



Université de Montréal

**Développement d'un nouveau modèle murin expérimental de  
sclérodermie**

**Par Vinh Nguyen**

**Département microbiologie, infectiologie et immunologie dans la faculté de  
médecine**

Mémoire présenté à la faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
immunologie

Janvier 2016

©, Vinh Nguyen, 2016

**Université de Montréal**

Ce mémoire intitulé :

**Développement d'un nouveau modèle murin expérimental de  
sclérodermie**

Présenté par :

**Par Vinh Nguyen**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Thibodeau  
Président-rapporteur

Marika Sarfati  
Co-superviseuse de recherche

Jean Luc Senécal  
Co-superviseur de recherche

Manuela Santos  
Membre du jury

## RÉSUMÉ.

La sclérodermie (SSc) est une maladie rare affectant les personnes génétiquement prédisposées d'une réponse immunitaire défectueuse. Malgré les derniers avancements et développements dans le domaine, l'étiologie et la pathogénèse de la maladie demeurent peu comprises. Par ailleurs, il y a un ralentissement dans la compréhension de cette maladie à cause du manque de modèle animal représentatif de la SSc humaine. Malgré plusieurs lacunes, les souris traitées avec la bléomycine ou portant des modifications génétiques (TSK-1) sont très utilisées dans les études précliniques de la SSc mais elles ne présentent pas toutes les caractéristiques de cette maladie. Pour contribuer à la recherche sur la SSc, la stagiaire postdoctorale Dre Heena Mehta a développé dans le laboratoire du Dre Sarfati en collaboration avec le Dr Senécal, un modèle de souris expérimental induit par l'immunisation de cellules dendritiques (DCs) chargées de peptides de la protéine topoisomérase I (TOPOIA et TOPOIB). Dans le but de caractériser ce modèle murin et d'établir un profil immunitaire, j'ai concentré mes analyses principalement sur les caractéristiques de la SSc telles que la fibrose, l'inflammation, l'hyper- $\gamma$ -globulinémie polyclonale, la vasculopathie ainsi que de l'expression de cytokines. Brièvement, l'immunisation de souris avec les DCs chargées avec la topoisomérase I (TOPOI) a induit l'inflammation pulmonaire et cutanée, en plus de la fibrose sous forme diffuse (dcSSc). Les souris présentaient également des symptômes de la vasculopathie ainsi que des taux élevés d'anticorps polyclonaux. Les résultats démontraient que les peptides TOPOIA étaient efficaces dans l'induction de la fibrose et de la réponse inflammatoire alors que les peptides TOPOIB étaient surtout impliqués dans la fibrose cutanée. En plus de nos résultats, les observations préliminaires sur le profil de cytokines tissulaires suggéraient que ce modèle pourrait remplacer ou compléter les autres modèles animaux de SSc.

## ABSTRACT.

Systemic sclerosis (SSc) is a rare disease of unknown etiology that affects people that have a genetic predisposition to autoimmunity. Despite the latest advancement and development in the field, the mechanisms underlying disease development remain poorly understood. The lack of animal model that encompasses the cardinal features of human systemic sclerosis is a major cause of the slowdown in the understanding of this disease. In fact, some mouse models such as the bleomycin induced-SSc and TSK-1 mouse are widely used in preclinical studies of scleroderma. However, these models have several shortcomings since these mice do not display all the cardinal features of the disease found in humans. To contribute to the research of SSc, postdoctoral fellow Dre Heena Mehta has developed in Dre Sarfati's laboratory in collaboration with Dr Senécal, an experimental murine model of SSc induced by dendritic cells loaded with topoisomerase I peptide. In order to characterise the model and establish an immune profile of our experimental mice, my analysis focused mainly on the cardinal features of scleroderma such as fibrosis, inflammation and polyclonal hyper- $\gamma$ -globulinemia, vasculopathy and cytokines gene expression. Hence, immunization with dendritic cells loaded topoisomerase I peptides (TOPOIA and TOPOIB) induced pulmonary and dermal inflammation together with diffuse form of fibrosis. The mice also showed symptoms of vasculopathy and high levels of polyclonal antibodies. These results showed that TOPOIA peptides are effective in inducing fibrosis and inflammatory response while TOPOIB peptides are involved in skin fibrosis. Together with the results, the preliminary data on cytokine profile in tissue suggested that our mouse model could possibly replace/complement other current animal models of scleroderma.

## TABLE DES MATIÈRES.

Résumé	4
Abstract	5
Table des matières	6
Liste de figures	9
Liste de sigles et abréviations	10
Dédicace	11
Remerciement	12
Introduction	13
Aspect clinique	13
Inflammation	14
Fibrose	15
Réponse adaptative	17
Vasculopathie	18
Modèle animal	19
Hypothèse	22

Matériel et méthodes	23
Préparation des cellules dendritiques	23
Souris expérimentales	23
Quantification de l'hyper- $\gamma$ -globulinémie polyclonale	25
Quantification par ELISA spécifique des interleukines/chimiokines	27
Hydroxyproline	27
RT-PCR	28
Coloration histologique	30
Évaluation de l'atteinte pulmonaire	32
Analyse quantitative de l'épaisseur du derme	32
Résultats	41
A. L'injection intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) favorise une réponse de type IgG2a alors que l'injection intrapéritonéale/sous-cutanées (IP+Sc) induit une réponse de type IgG2b	41
B. L'immunisation avec TOPOIA induit l'inflammation, fibrose et vasculopathie pulmonaire	42
C. Les souris expérimentales TOPOIA DCs et TOPOIB DCs développent une fibrose pulmonaire	43
D. L'immunisation avec la topoisomérase I induit l'inflammation cutanée	44

E. Les souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs développent une fibrose cutanée	<u>44</u>
F. Analyse moléculaire des cytokines dans la peau	<u>45</u>
G. Quantification de l'inflammation pulmonaire par le dosage de cytokines	<u>46</u>
Discussion	<u>47</u>
Conclusion	<u>54</u>
Bibliographie	<u>56</u>



## LISTE DE FIGURES.

Figure 1 : Modèles expérimentaux de sclérodermie	<u>20</u>
Figure 2 : Stratégies d'immunisations	<u>25</u>
Figure 3 : Quantification des immunoglobulines sériques	<u>33</u>
Figure 4 : Évaluation de l'atteinte pulmonaire (fibrose, vasculopathie et inflammation)	<u>34</u>
Figure 5 : Quantification de la fibrose pulmonaire	<u>35</u>
Figure 6 : Évaluation qualitative de l'atteinte cutanée	<u>36</u>
Figure 7 : Mesure de l'épaisseur cutanée	<u>37</u>
Figure 8 : Quantification de la fibrose cutanée	<u>38</u>
Figure 9 : Analyse de l'expression génétique de cytokines dans la peau	<u>39</u>
Figure 10 : Quantification des cytokines dans les explants pulmonaires	<u>40</u>

## LISTE DE SIGLES ET ABRÉVIATIONS.

- ANA: Anticorps anti-nucléaires
- anti-CENP-B: Anti-protéine centromérique B
- Anti-TOPOI: Anticorps anti-topoisomérase I
- CRCHUM: Centre de Recherche du CHUM
- CTGF: Connective tissue growth factor
- DC: Cellule dendritique
- dcSSc: Forme diffuse de la sclérodermie
- DO<sub>50</sub>: Densité optique à 50 %
- DO<sub>max</sub>: Densité optique maximale
- DO<sub>min</sub>: Densité optique minimale
- DO<sub>moyenne</sub> : Densité optique moyenne
- ECM: Matrice extracellulaire
- H&E: Hématoxyline et Éosine
- IgG: Immunoglobuline de type G
- lcSSc: Forme limitée de la sclérodermie
- MMP: Matrice métalloprotéinase
- PDGF: Platelet-derived growth factor
- SSc: Sclérose systémique ou sclérodermie
- TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$
- TOPOI: Topoisomérase de type I
- TOPOIA: Topoisomérase I – Séquence A
- TOPOIB: Topoisomérase I – Séquence B
- TSK: Tight-skin mouse

## DÉDICACE.

Je dédie ce mémoire :

À mes parents Phuc NGUYEN et Thi Kim Chi TRAN qui m'ont soutenu et encouragé  
tout au long de mes études

À mon neveu Jaden UN

À ma sœur Lan NGUYEN et mon beau-frère Sam UN

À tous mes proches

À tous mes amis(es)

À tous mes collègues du laboratoire

À tous ceux qui m'aiment et que j'aime

Et surtout à mes deux co-superviseurs Dre Marika SARFATI et Dr Jean-Luc SENÉCAL

## REMERCIEMENT.

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont aidé dans ma formation ainsi qu'à l'élaboration de ce mémoire. Alors je tiens tout d'abord à remercier mes deux co-superviseurs, Dre Marika SARFATI et Dr Jean-Luc SENÉCAL pour m'avoir donné l'opportunité de participer à ce projet de recherche et de m'avoir guidé tout au long de mes études supérieures.

Je tiens également à remercier ma collègue Dre Heena MEHTA pour m'avoir formé et fait confiance tout au long de ce projet.

Je tiens aussi à remercier Dr Guy DELESPESE pour son écoute, son expertise et de ses conseils permettant à l'avancement du projet.

Ainsi qu'à mes collègues pour leurs aides et conseils lors des réunions et dans la préparation de mes présentations.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réussite de ce travail et qui n'ont pas été cités ici.

