse des effets pathogènes des anti-CENP-B dans la pathophysiologie de la ScS (droite).

D'un autre côté, si la protéine CENP-B interagit avec le CCR3 présent à la surface des CMLV, il est probable qu'elle puisse également interagir avec certaines populations leucocytaires qui expriment ce récepteur, telles que les CD immatures ou encore les LT. Il serait donc possible que la CENP-B extracellulaire puisse induire la migration de ces cellules au site même de l'insulte vasculaire. Ainsi, chez des individus susceptibles, le

processus immuno-inflammatoire qui, théoriquement, devrait prendre en charge la réparation vasculaire pourrait au contraire, pour des raisons encore non-élucidées, participer à la pathogénèse de certaines manifestations vasculaires. De ce fait, la dysfonction endothéliale observée au cours de la ScS pourrait stimuler et amplifier une réponse inflammatoire locale qui pourrait favoriser la présentation antigénique des CPA et la production d'auto-anticorps ou encore favoriser la persistance du phénotype pro-migratoire et pro-inflammatoire des CMLV. Cette hyperactivation des CMLV pourrait ainsi provoquer une migration et une prolifération intimale excessive des cellules menant à l'hypertrophie de la média, à l'occlusion progressive des vaisseaux et, ultimement, à l'HTAP.

Notre étude porte essentiellement sur le rôle des auto-antigènes, plus particulièrement sur celui de la CENP-B. Nous nous sommes très peu attardé aux rôles des auto-anticorps en soi. Cependant, basé sur les résultats préliminaires obtenus, il est possible d'émettre l'hypothèse que les anti-CENP-B pourraient jouer un rôle pathogène dans la ScS en empêchant la CENP-B d'exercer son rôle physiologique normal sur les CMLV. Ainsi, la présence d'anti-CENP-B chez les patients sclérodermiques pourrait contribuer directement aux dommages vasculaires. Cette hypothèse est en accord avec le fait que la présence de ces auto-anticorps soit généralement associée à un phénotype plus vasculaire de la maladie, avec notamment un risque élevé de développer de l'HTAP et des ischémies digitales sévères (4, 53, 263-265, 281, 282).

Globalement, basé sur les résultats présentés dans cette étude, il est donc possible de supposer qu'une fois présente dans le milieu extracellulaire, la CENP-B adopte différents rôles en participant aux mécanismes normaux ou encore pathogènes impliquant les CMLV. Ainsi, chez un individu sain, la CENP-B libérée de manière transitoire et locale lors d'une insulte vasculaire et présente en faible concentration, pourrait jouer un rôle physiologique normal en participant à la mobilisation des CMLV ainsi qu'au remodelage vasculaire. A l'opposé, chez d'autres individus présentant, par exemple, une augmentation du taux d'apoptose des CE, une surcharge de la machinerie phagocytaire ou encore un défaut de clairance des cellules apoptotiques, la CENP-B pourrait se retrouver en concentration beaucoup plus élevée et persister plus longtemps dans le milieu extracellulaire. Par conséquent, au-delà d'un certain seuil, la CENP-B pourrait provoquer une hyperactivation des CMLV, phénomène également observé dans plusieurs pathologies vasculaires. D'un autre côté, chez certains individus susceptibles, la présence accrue et constante de la CENP-B pourrait également activer les CPA et favoriser la production d'auto-anticorps. La formation de complexe immun CENP-B/anti-CENP-B et l'inactivation subséquente de la protéine pourrait alors avoir des conséquences pathologiques importantes, en empêchant la CENP-B d'exercer son rôle et en provoquant un état incomplet de remodelage vasculaire. Ainsi, comme pour bien d'autres cytokines, un équilibre dans la concentration de la CENP-B extracellulaire serait primordial pour le bon fonctionnement des CMLV. Cet équilibre dicterait le passage du rôle physiologique au rôle pathogène de la CENP-B.

Vérification du rôle de la CENP-B et des anti-CENP-B dans des modèles physiologiques

Notre étude démontre donc principalement que la CENP-B, une fois relâchée dans le milieu extracellulaire, peut adopter une activité biologique nouvelle envers les CMLV et ainsi participer aux processus normaux impliquant ce type cellulaire. Nos résultats ont été obtenus grâce à une expérimentation effectuée *in vitro*, avec des cultures primaires en monocouche de CMLV humaines. Cependant, puisque les cellules en culture ne sont pas toujours représentatives des vaisseaux humains, des études ultérieures devront être effectuées sur des modèles physiologiques plus complexes afin de confirmer le rôle de la CENP-B dans les mécanismes normaux de réparation de blessures artérielles. L'utilisation de vaisseaux humains à des fins expérimentales est limitée par des considérations éthiques ainsi que par les difficultés d'interprétation des résultats liées à l'hétérogénéité des lits vasculaires.

Parmi les modèles alternatifs, on retrouve notamment certains modèles vasculaires qui ont été développés par l'intermédiaire du génie tissulaire (283, 284). Ce procédé consiste à préparer un équivalent vasculaire dont les caractéristiques histologiques et fonctionnelles se rapprochent d'aussi près que possible du modèle physiologique humain. Il s'agit en fait de reproduire en laboratoire les trois couches distinctes des vaisseaux sanguins. Chacune de ces couches comprend des cellules humaines différentes: l'intima est composée de CE, la média de CML et l'adventice, la couche extérieure, de cellules fibroblastiques. Ainsi, cette approche expérimentale nous permettrait d'avoir des

équivalents vasculaires qui se rapprochent davantage du tissu d'origine et qui respectent le plus fidèlement possible les propriétés histologiques et ultrastructurales des vaisseaux. L'utilisation de vaisseaux reconstitués par génie tissulaire permettrait donc d'analyser dans un modèle présentant un niveau d'organisation hiérarchique supérieur, les interactions entre la CENP-B et les CMLV. L'induction d'une blessure vasculaire au niveau de la couche intimale pourrait en plus permettre d'étudier le rôle de la CENP-B endogène provenant directement des CE en apoptose. Ainsi, à l'aide de l'incorporation d'acides aminés fluorescents dans la séquence protéique de la CENP-B (285, 286), il serait possible d'étudier directement la cinétique du relâchement de la CENP-B dans le milieu extracellulaire au cours de l'apoptose. A l'opposé, l'utilisation de CE déficientes pour la CENP-B pourrait nous indiquer plus clairement l'importance de la CENP-B dans l'activation des CMLV ainsi que dans la réparation de blessures vasculaires. D'autres types de cellules, comme les monocytes/macrophages, les LT ou encore les CD, devraient également pouvoir être introduits dans les vaisseaux reconstitués afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions immuno-histologiques retrouvées lors de pathologies vasculaires.