## INTRODUCTION.

### Aspect clinique

La SSc est une maladie du tissu conjonctif avec une étiologie inconnue qui implique des interactions complexes aboutissant au dépôt excessif et dérégulé des composants de la matrice extracellulaire (ECM) (Katsumoto *et al.*, 2011; Dumoitier *et al.*, 2014; Pattanaik *et al.*, 2015). Cette maladie se manifeste au niveau de la peau mais atteint également les organes vitaux. Par conséquent, elle se caractérise par de la fibrose cutanée et viscérale, des dommages microvasculaires et par la présence d'auto-anticorps hautement spécifiques détectés dans le sérum des patients (Bhattacharyya *et al.*; Domsic RT, 2014; Pattanaik *et al.*, 2011). La SSc est une pathologie rare avec une incidence d'environ 20 personnes atteintes par million d'habitants (Pattanaik *et al.*, 2011). Aussi connue sous le nom de sclérose systémique, elle est classée selon le degré de l'atteinte cutanée ou systémique, soit la forme limitée (lcSSc) ou la forme diffuse (dcSSc). Parmi les deux sous-classes, la dcSSc est la variante la plus sévère de la maladie car l'atteinte cutanée se développe beaucoup plus rapidement et l'inflammation est plus importante (Katsumoto *et al.*, 2011; Vargas et Abraham, 2007). De plus, la dcSSc s'accompagne d'une atteinte viscérale impliquant les poumons, les reins, l'œsophage ainsi que le cœur. L'espérance de vie est diminuée dans la SSc, et particulièrement dans la dcSSc. Parmi les complications viscérales liées à la dcSSc, la fibrose pulmonaire serait la cause majeure de décès chez ces patients alors que le dysfonctionnement de l'œsophage est le plus commun chez les personnes atteintes de la lcSSc (Gabrielli *et al.*, 2009). Les patients atteints de la lcSSc développent également une fibrose cutanée qui est cependant moins sévère et ils présentent des dommages

vasculaires cliniquement plus marqués au niveau des phalanges distales (Vargas et Abraham, 2007). Malgré les derniers avancements et développements dans le domaine, l'étiologie et la pathogénèse de la maladie restent peu comprises (Dumoitier *et al.*, 2014; Artlett CM, 2010). Cependant, quelques facteurs prédisposant ont été identifiés tels que les facteurs génétiques (Koenig *et al.*, 2008). À ce jour, le rôle du système immunitaire dans cette maladie est encore peu exploré. La SSc demeure une des maladies auto-immunes systémiques les plus complexes compliquant l'approche thérapeutique. De fait, les traitements utilisés dans d'autres maladies auto-immunes n'ont aucun effet sur la progression de la SSc (Ramos-Casals *et al.*, 2010). À court d'options, une des seules thérapies actuellement disponibles est le traitement par des immunomodulateurs, qui démontre malheureusement très peu d'efficacité pour contrer la fibrose. (Stummvoll, 2002).

## Inflammation

La phase inflammatoire d'une réponse immunitaire est un mécanisme de défense naturel, utilisé par différents tissus de l'organisme pour contrer toute agression exogène ou endogène (Khansari *et al.*, 2009). Elle est normalement transitoire. L'inflammation est une condition pathologique souvent caractérisée par l'infiltration cellulaire (incluant les monocytes, les macrophages, les lymphocytes ainsi que les cellules plasmatiques) et par des dommages tissulaires (Lafyatis et York, 2009). Cependant, lorsque la réparation tissulaire fait défaut, il y a développement d'une inflammation chronique menant à l'apparition de fibrose (Wick *et al.*, 2013). En effet, les réponses immunitaires

adaptatives et innées sont activées durant la phase inflammatoire et selon l'article « The Immunology of Fibrosis » publiés par Wick et al., les chercheurs affirment que toutes les formes de fibroses sont précédées par une réaction inflammatoire. Ils affirment également qu'il n'y aurait pas de développement fibrotique sans une phase précoce d'inflammation (d'où l'expression « No inflammation, no fibrosis »). De plus, les Toll-like receptors (TLRs) sont des activateurs communs du mécanisme pro-inflammatoire qui se retrouvent dans toutes les formes de fibrose (Wick et al., 2013). Ainsi, les personnes atteintes de la SSc présentent d'importantes infiltrations de cellules mononuclées dans les organes affectés, des autoanticorps circulants en plus des médiateurs immunitaires altérés qui induisent une dysfonction du système immunitaire (Domsic RT, 2014; van Bon L *et al.*, 2011; Sondergaard *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 1992; Senecal *et al.*, 2005; Lu TT, 2011).

## Fibrose

Comme mentionné ci-dessus, les patients atteints de la SSc développent de manière rapide et progressive de la fibrose affectant différents tissus de l'organisme (Gabrielli *et al.*, 2009). La présence de fibrose est l'une des principales caractéristiques de la SSc. De plus, elle est considérée comme l'aboutissement pathologique de la majorité des maladies inflammatoires telles que dans la maladie de la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF) ou dans les maladies impliquant les reins et/ou le foie (Wynn et Ramalingam, 2012). En effet, le dépôt de collagène est un phénomène tout à fait normal, indispensable et généralement réversible. Toutefois, la réparation tissulaire

excessive peut se transformer graduellement en une réponse irréversible en cas d'une dérégulation de la réponse de cicatrisation ou suite à des dommages sévères et/ou répétitifs (Wynn et Ramalingam, 2012). Selon les statistiques, une partie importante des causes de décès naturels dans les pays développés sont attribués aux maladies liées à l'atteinte de fibrose chronique proliférative dont la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF) (Wick G et al., 2013). La fibrose est définie par le dépôt excessif et dérégulé de la ECM, qui entraînerait la modification de certaines structures tissulaires menant au dysfonctionnement des organes viscéraux. La synthèse de ces matrices extracellulaires est régulée par des fibroblastes alors que la dégradation ces matrices se fait principalement avec l'aide de l'enzyme métalloprotéinase matricielle (MMP). Dans les maladies auto-immunes telles que la SSc, plusieurs hypothèses suggèrent que l'activité des MMPs est dérégulée et par conséquent, les fibroblastes synthétisent de manière excessive de la ECM inhibant ainsi le processus de dégradation. (Chizzolini *et al.*, 2010). Selon la littérature, une interaction complexe entre les cellules endothéliales, les cellules immunes ainsi que les médiateurs solubles serait responsables de la modification dans l'activité des fibroblastes, qui aurait un impact direct dans la pathogenèse de la SSc (Katsumoto *et al.*, 2011; Chizzolini *et al.*, 2010). Au cours des dernières années, plusieurs cibles moléculaires potentielles ont été identifiées qui incluent principalement le *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), le *connective tissue growth factor* (CTGF) et le *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Ramos-Casals *et al.*, 2010). Ces cytokines ou facteurs de croissance ont la capacité de réguler la production de la ECM par les fibroblastes (Chizzolini et al., 2010). Ainsi, plusieurs éléments de la réponse innée et adaptative participent à la différenciation et activation des fibroblastes.



Par conséquent, la recherche actuelle est principalement axée sur le développement de thérapies capables d'inhiber ou d'inverser le développement de fibrose chez les personnes atteintes de la SSc (Ramos-Casals *et al.*, 2010).

## Réponse adaptative

La présence d'auto-anticorps spécifiques contre des protéines nucléaires compte parmi les principales caractéristiques de la SSc. Les anticorps anti-nucléaires (ANA) se retrouvent dans le sérum de plus de 90 % des patients atteints de cette maladie (Domsic RT, 2014; Senecal *et al.*, 2005; Koenig *et al.*, 2008). Parmi la diversité d'ANA observés, les anticorps dirigés contre l'ADN topo-isomérase I (anti-topo I), la protéine centromérique B (anticentromères [AC] ou anti-CENP-B), les ARN polymérase III ou les antigènes Th/To sont les plus communément associés à la SSc (Domsic RT, 2014; Senecal *et al.*, 2005). Les anti-topo I sont étroitement associés à la fibrose pulmonaire et à la dcSSc de la maladie (Domsic RT, 2014; Koenig *et al.*, 2008; Koenig *et al.* (2) , 2008). De plus, les ACA apparaissent très tôt dans la maladie et se retrouvent dans plus de 60% des patients atteints de la lcSSc et dans approximativement 15% des patients atteints de la dcSSc (Domsic RT, 2014; Koenig *et al.*, 2008; Koenig *et al.* (2), 2008).

En plus de la présence des ANA, l'hyper- $\gamma$ -globulinémie et l'hyperactivité des lymphocytes B polyclonaux sont aussi détectées chez les patients atteints de la SSc (Sato *et al.*, 2004). Les anomalies des lymphocytes B caractérisées par la production d'auto-anticorps et l'activation polyclonale des lymphocytes B pourraient contribuer de

façon importante à la pathogénicité de la maladie et à l'auto-immunité (Sato *et al.*, 2004). Étonnamment, les patients atteints de la SSc ont une diminution de la production des cellules mémoires B, mais ces dernières ont une meilleure capacité à produire des IgG (Sato *et al.*, 2004). Il y aura donc un niveau excessivement élevé d'anticorps dans le sérum de ces patients. De plus, Sato S. *et al* ont démontré dans des modèles de souris que les lymphocytes B ont un rôle critique dans le développement de l'auto-immunité (Sato *et al.*, 2004; Asano *et al.*, 2004) Ils ont aussi rapporté qu'une régulation négative des lymphocytes B pourrait entraîner une amélioration des symptômes de fibrose cutanée chez un modèle de souris TSK-1 (Sato *et al.*, 2004; Asano *et al.*, 2004; Hasewaga *et al.*, 2006).

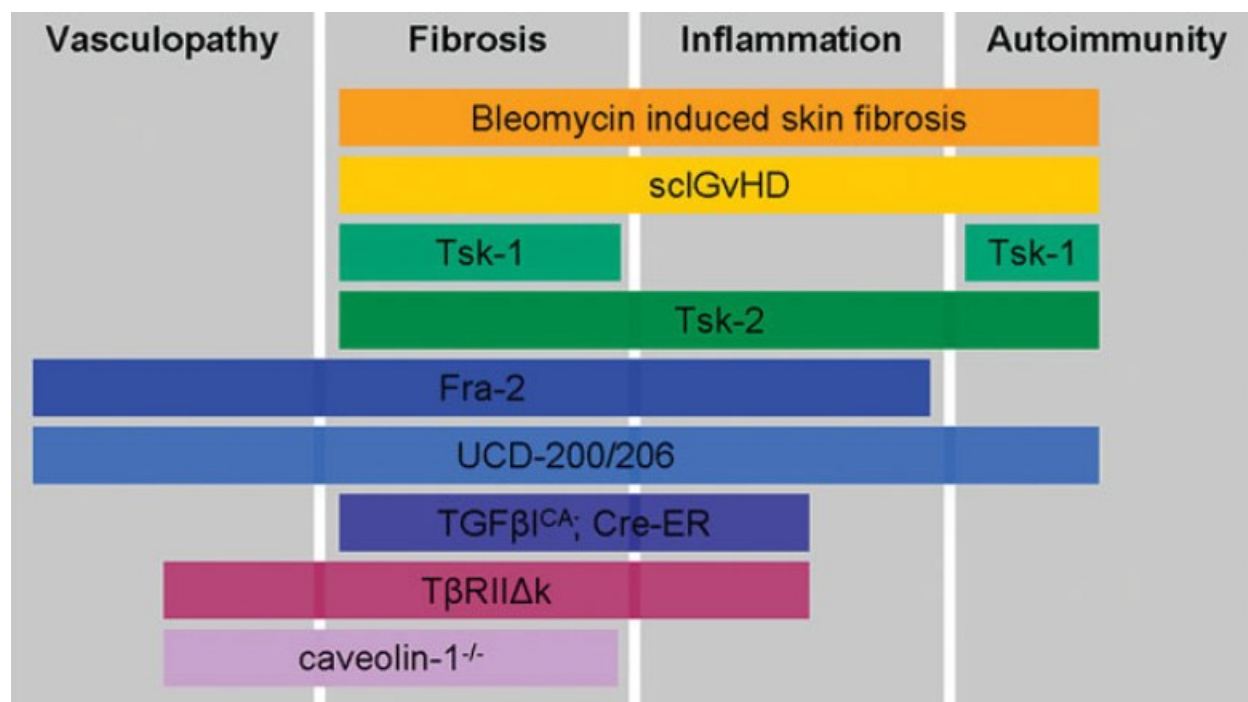
## Vasculopathie

Souvent décrite comme une maladie vasculaire auto-immune, une des caractéristiques particulières de la SSc est la vasculopathie proliférative et oblitérante, responsable de l'atteinte digitale (Katsumoto *et al.*, 2011; Pattanaik *et al.*, 2015; Matucci-Cerinic *et al.*, 2013; Asano & Sato, 2015). La vasculopathie implique des changements non-inflammatoires au niveau macrovasculaire et microvasculaire induisant l'hyperplasie intimale artérielle. Dans les deux formes de sclérodémie (lcSSc et dcSSc), on observe le développement du phénomène de Raynaud qui peut progresser précocement en ischémie périphérique, suivie par l'apparition d'ulcères digitaux et possiblement de la perte des doigts. En effet, l'ulcère digital est une complication souvent observée chez les personnes atteintes de la lcSSc puisque 35 à 50 % des patients auront des ulcères

digitaux au cours de leur maladie. L'hyperplasie intimale artérielle est un trait caractéristique des artères des personnes atteintes de la SSc et le changement dans les capillaires périunguéraux se trouve à être un des premiers symptômes de la maladie (Matucci-Cerinic *et al.*, 2013; Fleming *et al.*, 2009). Cependant, la manifestation clinique la plus dévastatrice de la SSc est attribuée à la fibrose, qui est associée à l'hyperplasie intimale dans les artères des organes affectés tels que les poumons (Matucci-Cerinic *et al.*, 2013; Fleming *et al.*, 2009).

## Modèle animal

Une meilleure compréhension de la pathogenèse de la sclérose systémique aboutirait plus efficacement à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour ce faire, il faudrait un modèle animal capable de récapituler tout le spectre de la maladie retrouvée chez l'humain. Malheureusement, parmi les modèles murins actuellement disponibles, aucun ne couvre complètement toutes les caractéristiques de la maladie (Dumoitier *et al.* 2014; Varga *et al.*, 2007; De Langhe *et al.*, 2015).



**Figure 1. Tableau résumant les principaux modèles animaux utilisés dans l'étude de la sclérodermie**

Parmi ces modèles, le plus irréfutablement utilisé pour l'étude de la SSc est sans doute le modèle murin de fibrose dermique induit par la bléomycine, isolé de la bactérie *Streptomyces verticillus* (Yamamoto *et al.*, 1999; Moeller *et al.*, 2008; Beyer *et al.*, 2010; Degryse *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014). Cependant, ce modèle présente plusieurs lacunes puisque ces souris ne possèdent aucun trait clinique de vasculopathie, une caractéristique majeure de la SSc. De plus, la majorité des produits pharmaceutiques qui traitent la fibrose induite par la bléomycine chez les souris ont échoué dans les études cliniques de phase II (Moeller *et al.*, 2008). Les échecs attribués aux essais cliniques impliquent beaucoup de temps, d'argent perdus et d'espoirs déçus pour les malades. Ce modèle de souris répond donc positivement à

plusieurs agents qui cibleraient de manière non-spécifique la fibrose non associée à la SSc (Del Galdo *et al.*, 2014).

Il existe également le modèle génétique du *Tight-skin mouse* (TSK-1) impliquant une duplication en tandem du gène fibrillin 1 qui induit un phénotype de resserrement de la peau chez ces souris en question. Cette mutation autosomique dominante a été aperçue pour la première fois chez les souris B10.D2(58N)/Sn. Les souris homozygotes avec cette mutation mouraient durant la grossesse, alors que les souris hétérozygotes développaient spontanément des caractéristiques similaires à la SSc telles que la fibrose et l'auto-immunité (Beyer *et al.*, 2010; Jimenez *et al.*, 1984; Muryoi *et al.*, 1992). Cependant, on ne trouve aucun signe de vasculopathie ni d'inflammation chez les souris TSK.

Fra-2 est une protéine activatrice 1 (AP-1) appartenant à la famille des facteurs de transcription. Les souris transgéniques exprimant le gène *Fra2* via le promoteur du CMH de classe I H-2K<sup>b</sup> développent une inflammation généralisée et de la fibrose qui se forme principalement au niveau du derme et des poumons (Beyer *et al.*, 2010). De plus, des dommages vasculaires peuvent être observés dans différents organes de la souris à l'âge de 12 semaines (poumon, peau, foie, etc.). Cependant, les souris transgéniques Fra-2 ne présentent aucun signe d'auto-immunité, une des principales caractéristiques de la SSc (Beyer *et al.*, 2010).

Finalement, les autres modèles de souris ne sont pas très représentatifs de la SSc tels que les souris Caveolin 1<sup>-/-</sup>, les souris TGFβ1<sup>CA-</sup> et Cre-ER. (Beyer *et al.*, 2010) à l'exception d'un modèle aviaire UCD-200/UCD-2006 qui couvre tout le spectre de la maladie. Toutefois l'élevage de cet animal demeure très difficile et nécessite une

certaine expertise (Beyer *et al.*, 2010). Par conséquent, la recherche sur un modèle aviaire tel que les UCD-200/UCD-206 peut être très coûteuse et complexe comparativement à un modèle murin (Beyer *et al.*, 2010).

## Hypothèse

Dans notre projet de recherche, nous postulons que la réponse immunitaire est un des facteurs initiateurs de la SSc. Le but de l'étude est de développer un nouveau modèle murin de SSc capable de couvrir les quatre principaux mécanismes pathogéniques de la maladie, en utilisant le système immunitaire inné. Ce modèle est basé sur l'immunisation répétitive sur les souris avec des DCs chargées de peptides sélectionnées de TOPOI. Ainsi, ce modèle permettrait potentiellement d'identifier de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques.

Ce mémoire se concentre sur l'analyse des principales caractéristiques de la SSc humaine dans notre nouveau modèle murin développé au laboratoire. Puisque le dépôt de collagène est associé à la principale cause de décès des patients atteints de la maladie, la fibrose sera analysée qualitativement et quantitativement suivi de l'examen de l'inflammation et de l'hyper- $\gamma$ -globulinémie de nos souris. Ensuite, quelques résultats préliminaires seront également présentés dont la concentration des cytokines dans les explants pulmonaires de nos souris ainsi que des données préliminaires sur l'expression génétique des cytokines au niveau cutané par la méthode du RT-PCR.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES.

### Préparation des cellules dendritiques

Les fémurs de souris Balb/c ont été rincés avec du milieu RPMI (complété avec 10% de FCS, 500 U/ml pénicilline, 500 mg/ml de streptomycine, 1mmol/L HEPES) et les cellules de la moelle osseuse ont été cultivées avec des facteurs de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) de *Peprotech* pendant 11 jours pour la différenciation cellulaire. Les cellules sont ensuite chargées avec des peptides de la TOPOI (10mg/ml) pour la nuit et elles sont maturés à l'aide du lipopolysaccharide (100ng/ml) pendant 4 heures à partir du *Escherichia coli* 055:B5 de *Sigma-Aldrich* (Eriksson et al., 2003).

### Souris expérimentales

Notre modèle de souris a été développé par l'étudiante postdoctorale Dre Mehta dans le laboratoire de recherche de la Dre Sarfati. Les souris (de type Balb/c) ont été élevées et logées dans des installations exemptes de pathogènes spécifiques, du Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM). Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique animalier du CRCHUM. Au point de vue génétique, la protéine topoisomérase chez la souris ressemble à 99% à la TOPOI chez l'humain. Les souris ont été immunisées avec des cellules dendritiques (DCs) chargées soit avec une séquence peptidique A appelée TOPOIA (située dans la partie N-terminale de la protéine TOPOI) ou avec une séquence peptidique B appelée TOPOIB (située dans la

partie DIDII de la protéine TOPOI) (Veeraraghavan *et al.*, 2004; Oriss *et al.*, 2001). Des cellules dendritiques non-chargées « Unpulsed DCs » ont servi de contrôle.