À partir de notre étude, il est possible d'émettre l'hypothèse que les anti-CENP-B jouent un rôle pathogène dans la ScS en empêchant la CENP-B d'exercer son rôle physiologique normal, dans des conditions qui pourraient porter atteinte aux processus normaux de réparation de blessures vasculaires. Traditionnellement, la technique la plus directe pour prouver la pathogénicité d'un anticorps est le transfert passif. Si l'anticorps est

bel et bien l'agent pathogène, l'hôte développera des symptômes similaires à ceux du donneur. Toutefois, démontrer la pathogénicité des anti-CENP-B dans un modèle animal de la ScS pourrait s'avérer problématique puisque la présence de ce type d'anticorps chez les modèles animaux connus ne semble pas être associée à des manifestations vasculaires plus fréquentes, comme c'est le cas chez les patients sclérodermiques. De plus, bien que des anti-CENP-B soient produits dans les modèles murins Tsk2 (287) et GvDH (288) ou encore les modèles aviaires UCD200/206 (289), la prévalence de ces auto-anticorps ne correspond pas à celle observée chez les patients. Ces différentes données suggèrent donc qu'il existe certaines différences entre les mécanismes immunitaires impliqués dans la pathogénèse de la maladie chez l'humain et la souris. Afin de contourner ces différents inconvénients, la pathogénicité des anti-CENP-B pourrait être testée directement chez l'humain par une technique d'immuno-déplétion sélective. Chez l'humain, la déplétion sélective d'anti-CENP-B en circulation pourrait s'effectuer par immuno-adsorption spécifique en utilisant la CENP-B comme immuno-adsorbant. Cette technique a récemment été utilisée pour le traitement de MAI comme la myasthénie grave (290) et la cardiopathie dilatée (291). Chez ces patients, il a été démontré qu'un retrait sélectif de certains auto-anticorps pouvait entraîner une amélioration notable de la maladie. Parallèlement, une diminution des manifestations vasculaires chez les patients sclérodermiques suite à une déplétion sélective des anti-CENP-B démontrerait la pathogénicité de ces auto-anticorps.

Éventuellement, cette série d'expériences pourrait donc s'avérer fort utile afin de caractériser davantage le rôle des anti-CENP-B dans la ScS. Cependant, l'étude du rôle

des anti-CENP-B dans la pathophysiologie de la maladie n'est qu'à un stade embryonnaire et avant d'entreprendre des études *in vivo*, certains points importants devront être éclaircis par des expérimentations *in vitro* sur les CMLV. Ainsi, les effets des anti-CENP-B sur l'activation des voies de signalisation intracellulaire impliquant le récepteur de l'EGF, Fak, Src, Erk et p38 ainsi que leur implication dans la migration cellulaire induite par la CENP-B devront être vérifiés afin d'identifier et de caractériser de manière plus précise le rôle exact des auto-anticorps dans le développement de la maladie. De plus, des anti-CENP-B provenant de plusieurs patients sclérodermiques devront être testés dans notre modèle afin de valider les résultats obtenus. Il est cependant clair que l'identification de la CENP-B comme ligand du CCR3 ouvre de nouvelles perspectives quant à l'étude du rôle pathogène des auto-anticorps anti-CENP-B dans la ScS.

Conclusion et perspectives

L'étude présentée dans cette thèse avait pour but d'examiner le rôle et/ou l'implication possible des auto-antigènes, plus particulièrement de l'auto-antigène centromérique B, dans le développement de certaines des manifestations vasculaires observées au cours de la ScS. Cette étude porte donc un regard nouveau sur le rôle extracellulaire de la CENP-B ainsi que sur ces effets biologiques sur les CMLV. Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que la CENP-B possède toutes les caractéristiques d'une molécule bifonctionnelle qui pourrait participer aux mécanismes normaux et pathogènes impliquant les CMLV.

En effet, les résultats de notre étude amènent pour la première fois, des preuves tangibles du rôle physiologique de la CENP-B dans les processus de réparation de blessure *in vitro* et nous permettent de suggérer un modèle de pathogénicité par lequel les anti-CENP-B pourraient empêcher le processus de réparation normal et ainsi participer au développement de manifestations vasculaires souvent observés au cours de la forme limitée de la ScS. Ce modèle pourrait donc fournir une explication convaincante quant à l'association des anti-CENP-B au phénotype vasculaire de la maladie ainsi qu'aux risques plus élevés de développer des ischémies digitales sévères ainsi que de l'HTAP isolée.

De façon intéressante, notre étude nous a également permis de démontrer que la CENP-B, une protéine intra-nucléaire située dans l'hétérochromatine, peut être relâchée par

des CE endommagées ou en apoptose et se lier spécifiquement à la surface des CML de l'artère pulmonaire humaine par l'entremise du récepteur de chémokine 3.

Bien que notre étude amène quelques réponses quant au rôle de la CENP-B et des anti-CENP-B dans les processus physiologiques de réparation de blessure ainsi que dans les processus pathologiques de la ScS, elle soulève également de nombreuses questions que de futures études devront aborder. Voici certaines de ces questions.

1. Le rôle physiologique de la CENP-B peut-il être démontré dans des équivalents vasculaires ou dans des modèles *in vivo* ?
2. Quel est le domaine exact de la CENP-B qui interagit avec le CCR3 ?
3. La CENP-B peut-elle interagir avec des populations leucocytaires ?
4. La CENP-B peut-elle provoquer la migration, l'activation et la maturation des CD immatures et des LT au site de l'insulte ?
5. Quelle est la contribution exacte de la transactivation du récepteur de l'EGF dans la migration cellulaire ?
6. Quel est l'effet des anti-CENP-B sur la migration cellulaire induite par la CENP-B ?
7. Le rôle pathogène des anti-CENP-B peut-il être démontré dans des équivalents vasculaires ou dans des modèles *in vivo* ?