Les expériences ont été réalisées avec des souris âgées de 5 à 7 semaines au moment de la première immunisation et les expérimentations duraient entre 10 à 18 semaines (jour du sacrifice). Les souris appartenant au groupe I ont reçu des immunisations par la voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+SC) et les souris du groupe II ont reçu des injections intrapéritonéales/sous-cutanées (IP+SC). Pour le protocole d'immunisation, les souris ont reçu quatre injections hebdomadaires de DCs chargées (TOPOIA ou TOPOIB) ou non-chargées (Unpulsed DCs), suivies d'une pause de 5 semaines. Par la suite, elles ont été réinjectées avec un « boost » de DCs respectives (8<sup>e</sup> semaine), suivi d'une injection sous-cutanée de l'adjuvant complet de Freund (CFA) deux semaines plus tard (10<sup>e</sup> semaine). Les souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs recevaient l'injection de CFA combinée avec le peptide correspondant au groupe auquel elles appartiennent alors que les souris « Unpulsed DCs » ont reçu l'injection CFA en combinaison avec du PBS. Finalement, les souris ont été sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation pour le prélèvement de différents tissus et organes nécessaires à l'analyse de l'atteinte cutanée et pulmonaire (fibrose, inflammation, vasculopathie). Deux autres points cinétiques ont été analysés en parallèle avec notre modèle décrit ci-haut, dont les souris sacrifiées à la 10<sup>e</sup> semaine (n'ayant donc reçu aucune injection de CFA) et celles sacrifiées à la 18<sup>e</sup> semaine (analyses effectuées par la stagiaire postdoctorale Dre Mehta), soit 8 semaines après l'injection de CFA (**figure 2**).



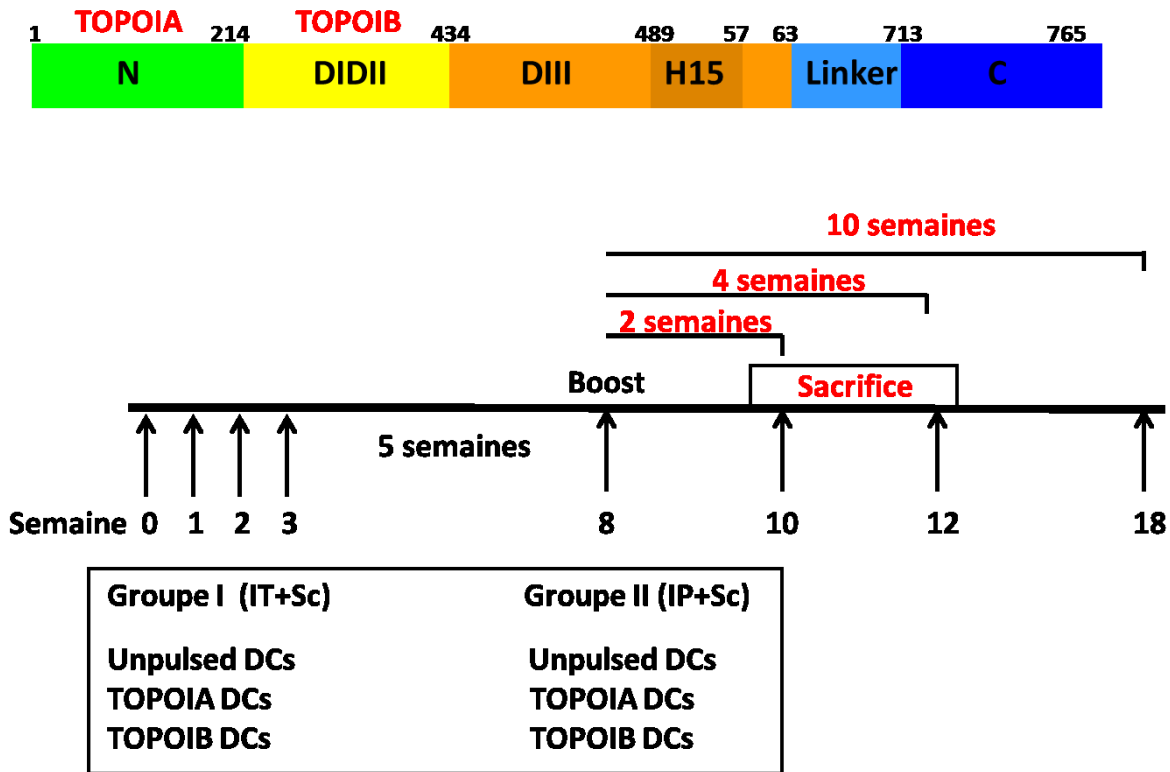


Figure 2. Schématisation de la stratégie d'immunisation dans le modèle de souris expérimentale de SSc

### Quantification de l'hyper- $\gamma$ -globulinémie polyclonale

Les concentrations totales des IgG dans le sérum de souris immunisées ont été mesurées par la méthode de l'ELISA. Les isotypes IgG1, IgG2b et IgG3 ont été dosés en utilisant les paires d'anticorps (les anticorps de capture et traceurs) de *BD Bioscience* alors que les IgG2a ont été mesurées avec les paires d'anticorps de *Southern Biotech*. Un standard pour chacun des isotypes a été établi en utilisant les anticorps de souris purifiés par affinité provenant des troussees respectives. La quantification de l'hyper- $\gamma$ -globulinémie a été effectuée par l'ELISA de type sandwich

indirect, où l'antigène cible est piégé entre l'anticorps de capture et l'anticorps de détection. Sur une microplaque de 96 puits MaxiSorp (NUNC), les anticorps de capture sont tout d'abord dilués avec du PBS 1X puis tapissés au fond des puits et le tout est incubé à 4°C pour la nuit. Ensuite, la microplaque est nettoyée (5x) à l'aide du tampon de lavage (TPBS, 0.1 % de Tween20) pour l'élimination du surplus d'anticorps de capture qui se sont mal ou pas fixé à la surface des puits. Par la suite, le tampon de blocage (PBS, 1 % BSA, 0.05 % Tween20 et 0.02 % Azide) a été utilisé pour réduire le bruit de fond en bloquant la surface inoccupée des puits. Après une incubation de 60 minutes à température ambiante, une autre étape de lavage (5x) a été effectuée, suivi d'un ajout de l'échantillon (antigène cible) dilué en série dans du tampon à dilution (PBS, 1 % BSA et 0.05 % Tween20), puis le tout a été incubé à 4°C pour la nuit. Le lendemain, la microplaque a été nettoyée (5x) et les anticorps traceurs ont été ajoutés, le tout suivi d'une incubation de 60 minutes à température ambiante. Les résidus sur la microplaque ont été éliminés avec le tampon de lavage puis la Streptavidin couplé à la HRP (HorseRadish-Peroxidase) a été ajoutée. Ayant une forte affinité pour la biotine, la Streptavidin s'est liée fortement aux anticorps traceurs qui sont préalablement couplés aux biotines par le fournisseur. Finalement, une dernière étape de nettoyage (3x) a été effectuée, avant l'ajout du substrat O-phenylenediamine (Sigma-Aldrich). Une réaction enzymatique est ainsi produite lors de l'entrée en contact du substrat avec l'enzyme, provoquant une coloration orangée dont la densité optique a pu être mesurée à 490 nm. La réaction a été arrêtée après 10 minutes en ajoutant la solution d'arrêt H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M). Les résultats ont été ensuite compilés à l'aide de la méthode de DO<sub>50</sub> (densité optique à 50 %). Pour cette technique, la densité optique moyenne (DO<sub>moyenne</sub>) a été déterminée

en identifiant la partie linéaire de la courbe puis en faisant la moyenne des densités optiques maximales ( $DO_{max}$ ) et minimales ( $DO_{min}$ ) de cette partie linéaire. Ensuite, les  $DO_{moyenne}$  ont été converties en concentration en appliquant l'équation obtenue à partir de la courbe standard.

Une fois que les concentrations sont converties à partir des densités optiques, on a produit des graphiques de type « scatter plot » à partir du logiciel *Prism version 5* de GraphPad qui permet également d'effectuer des analyses statistiques. Les résultats des différents groupes de souris expérimentaux ont été comparés avec le test « two-tailed unpaired student's t test ». Ce test statistique permet de comparer et de déterminer des différences statistiquement significatives dans la moyenne entre deux groupes de données en assumant qu'ils suivent la distribution normale gaussienne. Les « p-values » inférieures à 0.05 ne sont pas considérées significatives.

## Quantification par ELISA spécifique pour les interleukines/chimiokines

La concentration des interleukines dans les explants pulmonaires (obtenus par BALF) de souris a été mesurée en utilisant le « DuoSet ELISA Development kit » de R&D Systems (suivant les instructions du fabricant). Le standard a été établi avec les cytokines/chimiokines recombinantes de souris provenant de la trousse. Comme pour la quantification de l'hyper- $\gamma$ -globulinémie, l'ELISA de type sandwich indirect a été utilisé pour mesurer la quantité de cytokines (voir la section « Quantification de l'hyper- $\gamma$ -globulinémie polyclonale » pour le protocole détaillé). De plus, la méthode de

conversion des inconnues et l'application des tests statistiques ont été identiques à celle décrite pour la détection de l'hyper- $\gamma$ -globulinémie polyclonale.

## Hydroxyproline

Les biopsies de peau et de poumons ont été pesées puis hydrolysées pendant 72 heures à l'acide chlorhydrique 6N (à 110°C) pour la dégradation complète des tissus afin de libérer le collagène. Ensuite, l'acide a été retiré de la solution par évaporation et les résidus restants ont été remis en suspension avec 2 ml d'eau distillée. 200  $\mu$ l de l'hydrolysate a été prélevé de la solution et on a ajouté 500  $\mu$ l de la solution de ChloramineT (Sigma- Aldrich) pour l'oxydation de l'hydroxyproline. Puis 500  $\mu$ l de la solution d'Ehrlich (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés au mélange pour provoquer une réaction avec l'hydroxyproline oxydée. Cette réaction engendrait une coloration quantifiable par spectrophotométrie. L'absorbance a donc été mesurée à 555nm et une courbe standard a été générée par oxydation directe du trans-4-hydroxy-L-proline (Sigma-Aldrich).

L'hydroxyproline dans l'hydrolysate du tissu a été estimée à partir de la courbe standard et les résultats sont exprimés en %  $\mu$ g *hydroxyproline* /  $\mu$ g *tissu*. Les p-values inférieures à 0.05 sont considérées significatives.

## Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

La méthode du RT-PCR a été employée dans cette étude et des centrifugations de 2000 RPM ou de 10000 RPM ont été réalisées entre chacune des étapes mentionnées ci-dessous. À la première étape, l'ARN a été extrait à partir des échantillons de peau ou de poumon. Pour ce faire, les échantillons ont été pesés et transférés dans des M-tubes (Miltenyi) où on y ajoutait 600µl du tampon RLT+ (Qiagen). Les tubes ont ensuite été déposés dans un gentleMACS (Miltenyi) pour la dissociation mécanique des tissus. Le surnageant résultant du broyage a été transféré dans un tube gDNA Eliminator (Qiagen) pour une deuxième centrifugation. Le second surnageant a été transféré dans un tube RNAeasy (Qiagen) où on ajoutait de l'éthanol à 70 %, du tampon RW1 (Qiagen) et du tampon RPE. Après plusieurs étapes de centrifugations, nous avons obtenu 30 µl d'ARN.

À la deuxième étape, l'ARN a été transformé en ADN complémentaire en utilisant le « High Capacity RNA-to-cDNA kit » (Applied Biosystems). L'ARN résultant de la première étape a été mélangé avec du tampon RT, de l'enzyme « Reverse transcriptase » ainsi que de l'eau dépourvue d'ARN. En utilisant le gradient à température (T-gradient de Biometra), le mélange a été incubé à 37°C pendant 60 minutes, suivi d'une incubation à 95°C pendant 5 minutes et nous avons obtenu ainsi l'ADN complémentaire.

À la troisième étape, l'ADN complémentaire a été amplifié à l'aide du Real-Time (RT) PCR pour quantifier l'expression génétique des interleukines cibles. L'ADN complémentaire obtenu de la deuxième étape a été mélangé avec de l'eau traité au

DEPC, la sonde complémentaire à l'interleukine recherchée ainsi que le « master mix ». Finalement, on a utilisé le RT-PCR pour quantifier le nombre de gènes ayant exprimé les cytokines cibles et le gène témoin GAPDH a été utilisé comme contrôle.

## Coloration histologique

Pour évaluer le degré de l'atteinte pulmonaire et cutanée des souris, il existe plusieurs types de colorations tissulaires permettant d'obtenir différentes informations recherchées. La coloration d'hématoxyline et éosine (H&E) permet d'identifier l'infiltration cellulaire et de vérifier la présence d'inflammation dans certaines voies respiratoires ou vaisseaux sanguins. La coloration trichrome Masson consiste principalement à la triple coloration impliquant les noyaux, le cytoplasme et le collagène. Finalement, la coloration Van Gieson permet de différencier la néosynthèse du collagène et ainsi, le collagène nouvellement synthétisé sera d'un rose ou rouge pâle alors que le collagène mature sera coloré d'un rouge foncé.

Dans les trois colorations, il faut initialement fixer les tissus avec l'acétone à température ambiante.

### La coloration d'Hématoxyline et éosine (H&E) :

- Après la fixation, on colore les tissus avec une solution de Mayer's Hématoxyline à 0.1% pendant 15 minutes
- On rince les lames avec l'eau de robinet pendant 10 à 15 minutes (Avant de passer à l'étape suivante, on vérifie par microscope si les noyaux sont bien colorés en bleu)
- On nettoie les lames avec de l'eau distillé

- On colore les tissus en trempant les lames une douzaine de fois dans une solution à 0.5% d'Éosine acidifié
- On nettoie de nouveau les lames avec de l'eau distillé
- On accentue la coloration en mettant pendant 30 secondes dans de l'éthanol à des différentes concentrations (50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 %) et dans du xylène
- On fixe la lamelle sur la lame avec du Entellan (fixatif)

#### La coloration de trichrome Masson :

- Après la fixation, on colore les tissus avec une solution de Weigert's Iron Hématoxyline pendant 10 minutes
- On rince les lames avec l'eau de robinet pendant 10 à 15 minutes
- On nettoie les lames avec de l'eau distillé
- On colore les tissus avec une solution acide de Biebrich scarlet fuchsin pendant 15 minutes
- On fait la différenciation en mettant les tissus dans une solution acide de phosphomolybdic-phosphotungstic pendant 10 à 15 minutes
- On nettoie de nouveau les lames avec de l'eau distillé
- On colore les tissus avec une solution d'acide acétique à 1% pendant 2 à 5 minutes
- On nettoie une dernière fois les lames avec de l'eau distillé
- On accentue la coloration en mettant pendant 30 secondes dans de l'éthanol à des différentes concentrations (50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 %) et dans du xylène
- On fixe la lamelle sur la lame avec du Entellan (fixatif)

#### La coloration de van Gieson :

- Après la fixation, on colore les tissus avec une solution de Mayer's Hématoxyline à 0.1% pendant 15 minutes
- On rince les lames avec l'eau de robinet pendant 5 minutes
- On nettoie les lames avec de l'eau distillé
- On colore les tissus avec une solution de van Gieson pendant 5 à 8 minutes
- On nettoie de nouveau les lames avec de l'eau distillé
- On accentue la coloration en mettant pendant 30 secondes dans de l'éthanol à des différentes concentrations (50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 %) et dans du xylène
- On fixe la lamelle sur la lame avec du Entellan (fixatif)

## Évaluation de l'atteinte pulmonaire

Pour analyser quantitativement l'inflammation pulmonaire, une grille d'évaluation a été créée en se basant sur l'article d'Ashcroft *et al.*, 1988. En effet, les paramètres d'évaluation portent une attention particulière sur : 1) la structure du poumon et des alvéoles, 2) la qualité du collagène et 3) l'infiltration cellulaire de la bronchiole et des vaisseaux sanguins. À l'aide de la coloration H&E et de la coloration trichome Masson, on pouvait évaluer le degré de sévérité de l'atteinte pulmonaire en observant les poumons de nos souris expérimentales à un agrandissement à 250X.

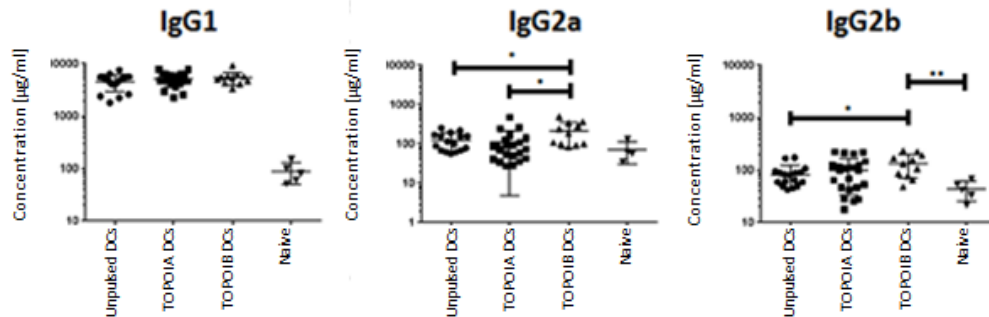
## Analyse quantitative de l'épaisseur du derme

L'épaisseur du derme des souris a été mesurée quantitativement en utilisant le logiciel ImageJ. À l'aide d'une caméra, on capturait des images provenant du microscope ajusté à 40X. Ensuite, on transférait ces images sur un ordinateur et à l'aide du programme ImageJ, nous avons de déterminer la distance entre la partie inférieure et supérieure du derme. Ce logiciel a la capacité de convertir en échelle métrique le nombre de pixels qui se retrouvent en deux points d'une image.

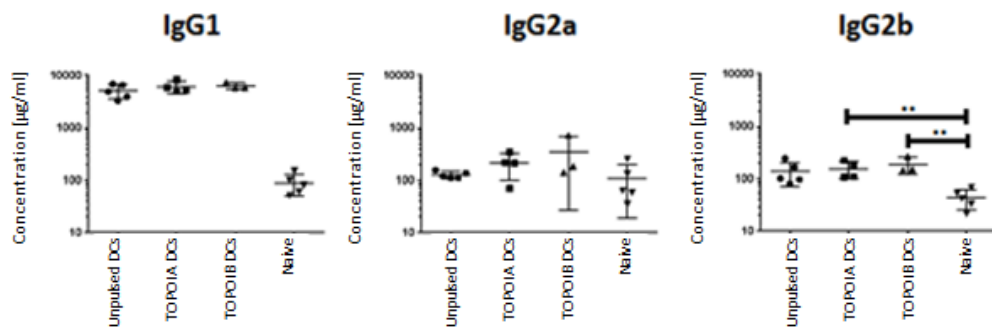


## RÉSULTATS.

### A) Injection Intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc)

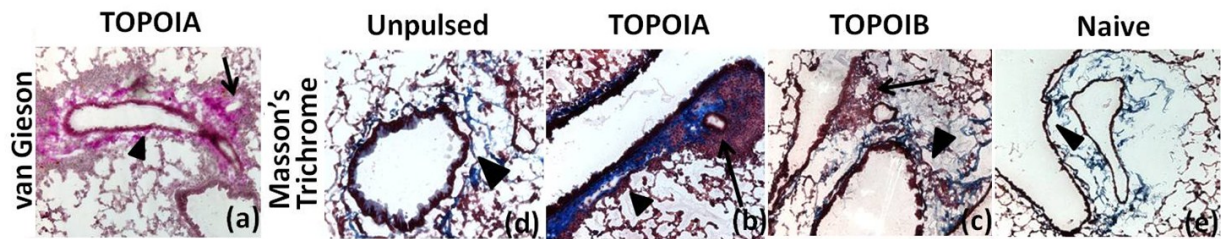


### B) Injection Intrapéritonéale/sous-cutanée (IP+Sc)

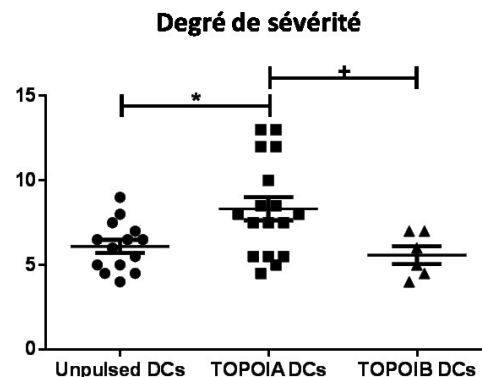


**Figure 3. Quantification de la réponse d'anticorps polyclonale comparant l'immunisation par voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) versus la voie intrapéritonéale/sous-cutanée (IP+Sc) des souris sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation**