Malheureusement, la ScS est une MAI qui reste, à ce jour, encore bien mal comprise et les traitements disponibles ne sont que très peu efficaces. En dépit des recherches effectuées depuis quelques années, cette maladie demeure encore aujourd'hui un grand mystère et représente un défi de taille pour la science. Notre étude soutient l'hypothèse du

rôle primaire des auto-antigènes dans la mobilisation du système immunitaire face aux signaux de danger afin de faciliter la réparation de blessure. Cette étude ouvre également la porte à une reconsidération du rôle des auto-anticorps dans la ScS et ouvre la voie à de nouvelles perspectives de recherche qui pourront éventuellement mener à des options thérapeutiques plus ciblées pour une maladie, et surtout pour des patients, qui en ont grand besoin.

Bibliographie

1. Charles C, Clements P, Furst DE. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. *Lancet* 2006;367(9523):1683-91.
2. Denton CP, Black CM. Targeted therapy comes of age in scleroderma. *Trends Immunol* 2005;26(11):596-602.
3. Steen V, Medsger TA, Jr. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003;48(2):516-22.
4. Salerni R, Rodnan GP, Leon DF, Shaver JA. Pulmonary hypertension in the CREST syndrome variant of progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Intern Med* 1977;86(4):394-9.
5. Sprent J, Kishimoto H. The thymus and negative selection. *Immunol Rev* 2002;185:126-35.
6. Halverson R, Torres RM, Pelanda R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol* 2004;5(6):645-50.
7. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003;21:305-34.
8. Grossman Z, Paul WE. Self-tolerance: context dependent tuning of T cell antigen recognition. *Semin Immunol* 2000;12(3):197-203; discussion 257-344.
9. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004;4(11):841-55.
10. Bluestone JA, Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005;17(6):638-42.
11. von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(3):223-32.
12. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 2005;24(3-4):211-26.
13. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2003;2(3):119-25.
14. Tsao BP, Grossman JM. Genetics and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3(3):183-90.

15. Arnett FC. The genetic basis of systemic lupus erythematosus. D.J Wallace and B.H Hahn ed. Baltimore Dubois's Lupus erythematosus (5th ed.). Williams and Wilkins; 1997.
16. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993;32(10):903-7.
17. Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyoty H, Vaarala O, Akerblom HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54 Suppl 2:S125-36.
18. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004;64(6):631-49.
19. Serrano NC, Millan P, Paez MC. Non-HLA associations with autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2006;5(3):209-14.
20. Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity* 2008;41(2):123-32.
21. Fernandez-Blanco L, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. A CTLA-4 polymorphism associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50(1):328-9.
22. Lowe RM, Graham J, Sund G, Kockum I, Landin-Olsson M, Schaefer JB, et al. The length of the CTLA-4 microsatellite (AT)_N-repeat affects the risk for type 1 diabetes. Diabetes Incidence in Sweden Study Group. *Autoimmunity* 2000;32(3):173-80.
23. Balada E, Villarreal-Tolchinsky J, Ordi-Ros J, Labrador M, Serrano-Acedo S, Martinez-Lostao L, et al. Multiplex family-based study in systemic lupus erythematosus: association between the R620W polymorphism of PTPN22 and the FcγRIIIa (CD32A) R131 allele. *Tissue Antigens* 2006;68(5):432-8.
24. Michou L, Lasbleiz S, Rat AC, Migliorini P, Balsa A, Westhovens R, et al. Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(5):1649-54.
25. Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol* 2005;32(2):219-24.
26. Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet* 2006;7(12):917-28.

27. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27(1):20-1.
28. Nomura T, Sakaguchi S. Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. *Nat Immunol* 2007;8(4):333-4.
29. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001;276(40):37672-9.
30. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006;116(6):1713-22.
31. Gavanescu I, Kessler B, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(11):4583-7.
32. Ramsdell F, Ziegler SF. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2003;15(6):718-24.
33. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002;298(5597):1395-401.
34. Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, Arkwright PD, Selz F, Prieur AM, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med* 2004;351(14):1409-18.
35. Albani S, Carson DA, Roudier J. Genetic and environmental factors in the immune pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18(4):729-40.
36. Vaughan JH. The Epstein-Barr virus in autoimmunity. *Springer Semin Immunopathol* 1995;17(2-3):203-30.
37. Lotz M, Roudier J. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: cellular and molecular aspects. *Rheumatol Int* 1989;9(3-5):147-52.
38. Toussirot E, Wendling D, Tiberghien P, Luka J, Roudier J. Decreased T cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus glycoprotein Gp110 in peripheral blood correlate with disease activity and severity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000;59(7):533-8.

39. Sheldon PJ, Williams WR. Procainamide-induced systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1970;29(3):236-43.
40. Debandt M, Vittecoq O, Descamps V, Le Loet X, Meyer O. Anti-TNF-alpha-induced systemic lupus syndrome. *Clin Rheumatol* 2003;22(1):56-61.
41. De Bandt M, Sibilia J, Le Loet X, Prouzeau S, Fautrel B, Marcelli C, et al. Systemic lupus erythematosus induced by anti-tumour necrosis factor alpha therapy: a French national survey. *Arthritis Res Ther* 2005;7(3):R545-51.
42. Costa MF, Said NR, Zimmermann B. Drug-induced lupus due to anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Semin Arthritis Rheum* 2008;37(6):381-7.
43. Rustin MH, Bull HA, Ziegler V, Mehlhorn J, Haustein UF, Maddison PJ, et al. Silica-associated systemic sclerosis is clinically, serologically and immunologically indistinguishable from idiopathic systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 1990;123(6):725-34.
44. McHugh NJ, Whyte J, Harvey G, Haustein UF. Anti-topoisomerase I antibodies in silica-associated systemic sclerosis. A model for autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1994;37(8):1198-205.
45. Gintrac M. Note sur la sclerodermie. *Rev Med Chir, Paris* 1847;2:263-81.
46. Goetz R. Pathology of progressive systemic sclerosis (generalized scleroderma) with special reference to changes in the viscera. *Clin Proc (S Africa)* 1945;4:337-42.
47. Maricq HR, Valter I. A working classification of scleroderma spectrum disorders: a proposal and the results of testing on a sample of patients. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22(3 Suppl 33):S5-13.
48. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR, 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)* 2002;81(2):154-67.
49. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15(2):202-5.
50. Steen VD, Medsger TA, Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 2000;43(11):2437-44.
51. Silman AJ. Scleroderma--demographics and survival. *J Rheumatol Suppl* 1997;48:58-61.