Les analyses statistiques ont démontré que l'injection intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) induisait des augmentations significatives de la concentration des IgG2a entre les souris TOPOIB DCs comparées aux souris « Unpulsed DCs » et TOPOIA DCs ( $p$ -value = 0.0276 et 0.0168 respectivement) et induisait également des différences statistiquement significatives de la concentration des IgG2b entre les souris TOPOIB DCs comparées aux souris « Unpulsed DCs » et naïves ( $p$ -value = 0.0107 et 0.0082 respectivement). Alors que l'injection intrapéritonéale/sous-cutanée (IP+Sc) induisait des augmentations statistiquement significatives de la concentration des IgG2b chez les souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs comparativement aux souris naïves ( $p$ -value = 0.0041 et 0.0033 respectivement). « Unpaired Two-tailed Student's T test ».

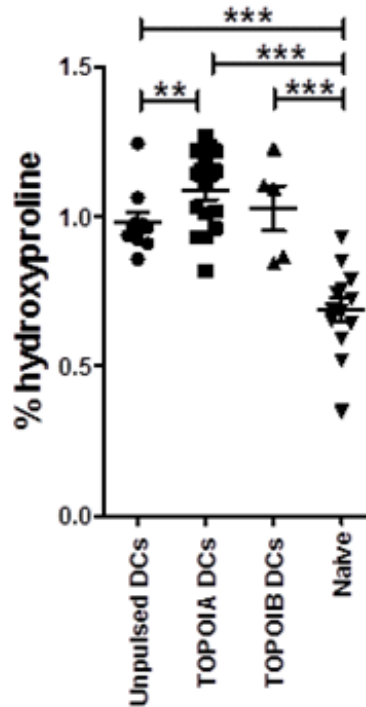


Grille d'évaluation	
<b>Vaisseaux sanguins</b>	
-	Fibrose (0-2)
-	Infiltration cellulaire (0-2)
<b>Bronches</b>	
-	Fibrose (0-3)
-	Infiltration cellulaire (0-3)
-	Mucus (0-1)
<b>Structure des poumons &amp; alvéoles</b>	
-	Fibrose (0-2)
-	Infiltration cellulaire (0-2)
-	Épaisseur (0-1)
-	Élargissement (0-2)



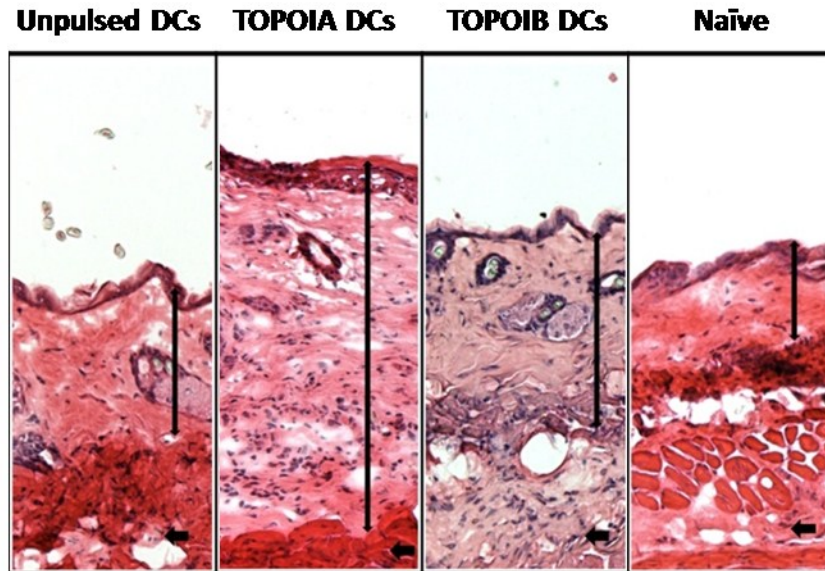
**Figure 4. Évaluation de l'atteinte pulmonaire (fibrose, vasculopathie et inflammation) des souris immunisées par voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) et sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation**

L'atteinte pulmonaire a été analysée par la coloration van Gieson et par la coloration trichrome Masson et l'agrandissement des images représentées est de 250X. De plus, une grille d'évaluation a été générée pour l'analyse semi-quantitative de l'inflammation pulmonaire basant sur des paramètres suivant : 1) la structure du poumon et des alvéoles, 2) l'atteinte en collagène et 3) l'infiltration cellulaire de la bronchiole et des vaisseaux sanguins. La sévérité de l'atteinte pulmonaire des souris a donc été évaluée à partir de ces paramètres d'évaluations. Des différences statistiquement significatives sont observées chez les souris TOPOIA DCs comparativement aux souris TOPOIB DCs et « Unpulsed DCs » ( $p$ -value = 0.0122 et 0.0327 respectivement). Dans les représentations histologiques, on observait une forte accumulation de fibrose ainsi qu'une importante infiltration cellulaire dans le poumon des souris expérimentales comparées aux souris naïves. Nous observions également la présence de mucus dans la bronchiole de nos 3 groupes de souris alors que les souris naïves ne présentaient aucune trace de mucus dans les voies respiratoires.



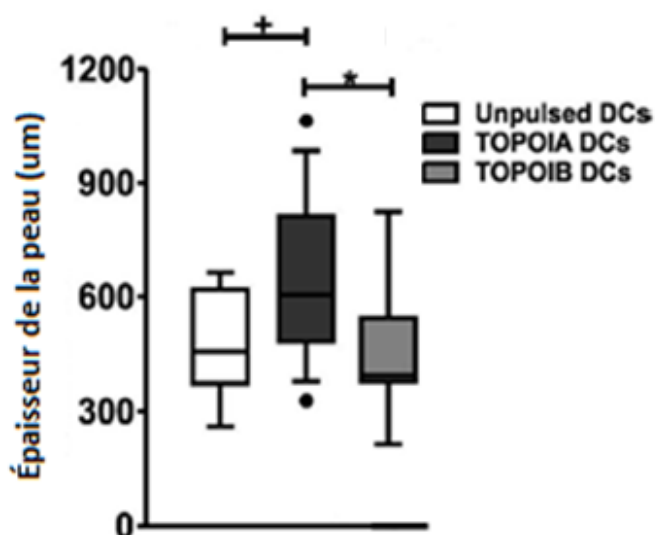
**Figure 5. Quantification de la fibrose pulmonaire par la technique de l'hydroxyproline des souris immunisées par voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) et sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation**

En comparant statistiquement le contenu en collagène de nos souris, on observait une augmentation significative du pourcentage d'hydroxyproline dans le poumon des souris TOPOIA DCs comparées aux souris « Unpulsed DCs » (p-value = 0.0047). Des augmentations statistiquement significatives du contenu en collagène sont aussi observées en comparant nos souris expérimentales aux souris naïves (p-value > 0.001,  $\geq 0.001$  et 0.006 respectivement pour les souris « Unpulsed DCs », TOPOIA DCs et TOPOIB DCs).



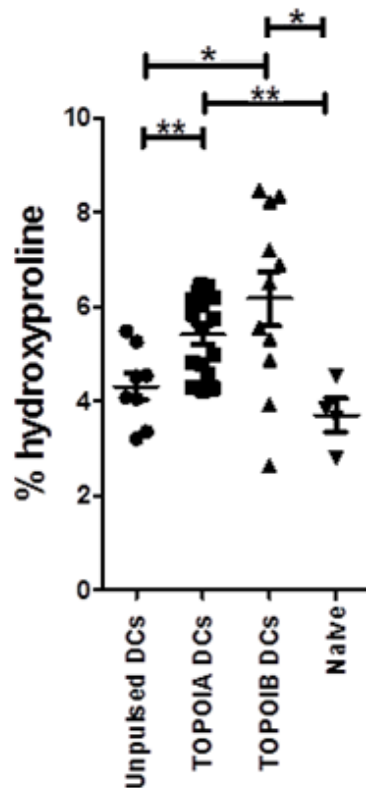
**Figure 6. Évaluation qualitative de l’atteinte cutanée des souris immunisées par voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) et sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d’expérimentation**

L’épaississement dermique de nos souris expérimentales a été analysé par la coloration H&E et par la coloration trichrome Masson. Le grossissement des images représentées est de 250X. Le derme représente la partie située entre l’épiderme et le *panniculus carnosus*. Dans l’analyse histologique, un important épaississement du derme chez les souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs a été observé comparativement aux souris naïves. De plus, l’hypoderme des souris expérimentales TOPOIA DCs démontrait une importante infiltration inflammatoire.



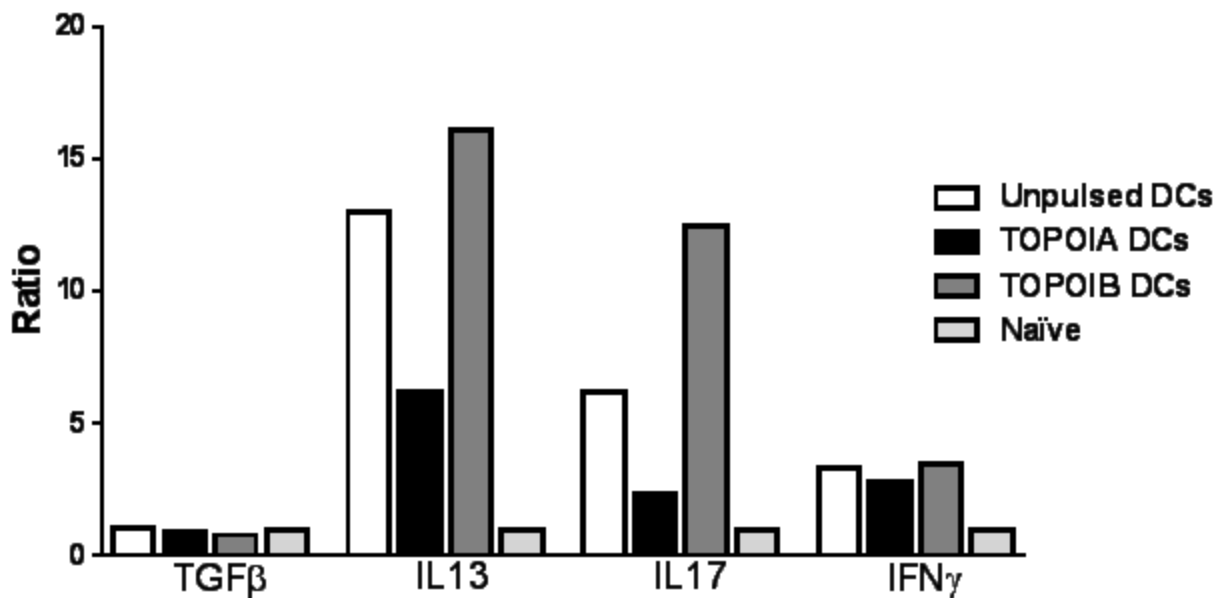
**Figure 7. Évaluation quantitative de l'épaisseur cutanée des souris immunisées par voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) et sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation**

À l'aide du logiciel ImageJ, l'analyse quantitative démontrait qu'il y avait des augmentations statistiquement significatives de l'épaississement cutané (incluant l'épiderme, derme et l'hypoderme) des souris TOPOIA DCs en comparaison avec les souris TOPOIB DCs (p-value = 0.0354) et les souris « Unpulsed DCs » (p-value = 0.0491).



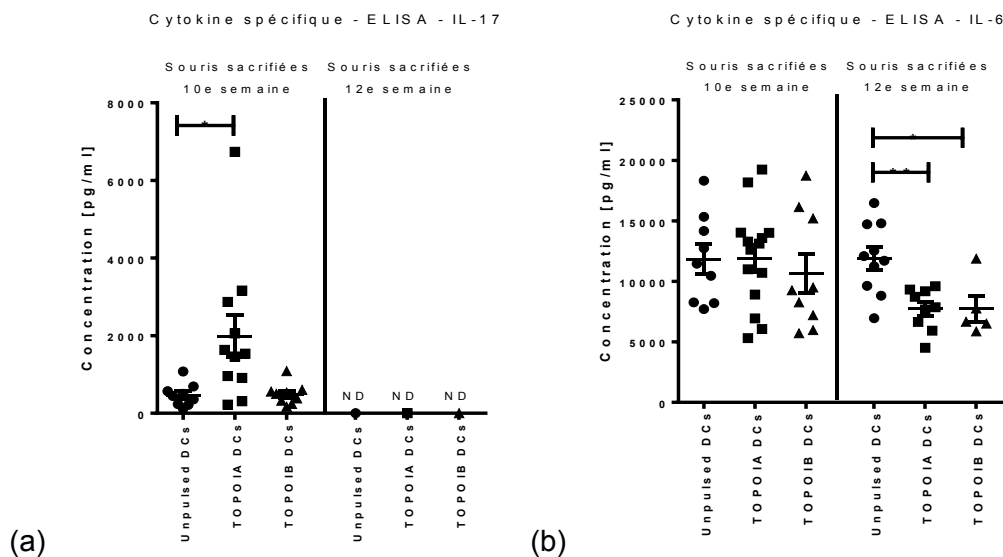
**Figure 8. Quantification de la fibrose cutanée par la technique de l'hydroxyproline des souris immunisées par voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) et sacrifiées à la 12e semaine d'expérimentation**

Des différences statistiquement significatives du contenu en hydroxyproline sont observées chez les souris TOPOIA DCs comparativement aux souris naïves et « Unpulsed DCs » (p-value = 0.0014 et 0.0053 respectivement). Par ailleurs, des augmentations statistiquement significatives du contenu en hydroxyproline sont aussi trouvées entre les souris TOPOIB DCs avec les souris naïves et « Unpulsed DCs » (p-value = 0.0276 et 0.0192 respectivement).



**Figure 9. Expression génétique de l'IL-13, IL17, IFN $\gamma$  et TGF- $\beta$  par la technique de RT-PCR des souris expérimentales**

Les résultats très préliminaires (n = 3) suggéraient que l'expression de l'IL-13 et l'IL-17 semblait augmenter dans la peau des souris TOPOIA DCs comparativement au groupe contrôle, alors qu'aucune augmentation n'a été observée dans l'expression de l'IFN $\gamma$  et TGF- $\beta$ . Les résultats indiquaient que la technique est au point et peut être utilisée pour obtenir des résultats probants sur un grand nombre de souris.



**Figure 10. Quantification de l'IL-17 et l'IL-6 dans les explants pulmonaires entre les souris immunisées par voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) qui ont été sacrifiées à la 10<sup>e</sup> semaine (dépourvue de l'injection CFA) et à la 12<sup>e</sup> semaine (avec injection CFA)**

Chez les souris sacrifiées à la 10<sup>e</sup> semaine d'expérimentation, on a observé une augmentation statistiquement significative de la concentration des cytokines IL-17 dans les explants pulmonaires de nos souris TOPOIA DCs comparativement aux souris « Unpulsed DCs » (p-value = 0.0265) (ND = Non-déterminé). Chez les souris sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation, on a observé des augmentations statistiquement significatives de la concentration des cytokines IL-6 dans les explants pulmonaires des souris « Unpulsed DCs » comparativement aux souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs (p-value = 0.0017 et 0.0171 respectivement).



## RÉSULTATS.

### **A. L'immunisation par la voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) de DCs chargées de peptides de la TOPOI favorise une réponse de type IgG2a et IgG2b alors que la voie intrapéritonéale/sous-cutanée (IP+Sc) induit une réponse de type IgG2b**

Différentes analyses ont été effectuées dans le but de caractériser notre modèle murin de SSc. Premièrement, le dosage de différentes sous-classes des IgG a été effectué dans le sérum de nos souris expérimentales (**figure 3**). Indépendamment de la stratégie d'immunisation, on observait une augmentation d'environ 100x de la concentration des IgG1 chez nos souris expérimentales comparativement aux taux sériques observés chez les souris naïves. Toutefois, il n'y avait aucune hausse appréciable de la réponse de type IgG3 dans nos souris expérimentales (Résultats non présentés). Chez les souris immunisées par la voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+sc), on observait plusieurs augmentations statistiquement significatives de la concentration IgG2a et IgG2b dans le sérum des souris TOPOIB DCs comparativement à celui des souris TOPOIA DCs, « Unpulsed DCs » et des souris naïves. Tandis que les souris immunisées par la voie intrapéritonéale/sous-cutanée (IP+Sc), on remarquait que quelques augmentations statistiquement significatives de la réponse de type IgG2b des souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs comparativement aux groupes de souris naïves. Ainsi, nous avons concentré la majorité de nos études sur les souris immunisées par la voie intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) puisque nous obtenions plus de résultats avec des augmentations statistiquement significatives entre les groupes expérimentaux comparativement aux groupes de souris naïves.

## **B. L'immunisation avec TOPOIA DCs induit inflammation, fibrose et vasculopathie pulmonaires**

Des analyses qualitatives et semi-quantitatives de l'inflammation et de la fibrose pulmonaires ont été effectuées chez nos souris expérimentales. À l'aide de la coloration van Gieson, on observait une importante concentration de collagène (coloration rose) autour de la bronchiole et des vaisseaux sanguins, ce qui démontrait la présence de fibrose dans les poumons des souris TOPOIA DCs (**figure 4a**). Utilisant la triple coloration de trichrome Masson, on pouvait différencier et identifier clairement l'accumulation de collagène (coloration bleue) et l'infiltration cellulaire (coloration rose/rouge). En observant les poumons de souris naïves (**figure 4e**) et de souris « Unpulsed DCs » (**figure 4b**), on remarquait que l'accumulation de collagène est minimale et que l'infiltration cellulaire était quasiment inexistante. Les poumons de souris TOPOIB DCs démontraient une importante accumulation cellulaire au niveau des vaisseaux sanguins, accompagnés d'un léger dépôt de collagène (**figure 4d**). Chez les souris TOPOIA DCs, on observait une importante infiltration cellulaire autour des vaisseaux sanguins et des bronches en plus de la présence de collagène au niveau de la bronchiole démontrant la présence d'un processus inflammatoire important (semblable aux observations obtenues avec la coloration van Gieson) et le développement de fibrose dans les poumons de ces souris (**figure 4c**). De plus, une grille d'évaluation a été générée pour déterminer la sévérité de l'atteinte pulmonaire en se basant sur la mesure semi-quantitative des paramètres suivants : 1) la présence du mucus, la structure du poumon et des alvéoles, 2) l'accumulation de collagène et 3) l'infiltration cellulaire de la bronchiole et des vaisseaux sanguins (**figure 4f**). En utilisant

cette grille d'évaluation, il apparaissait que l'atteinte pulmonaire était significativement plus sévère chez les souris immunisées avec les peptides TOPOIA DCs que chez les souris appartenant aux autres groupes (**figure 4g**). Alors, nos résultats démontraient que les DCs chargées avec le peptide TOPOIA étaient plus efficaces dans l'induction de la réponse inflammatoire.