52. Merkel PA, Herlyn K, Martin RW, Anderson JJ, Mayes MD, Bell P, et al. Measuring disease activity and functional status in patients with scleroderma and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 2002;46(9):2410-20.
53. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35(1):35-42.
54. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37(1):75-83.
55. Steen VD, Mayes MD, Merkel PA. Assessment of kidney involvement. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(3 Suppl 29):S29-31.
56. Fritzler MJ, Kinsella TD. The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am J Med* 1980;69(4):520-6.
57. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum* 1980;23(6):617-25.
58. Koh ET, Lee P, Gladman DD, Abu-Shakra M. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: an analysis of 17 patients. *Br J Rheumatol* 1996;35(10):989-93.
59. Kawut SM, Taichman DB, Archer-Chicko CL, Palevsky HI, Kimmel SE. Hemodynamics and survival in patients with pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis. *Chest* 2003;123(2):344-50.
60. Battle RW, Davitt MA, Cooper SM, Buckley LM, Leib ES, Beglin PA, et al. Prevalence of pulmonary hypertension in limited and diffuse scleroderma. *Chest* 1996;110(6):1515-9.
61. MacGregor AJ, Canavan R, Knight C, Denton CP, Davar J, Coghlan J, et al. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: risk factors for progression and consequences for survival. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(4):453-9.
62. Murata I, Kihara H, Shinohara S, Ito K. Echocardiographic evaluation of pulmonary arterial hypertension in patients with progressive systemic sclerosis and related syndromes. *Jpn Circ J* 1992;56(10):983-91.
63. Ungerer RG, Tashkin DP, Furst D, Clements PJ, Gong H, Jr., Bein M, et al. Prevalence and clinical correlates of pulmonary arterial hypertension in progressive systemic sclerosis. *Am J Med* 1983;75(1):65-74.

64. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, et al. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis* 2003;62(11):1088-93.
65. Launay D, Hachulla E, Hatron PY, Michon-Pasturel U, Hebbar M, Queyrel V, et al. [Pulmonary hypertension screening in systemic scleroderma: a cohort study of 67 patients]. *Rev Med Interne* 2001;22(9):819-29.
66. Hachulla E, Gressin V, Guillemin L, de Groote P, Cabane J, Carpentier P, et al. [Pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: definition of a screening algorithm for early detection (the ItinerAIR-Sclerodermie Study)]. *Rev Med Interne* 2004;25(5):340-7.
67. Ioannidis JP, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB, Medsger TA, Jr., Lucas M, Michet CJ, et al. Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data. *Am J Med* 2005;118(1):2-10.
68. Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003;48(8):2246-55.
69. Ansell BM, Nasseh GA, Bywaters EG. Scleroderma in childhood. *Ann Rheum Dis* 1976;35(3):189-97.
70. Czirjak L, Nagy Z, Szegedi G. Systemic sclerosis in the elderly. *Clin Rheumatol* 1992;11(4):483-5.
71. Arnett FC, Howard RF, Tan F, Moulds JM, Bias WB, Durban E, et al. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum* 1996;39(8):1362-70.
72. Wakugawa M, Nakamura K, Akatsuka M, Kim SS, Yamada Y, Kawasaki H, et al. Expression of CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes in vivo and in vitro--upregulation by RANTES. *J Dermatol Sci* 2001;25(3):229-35.
73. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001;44(6):1359-62.
74. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr., Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48(7):1956-63.

75. Siracusa LD, McGrath R, Ma Q, Moskow JJ, Manne J, Christner PJ, et al. A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res* 1996;6(4):300-13.
76. Zhou X, Tan FK, Reveille JD, Wallis D, Milewicz DM, Ahn C, et al. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. *Arthritis Rheum* 2002;46(11):2990-9.
77. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, Madhok R. Analysis of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002;61(8):678-81.
78. Zhou X, Tan FK, Stivers DN, Arnett FC. Microsatellites and intragenic polymorphisms of transforming growth factor beta and platelet-derived growth factor and their receptor genes in Native Americans with systemic sclerosis (scleroderma): a preliminary analysis showing no genetic association. *Arthritis Rheum* 2000;43(5):1068-73.
79. Akimoto S, Abe M, Ishikawa O. HLA-DRB1 and DQB1 genes in Japanese patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000;27(12):2940-2.
80. Lambert NC, Distler O, Muller-Ladner U, Tylee TS, Furst DE, Nelson JL. HLA-DQA1*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum* 2000;43(9):2005-10.
81. Gilchrist FC, Bunn C, Foley PJ, Lympany PA, Black CM, Welsh KI, et al. Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP. *Genes Immun* 2001;2(2):76-81.
82. Galie N, Manes A, Farahani KV, Pelino F, Palazzini M, Negro L, et al. Pulmonary arterial hypertension associated to connective tissue diseases. *Lupus* 2005;14(9):713-7.
83. Fatini C, Gensini F, Sticchi E, Battaglini B, Angotti C, Conforti ML, et al. High prevalence of polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) in patients with systemic sclerosis. *Am J Med* 2002;112(7):540-4.
84. van de Water J, Haapanen L, Boyd R, Abplanalp H, Gershwin ME. Identification of T cells in early dermal lymphocytic infiltrates in avian scleroderma. *Arthritis Rheum* 1989;32(8):1031-40.
85. Gershwin ME, Abplanalp H, Castles JJ, Ikeda RM, van der Water J, Eklund J, et al. Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Exp Med* 1981;153(6):1640-59.

86. Gruschwitz MS, Moormann S, Kromer G, Sgonc R, Dietrich H, Boeck G, et al. Phenotypic analysis of skin infiltrates in comparison with peripheral blood lymphocytes, spleen cells and thymocytes in early avian scleroderma. *J Autoimmun* 1991;4(4):577-93.
87. Jimenez SA, Christner PJ. Murine animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14(6):671-80.
88. Zhang Y, Gilliam AC. Animal models for scleroderma: an update. *Curr Rheumatol Rep* 2002;4(2):150-62.
89. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996;98(3):785-92.
90. Fleischmajer R, Perlish JS. Capillary alterations in scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1980;2(2):161-70.
91. Yamane K, Miyauchi T, Suzuki N, Yuhara T, Akama T, Suzuki H, et al. Significance of plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1992;19(10):1566-71.
92. Matucci-Cerinic M, Jaffa A, Kahaleh B. Angiotensin converting enzyme: an in vivo and in vitro marker of endothelial injury. *J Lab Clin Med* 1992;120(3):428-33.
93. Kahaleh MB, Osborn I, LeRoy EC. Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in scleroderma and in Raynaud's phenomenon. *Ann Intern Med* 1981;94(4 pt 1):482-4.
94. Blann AD, Illingworth K, Jayson MI. Mechanisms of endothelial cell damage in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *J Rheumatol* 1993;20(8):1325-30.
95. Ohdama S, Takano S, Miyake S, Kubota T, Sato K, Aoki N. Plasma thrombomodulin as a marker of vascular injuries in collagen vascular diseases. *Am J Clin Pathol* 1994;101(1):109-13.
96. Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P, Black CM, Loizou S, Byron MA, et al. Measurement and characterisation of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol* 1988;72(3):450-6.
97. Marks RM, Czerniecki M, Andrews BS, Penny R. The effects of scleroderma serum on human microvascular endothelial cells. Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Arthritis Rheum* 1988;31(12):1524-34.

98. Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JR. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum* 1977;20(4):975-84.
99. Jimenez SA. Cellular immune dysfunction and the pathogenesis of scleroderma. *Semin Arthritis Rheum* 1983;13(1 Suppl 1):104-13.
100. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992;166(3):255-63.
101. Claman HN, Giorno RC, Seibold JR. Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma. The myth of the "uninvolved skin". *Arthritis Rheum* 1991;34(12):1495-501.
102. Gruschwitz M, von den Driesch P, Kellner I, Hornstein OP, Sterry W. Expression of adhesion proteins involved in cell-cell and cell-matrix interactions in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 1992;27(2 Pt 1):169-77.
103. Majewski S, Hunzelmann N, Johnson JP, Jung C, Mauch C, Ziegler-Heitbrock HW, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the skin of patients with systemic scleroderma. *J Invest Dermatol* 1991;97(4):667-71.
104. Sollberg S, Peltonen J, Uitto J, Jimenez SA. Elevated expression of beta 1 and beta 2 integrins, intercellular adhesion molecule 1, and endothelial leukocyte adhesion molecule 1 in the skin of patients with systemic sclerosis of recent onset. *Arthritis Rheum* 1992;35(3):290-8.
105. Stummvoll GH, Aringer M, Grisar J, Steiner CW, Smolen JS, Knobler R, et al. Increased transendothelial migration of scleroderma lymphocytes. *Ann Rheum Dis* 2004;63(5):569-74.
106. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1995;63(1):48-56.
107. Ishikawa O, Ishikawa H. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1992;19(8):1202-6.
108. Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 2004;140(1):37-50.
109. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Jr., Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984;27(6):645-53.

110. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* 2004;50(6):1721-33.
111. Wells AU, Lorimer S, Majumdar S, Harrison NK, Corrin B, Black CM, et al. Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis: increase in memory T-cells in lung interstitium. *Eur Respir J* 1995;8(2):266-71.
112. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghow R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest* 1992;90(4):1479-85.
113. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43(11):2455-63.
114. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997;24(2):328-32.
115. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* 2004;50(6):1918-27.
116. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol* 2004;41(12):1123-33.
117. Famularo G, Giacomelli R, Alesse E, Cifone MG, Morrone S, Boirivant M, et al. Polyclonal B lymphocyte activation in progressive systemic sclerosis. *J Clin Lab Immunol* 1989;29(2):59-63.
118. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000;165(11):6635-43.
119. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Koderu M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2006;54(1):192-201.
120. Asano N, Fujimoto M, Yazawa N, Shirasawa S, Hasegawa M, Okochi H, et al. B Lymphocyte signaling established by the CD19/CD22 loop regulates autoimmunity in the tight-skin mouse. *Am J Pathol* 2004;165(2):641-50.

121. Reveille JD, Solomon DH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticontromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;49(3):399-412.
122. Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, Bouaziz JD, Uchida J, Fujimoto M, et al. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. *Am J Pathol* 2006;169(3):954-66.
123. Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995;12(2-4):187-99.
124. Westergren-Thorsson G, Coster L, Akesson A, Wollheim FA. Altered dermatan sulfate proteoglycan synthesis in fibroblast cultures established from skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1996;23(8):1398-406.
125. Eckes B, Mauch C, Huppe G, Krieg T. Differential regulation of transcription and transcript stability of pro-alpha 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic scleroderma. *Biochem J* 1996;315 (Pt 2):549-54.
126. Gerstmeier H, Gabrielli A, Meurer M, Brocks D, Braun-Falco O, Krieg T. Levels of type IV collagen and laminin fragments in serum from patients with progressive systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1988;15(6):969-72.
127. Fleischmajer R, Jacobs L, Schwartz E, Sakai LY. Extracellular microfibrils are increased in localized and systemic scleroderma skin. *Lab Invest* 1991;64(6):791-8.
128. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342(18):1350-8.
129. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43(10):2230-9.
130. Jelaska A, Arakawa M, Broketa G, Korn JH. Heterogeneity of collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1996;39(8):1338-46.
131. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005;13(1):7-12.
132. Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum* 2002;46(7):1703-13.

133. Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003;48(7):1964-78.
134. Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, et al. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(6):3908-13.
135. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994;103(3):359-63.
136. Kirk TZ, Mark ME, Chua CC, Chua BH, Mayes MD. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem* 1995;270(7):3423-8.
137. Denton CP, Xu S, Black CM, Pearson JD. Scleroderma fibroblasts show increased responsiveness to endothelial cell-derived IL-1 and bFGF. *J Invest Dermatol* 1997;108(3):269-74.
138. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979;59(1):1-61.
139. Chamley-Campbell JH, Campbell GR. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis* 1981;40(3-4):347-57.
140. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004;84(3):767-801.
141. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 1990;10(6):966-90.
142. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995;75(3):487-517.
143. Ma X, Wang Y, Stephens NL. Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;274(5 Pt 1):C1206-14.
144. Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol* 1981;89(2):379-83.
145. Robitaille G, Henault J, Christin MS, Senecal JL, Raymond Y. The nuclear autoantigen CENP-B displays cytokine-like activities toward vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum* 2007;56(11):3814-26.

146. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1992;89(2):507-11.
147. Vernon SM, Campos MJ, Haystead T, Thompson MM, DiCorleto PE, Owens GK. Endothelial cell-conditioned medium downregulates smooth muscle contractile protein expression. *Am J Physiol* 1997;272(2 Pt 1):C582-91.
148. Shanahan CM, Weissberg PL. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(3):333-8.
149. Koenig M, Dieude M, Senecal JL. Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2008;7(8):588-93.
150. Hachulla E, Dubucquoi S. [Nuclear auto-antibodies: a useful tool for the diagnosis, the classification and the prognosis of systemic sclerosis]. *Rev Med Interne* 2004;25(6):442-7.
151. Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J, Tan EM. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(3):1627-31.
152. Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med* 1997;103(3):242-8.
153. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)* 2002;81(2):139-53.
154. Clegg DO, Williams HJ, Singer JZ, Steen VD, Schlegel S, Ziminski C, et al. Early undifferentiated connective tissue disease. II. The frequency of circulating antinuclear antibodies in patients with early rheumatic diseases. *J Rheumatol* 1991;18(9):1340-3.
155. Vazquez-Abad D, Wallace S, Senecal JL, Joyal F, Roussin A, Earnshaw WC, et al. Anticentromere autoantibodies. Evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein CENP-B as antigen. *Arthritis Rheum* 1994;37(2):248-52.
156. Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Takehara K. Antibodies to centromere and centriole in scleroderma spectrum disorders. *Dermatology* 1994;189(1):23-6.
157. Ferri C, Bernini L, Cecchetti R, Latorraca A, Marotta G, Pasero G, et al. Cutaneous and serologic subsets of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1991;18(12):1826-32.

158. Steen VD, Owens GR, Fino GJ, Rodnan GP, Medsger TA, Jr. Pulmonary involvement in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1985;28(7):759-67.
159. Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, Rothfield N. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J Clin Invest* 1986;77(2):426-30.
160. Earnshaw WC, Sullivan KF, Machlin PS, Cooke CA, Kaiser DA, Pollard TD, et al. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J Cell Biol* 1987;104(4):817-29.
161. Kapoor M, Montes de Oca Luna R, Liu G, Lozano G, Cummings C, Mancini M, et al. The cenpB gene is not essential in mice. *Chromosoma* 1998;107(8):570-6.
162. Bernat RL, Borisy GG, Rothfield NF, Earnshaw WC. Injection of anticentromere antibodies in interphase disrupts events required for chromosome movement at mitosis. *J Cell Biol* 1990;111(4):1519-33.
163. Pluta AF, Saitoh N, Goldberg I, Earnshaw WC. Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere. *J Cell Biol* 1992;116(5):1081-93.
164. Verheijen R, de Jong BA, Obery EH, van Venrooij WJ. Molecular cloning of a major CENP-B epitope and its use for the detection of anticentromere autoantibodies. *Mol Biol Rep* 1992;16(1):49-59.
165. Piccinini G, Cardellini E, Reimer G, Arnett FC, Durban E. An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol Immunol* 1991;28(4-5):333-9.
166. Kato T, Yamamoto K, Takeuchi H, Okubo M, Hara E, Nakada S, et al. Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1993;36(11):1580-7.
167. Okano Y. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22(4):709-35.
168. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients. *Arthritis Rheum* 1988;31(3):378-85.
169. Steen VD, Powell DL, Medsger TA, Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988;31(2):196-203.

170. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(4):534-40.
171. Jacobsen S, Ullman S, Shen GQ, Wiik A, Halberg P. Influence of clinical features, serum antinuclear antibodies, and lung function on survival of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28(11):2454-9.
172. Murata I, Takenaka K, Shinohara S, Suzuki T, Sasaki T, Yamamoto K. Diversity of myocardial involvement in systemic sclerosis: an 8-year study of 95 Japanese patients. *Am Heart J* 1998;135(6 Pt 1):960-9.
173. Dick T, Mierau R, Bartz-Bazzanella P, Alavi M, Stoyanova-Scholz M, Kindler J, et al. Coexistence of antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002;61(2):121-7.
174. Reimer G, Rose KM, Scheer U, Tan EM. Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. *J Clin Invest* 1987;79(1):65-72.
175. Okano Y, Steen VD, Medsger TA, Jr. Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1993;119(10):1005-13.
176. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993;91(4):1399-404.
177. Bardoni A, Rossi P, Salvini R, Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Montecucco C. Autoantibodies to RNA-polymerases in Italian patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(3):301-6.
178. Van Eenennaam H, Vogelzangs JH, Lugtenberg D, Van Den Hoogen FH, Van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Identity of the RNase MRP- and RNase P-associated Th/To autoantigen. *Arthritis Rheum* 2002;46(12):3266-72.
179. Okano Y, Medsger TA, Jr. Autoantibody to Th ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33(12):1822-8.
180. Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ, Milford Ward A, Greaves M, Hughes P. Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Clin Exp Immunol* 1996;106(3):491-7.

181. Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Igarashi A, Yazawa N, Kubo M, et al. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 2000;119(1):203-9.
182. Negi VS, Tripathy NK, Misra R, Nityanand S. Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. *J Rheumatol* 1998;25(3):462-6.
183. Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest* 1996;97(1):111-9.
184. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, et al. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998;101(10):2029-35.
185. Worda M, Sgonc R, Dietrich H, Niederegger H, Sundick RS, Gershwin ME, et al. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum* 2003;48(9):2605-14.
186. LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28(7):1573-6.
187. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951;38(1):1-10.
188. Semple JW, Freedman J. Autoimmune pathogenesis and autoimmune hemolytic anemia. *Semin Hematol* 2005;42(3):122-30.
189. Clancy RM, Askanase AD, Kapur RP, Chiopelas E, Azar N, Miranda-Carus ME, et al. Transdifferentiation of cardiac fibroblasts, a fetal factor in anti-SSA/Ro-SSB/La antibody-mediated congenital heart block. *J Immunol* 2002;169(4):2156-63.
190. Spatz L, Iliev A, Saenko V, Jones L, Irigoyen M, Manheimer-Lory A, et al. Studies on the structure, regulation, and pathogenic potential of anti-dsDNA antibodies. *Methods* 1997;11(1):70-8.
191. Tan FK, Arnett FC, Antohi S, Saito S, Mirarchi A, Spiera H, et al. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin-1, in patients with scleroderma and other connective tissue diseases. *J Immunol* 1999;163(2):1066-72.

192. Zhou X, Tan FK, Milewicz DM, Guo X, Bona CA, Arnett FC. Autoantibodies to fibrillin-1 activate normal human fibroblasts in culture through the TGF-beta pathway to recapitulate the "scleroderma phenotype". *J Immunol* 2005;175(7):4555-60.
193. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006;54(3):963-73.
194. Henault J, Tremblay M, Clement I, Raymond Y, Senecal JL. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004;50(10):3265-74.
195. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1):80-94.
196. Lunardi C, Bason C, Navone R, Millo E, Damonte G, Corrocher R, et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med* 2000;6(10):1183-6.
197. Muryoi T, Kasturi KN, Kafina MJ, Cram DS, Harrison LC, Sasaki T, et al. Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes. *J Exp Med* 1992;175(4):1103-9.
198. Maul GG, Jimenez SA, Riggs E, Ziemnicka-Kotula D. Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I: sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(21):8492-6.
199. Kasturi KN, Hatakeyama A, Spiera H, Bona CA. Antifibrillar autoantibodies present in systemic sclerosis and other connective tissue diseases interact with similar epitopes. *J Exp Med* 1995;181(3):1027-36.
200. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296(5566):301-5.
201. Plotz PH. The autoantibody repertoire: searching for order. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):73-8.
202. Dohlman JG, Lupas A, Carson M. Long charge-rich alpha-helices in systemic autoantigens. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195(2):686-96.

203. Muro Y, Masumoto H, Yoda K, Nozaki N, Ohashi M, Okazaki T. Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box. *J Cell Biol* 1992;116(3):585-96.
204. Sullivan KF, Glass CA. CENP-B is a highly conserved mammalian centromere protein with homology to the helix-loop-helix family of proteins. *Chromosoma* 1991;100(6):360-70.
205. Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* 1998;279(5356):1504-13.
206. Ramirez-Sandoval R, Sanchez-Rodriguez SH, Herrera-van Oostdam D, Avalos-Diaz E, Herrera-Esparza R. Antinuclear antibodies recognize cellular autoantigens driven by apoptosis. *Joint Bone Spine* 2003;70(3):187-94.
207. Utz PJ, Gensler TJ, Anderson P. Death, autoantigen modifications, and tolerance. *Arthritis Res* 2000;2(2):101-14.
208. Levine JS, Koh JS. The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen, and accelerant. *Semin Nephrol* 1999;19(1):34-47.
209. Samejima K, Svingen PA, Basi GS, Kottke T, Mesner PW, Jr., Stewart L, et al. Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274(7):4335-40.
210. Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med* 1999;190(6):815-26.
211. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 2001;40(4):275-84.
212. Rosen A, Casciola-Rosen L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ* 1999;6(1):6-12.
213. Utz PJ, Anderson P. Posttranslational protein modifications, apoptosis, and the bypass of tolerance to autoantigens. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1152-60.
214. Stetler DA, Jacob ST. Phosphorylation of RNA polymerase I augments its interaction with autoantibodies of systemic lupus erythematosus patients. *J Biol Chem* 1984;259(22):13629-32.

215. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998;101(1):273-81.
216. Zhou Z, Menard HA. Autoantigenic posttranslational modifications of proteins: does it apply to rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol* 2002;14(3):250-3.
217. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994;179(4):1317-30.
218. Dieude M, Senecal JL, Rauch J, Hanly JG, Fortin P, Brassard N, et al. Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs. *Arthritis Rheum* 2002;46(10):2695-707.
219. Howard OM, Dong HF, Su SB, Caspi RR, Chen X, Plotz P, et al. Autoantigens signal through chemokine receptors: uveitis antigens induce CXCR3- and CXCR5-expressing lymphocytes and immature dendritic cells to migrate. *Blood* 2005;105(11):4207-14.
220. Howard OM, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med* 2002;196(6):781-91.
221. Howard OZ. Autoantigen signalling through chemokine receptors. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(6):642-6.
222. Leist M, Nicotera P. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236(1):1-9.
223. Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* 2006;11(10):1709-26.
224. McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol* 1999;163(11):6164-72.
225. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101(4):890-8.

226. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390(6658):350-1.
227. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407(6805):784-8.
228. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002;2(12):965-75.
229. Rovere P, Sabbadini MG, Vallinoto C, Fascio U, Zimmermann VS, Bondanza A, et al. Delayed clearance of apoptotic lymphoma cells allows cross-presentation of intracellular antigens by mature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999;66(2):345-9.
230. Wu X, Molinaro C, Johnson N, Casiano CA. Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2001;44(11):2642-52.
231. Pittoni V, Valesini G. The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2002;1(3):154-61.
232. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, Irvine AE, Kennedy RJ, Bell AL. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. *Ann Rheum Dis* 1999;58(5):309-14.
233. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1241-50.
234. Baumann I, Kolowos W, Voll RE, Manger B, Gaipl U, Neuhuber WL, et al. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46(1):191-201.
235. Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* 1998;199(2):265-85.
236. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet* 1998;19(1):56-9.
237. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285(5425):248-51.

238. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 2005;78(1):1-8.
239. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5(4):331-42.
240. Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Sparatore B, Pedrazzi M, et al. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol* 2006;176(1):12-5.
241. Ayer LM, Senecal JL, Martin L, Dixon GH, Fritzler MJ. Antibodies to high mobility group proteins in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1994;21(11):2071-5.
242. Oppenheim JJ, Dong HF, Plotz P, Caspi RR, Dykstra M, Pierce S, et al. Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J Leukoc Biol* 2005;77(6):854-61.
243. Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, Smith G, Paterson JR, Earnshaw JJ, et al. Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(3):397-403.
244. Schecter AD, Calderon TM, Berman AB, McManus CM, Fallon JT, Rossikhina M, et al. Human vascular smooth muscle cells possess functional CCR5. *J Biol Chem* 2000;275(8):5466-71.
245. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(9):639-50.
246. Adachi T, Cui CH, Kanda A, Kayaba H, Ohta K, Chihara J. Activation of epidermal growth factor receptor via CCR3 in bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320(2):292-6.
247. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *Embo J* 1997;16(23):7032-44.
248. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996;379(6565):557-60.
249. Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T. Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem* 2001;276(11):7957-62.

250. Yang X, Zhu MJ, Sreejayan N, Ren J, Du M. Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells* 2005;20(2):263-70.
251. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20(10):408-12.
252. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999;402(6764):884-8.
253. Luttrell LM. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80(5):375-82.
254. Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11(2):177-83.
255. Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(6):637-58.
256. Bohm SK, Grady EF, Bunnett NW. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 1997;322 (Pt 1):1-18.
257. Grady EF, Bohm SK, Bunnett NW. Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol* 1997;273(3 Pt 1):G586-601.
258. Bunemann M, Hosey MM. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol* 1999;517 (Pt 1):5-23.
259. Dohlman HG, Thorner J. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 1997;272(7):3871-4.
260. Bunemann M, Brandts B, Pott L. Downregulation of muscarinic M2 receptors linked to K⁺ current in cultured guinea-pig atrial myocytes. *J Physiol* 1996;494 (Pt 2):351-62.
261. Bunemann M, Brandts B, Pott L. In vivo downregulation of M2 receptors revealed by measurement of muscarinic K⁺ current in cultured guinea-pig atrial myocytes. *J Physiol* 1997;501 (Pt 3):549-54.
262. Senecal JL, Henault J, Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol* 2005;32(9):1643-9.

263. Rodnan GP, Myerowitz RL, Justh GO. Morphologic changes in the digital arteries of patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma) and Raynaud phenomenon. *Medicine (Baltimore)* 1980;59(6):393-408.
264. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA, Jr. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003;48(1):203-9.
265. Steen V. Epidemiology and classification of scleroderma. In: Hochberg MA, Silman AJ, Smolens JS, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. *Rheumatology*. 4th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008. p.1361-7.
266. Rabinovitch M. Pathobiology of Pulmonary Hypertension. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2007;2:369-399.
267. Michelakis ED. Spatio-temporal diversity of apoptosis within the vascular wall in pulmonary arterial hypertension: heterogeneous BMP signaling may have therapeutic implications. *Circ Res* 2006;98(2):172-5.
268. Stenmark KR, Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 1997;59:89-144.
269. Nguyen VA, Sgonc R, Dietrich H, Wick G. Endothelial injury in internal organs of University of California at Davis line 200 (UCD 200) chickens, an animal model for systemic sclerosis (Scleroderma). *J Autoimmun* 2000;14(2):143-9.
270. Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med* 1979;149(6):1326-35.
271. Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1997;99(2):178-84.
272. Ugucioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhee S, LaRosa GJ, et al. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 1997;100(5):1137-43.
273. Beaulieu S, Robbiani DF, Du X, Rodrigues E, Ignatius R, Wei Y, et al. Expression of a functional eotaxin (CC chemokine ligand 11) receptor CCR3 by human dendritic cells. *J Immunol* 2002;169(6):2925-36.
274. Franz-Bacon K, Dairaghi DJ, Boehme SA, Sullivan SK, Schall TJ, Conlon PJ, et al. Human thymocytes express CCR-3 and are activated by eotaxin. *Blood* 1999;93(10):3233-40.

275. Stellato C, Brummet ME, Plitt JR, Shahabuddin S, Barody FM, Liu MC, et al. Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2001;166(3):1457-61.
276. Kodali RB, Kim WJ, Galaria, II, Miller C, Schechter AD, Lira SA, et al. CCL11 (Eotaxin) induces CCR3-dependent smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(7):1211-6.
277. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2004;4(6):469-78.
278. Jeffery TK, Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;45(3):173-202.
279. Mouthon L, Garcia De La Pena-Lefebvre P, Chanseaud Y, Tamby MC, Boissier MC, Guillevin L. [Pathogenesis of systemic sclerosis: immunological aspects]. *Ann Med Interne (Paris)* 2002;153(3):167-78.
280. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Vascular disease in scleroderma: angiogenesis and vascular repair. *Rheum Dis Clin North Am* 2008;34(1):73-9; vi.
281. Boin F, Rosen A. Autoimmunity in systemic sclerosis: current concepts. *Curr Rheumatol Rep* 2007;9(2):165-72.
282. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15(6):778-84.
283. L'Heureux N, Germain L, Labbe R, Auger FA. In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J Vasc Surg* 1993;17(3):499-509.
284. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J* 1998;12(1):47-56.
285. Cohen BE, McAnaney TB, Park ES, Jan YN, Boxer SG, Jan LY. Probing protein electrostatics with a synthetic fluorescent amino acid. *Science* 2002;296(5573):1700-3.
286. Summerer D, Chen S, Wu N, Deiters A, Chin JW, Schultz PG. A genetically encoded fluorescent amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(26):9785-9.
287. Gentiletti J, McCloskey LJ, Artlett CM, Peters J, Jimenez SA, Christner PJ. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J Immunol* 2005;175(4):2418-26.

288. Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J Immunol* 2002;168(6):3088-98.
289. Gruschwitz MS, Shoenfeld Y, Krupp M, Gershwin ME, Penner E, Brezinschek HP, et al. Antinuclear antibody profile in UCD line 200 chickens: a model for progressive systemic sclerosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;100(4):307-13.
290. Takamori M, Maruta T. Immunoabsorption in myasthenia gravis based on specific ligands mimicking the immunogenic sites of the acetylcholine receptor. *Ther Apher* 2001;5(5):340-50.
291. Wallukat G, Muller J, Hetzer R. Specific removal of beta1-adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2002;347(22):1806.