### **C. Les souris TOPOIA DCs développent une fibrose pulmonaire**

Pour valider l'accumulation de collagène observée par immunohistochimie dans les poumons, le collagène a été quantifié par la méthode d'évaluation de l'hydroxyproline. On a observé que les poumons de nos souris expérimentales avaient une augmentation statistiquement significative du contenu en hydroxyproline comparativement aux souris naïves (**figure 5**). De plus, il y avait une différence statistiquement significative du pourcentage d'hydroxyproline entre les souris TOPOIA DCs et les souris « Unpulsed DCs ». Enfin, les souris TOPOIB DCs induisaient très peu de fibrose pulmonaire. Par ailleurs, il est à noter que les résultats ont été observés à partir des souris immunisées par la voie intratrachéale + sous-cutanée (IT+Sc). Ces résultats corroborent l'analyse semi-quantitative sur la sévérité de l'atteinte pulmonaire qui a été observée chez les souris immunisées par la TOPOIA DCs.

#### **D. Les souris immunisées avec des peptides de la TOPOI développent de l'inflammation cutanée**

Des études qualitatives et quantitatives de l'inflammation et de la fibrose ont été aussi effectuées dans la peau (**figure 6 et 7**). Situé entre l'épiderme et le *panniculus carnosus*, le derme fait partie des composants de la peau et est facilement identifiable grâce à sa cellularité. La coloration H&E et la coloration trichrome Masson ont été utilisées pour cette évaluation histologique (**figure 6**). Il y avait un important épaissement du derme chez les souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs comparativement aux autres groupes de souris. En utilisant le programme ImageJ, j'ai effectué une analyse quantitative de l'épaisseur du derme et de l'hypoderme (**figure 7**) et j'ai observé que la peau des souris immunisées avec TOPOIA DCs mesurait en moyenne 600 µm, ce qui représentait une augmentation statistiquement significative en comparaison avec les souris TOPOIB DCs ou « Unpulsed DCs ». De plus, il est à noter que l'infiltration cellulaire était présente dans la graisse sous-cutanée des souris immunisées par les TOPOIA DCs (Résultats non-montés).

#### **E. Les souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs développent une fibrose cutanée**

Comme dans les poumons, l'étude quantitative de la fibrose cutanée (**figure 8**) a été effectuée à l'aide de la technique de dosage de l'hydroxyproline. Le pourcentage d'hydroxyproline était relativement plus élevé dans la peau que dans les poumons puisque les souris adultes produisent naturellement du collagène au niveau de la peau. En effet, le contenu moyen en hydroxyproline chez les souris naïves est d'environ 3.5 µg hydroxyproline/mg de peau alors que dans les poumons, le taux moyen est moins de

1 µg hydroxyproline/mg de poumon. En comparant le pourcentage d'hydroxyproline entre nos groupes de souris, le pourcentage de collagène cutané était statistiquement plus élevé chez les souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs qu'aux souris naïves et aux souris « Unpulsed DCs ». Parmi les souris TOPOIB DCs, certaines avaient un contenu en hydroxyproline de plus de 8 µg hydroxyproline/mg tissu. En concordance avec les résultats histochimiques, ces souris démontraient un important épaissement de l'hypoderme accompagné d'une infiltration cellulaire et d'un dépôt de collagène.

#### **F. Analyse moléculaire des cytokines dans la peau**

Des analyses préliminaires des gènes potentiellement impliqués dans le processus fibrotique ont été effectuées au niveau de la peau en utilisant le RT-PCR (**figure 9**) pour l'analyse de l'expression des gènes inflammatoires TGF-β, IL-13, IL-17 et IFN-γ. Ainsi, l'expression génétique du TGF-β, IL-13, IL-17 et IFN-γ a été quantifiée. Nos souris expérimentales sont comparées aux souris naïves qui sont utilisées comme référence (ratio = 1). Ces résultats indiquaient que nos souris expérimentales exprimaient très peu ou quasiment pas de TGF-β en comparaison avec les souris naïves alors que l'expression des cytokines IL-13, IL-17 et IFNγ était augmentée. Les souris TOPOIB DCs exprimaient plus d'IL-13 et d'IL-17 lorsqu'elles sont comparées aux souris « Unpulsed DCs » et TOPOIA DCs. Puisque ces résultats sont encore très préliminaires (n = 3), aucune analyse statistique n'a été effectuée. Ces résultats devront être confirmés sur un plus grand nombre de spécimens pour être probants.

## G. Quantification de l'inflammation pulmonaire par le dosage de cytokines

Une augmentation de la réponse Th1, Th2 et/ou plus récemment Th17 a été décrite chez les personnes atteintes de SSc (Okamoto *et al.*, 2012; Radstake *et al.* 2009; Truchetet *et al.* 2013; Valentini *et al.* 2001). Nous avons donc examiné la réponse de type Th2 en dosant les IL-13 dans les explants pulmonaires de nos souris (McKenzie *et al.*, 1998) mais ces cytokines n'ont pas été détectées (résultats non présentés). Nous avons poursuivi l'étude en examinant la réponse Th17 par le dosage des IL-6 et IL-17 puisqu'elles ont des implications dans la régulation des lymphocytes T auxiliaire 17 (Th17) chez les souris et les humains (Michel *et al.*, 2012). Alors que l'IL-6 était en faible concentration chez les souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs, il a été impossible de détecter la présence d'IL-17 dans les explants pulmonaires chez les souris sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation (**figure 10a**). Suivant le concept que l'inflammation précède la fibrose, nous avons donc analysé les explants pulmonaires de souris sacrifiées à un temps plus précoce. Ainsi, nous avons dosé la concentration des IL-6 et IL-17 chez les souris qui sont sacrifiées à la 10<sup>e</sup> semaine d'expérimentation (avant l'immunisation par le peptide émulsifié du CFA). Une augmentation statistiquement significative de la concentration des IL-17 est observée chez les souris TOPOIA DCs comparativement aux souris « Unpulsed DCs ». Il y avait également une augmentation appréciable de la concentration d'IL-6 chez les souris TOPOIA DCs sacrifiées à la 10<sup>e</sup> semaine comparée aux souris sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation (**figure 10b**). Ces résultats indiquaient que l'immunisation sous-cutanée avec le peptide TOPOIA émulsifié dans du CFA augmente la réponse d'anticorps chez nos souris expérimentales mais diminue la production d'IL-6 et IL-17.

## DISCUSSION.

Des études antérieures ont montré que les DCs sont impliquées dans différentes maladies auto-immunes et ont contribué également à la progression de plusieurs maladies inflammatoires chroniques (Lu TT, 2011; Raymond *et al.*, 2011; Weir *et al.*, 2002; Eriksson *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2015). Jusqu'à présent, aucun modèle de souris ne reflète toutes les principales caractéristiques de la SSc retrouvées chez l'humain (Dumoitier *et al.* 2014; Varga *et al.*, 2007; Beyer *et al.* 2010). L'équipe de Dre Sarfati a développé un modèle murin induit par des DCs chargées avec des peptides de la TOPOI. L'hypothèse de travail était fondée sur les modèles de souris développant une l'encéphalite ou une myocardite auto-immune expérimentale suite à l'immunisation avec des DCs chargées de peptides d'auto-antigènes respectifs (Weir *et al.*, 2002; Eriksson *et al.*, 2003). Par ailleurs, il y a des accumulations de DCs matures en présence avec des lymphocytes T dans les tissus pulmonaires de patients atteints de la fibrose pulmonaire idiopathique (Marchal-Somme *et al.*, 2006). Les DCs sont également considérées comme des cellules clés pro-inflammatoires dans le modèle murin de bléomycine puisque ces cellules seraient responsables de l'inflammation et de la fibrose pulmonaire (Bantsimba-Malanda *et al.*, 2010). Toutefois, on observe une atténuation de la fibrose pulmonaire lorsqu'on prévient l'accumulation de DCs au niveau des poumons de ces souris (Bantsimba-Malanda *et al.*, 2010). Il y a également de l'accumulation accrue des CD11c+ DCs co-localisées avec des cellules T activées au niveau des poumons (Bantsimba-Malanda *et al.*, 2010) et des  $\alpha$ SMA+ myofibroblastes au niveau du derme (Lu TT, 2011) des souris induites par la bléomycine.

Ce travail a permis de démontrer que les DCs chargées avec la TOPOI étaient capables d'induire des symptômes semblables à ceux observés dans la SSc chez l'humain. En effet, nos souris développaient des caractéristiques telles que l'inflammation pulmonaire et cutanée suivie de fibrose diffuse. La vasculopathie ainsi qu'un taux élevé d'anticorps polyclonaux étaient également observés chez ces souris. Initialement, nous avons immunisé les souris simultanément avec des DCs chargées séparément de deux séquences peptidiques distinctes de la protéine TOPOI qui sont situées dans la partie N-terminale (TOPOIA) et dans la partie DIDII (TOPOIB) (Résultats non-montrés). Ensuite, une étude plus approfondie a été effectuée pour analyser le rôle respectif de chacun des peptides. Nos résultats démontraient que les DCs chargées avec le peptide TOPOIA étaient plus efficaces dans l'induction de la réponse inflammatoire, ainsi responsable de la fibrose pulmonaire et cutanée, alors que les DCs chargées avec le peptide TOPOIB étaient impliquées principalement dans le développement d'auto-anticorps spécifique de la topo-isomérase I et la fibrose cutanée. Il a été démontré chez l'humain que le peptide TOPOIA induit des réponses d'auto-anticorps, surtout chez les personnes dirigeant vers la forme sévère de la SSc (Simon et al., 2009; Muryoi et al., 1992). En comparaison, le peptide TOPOIB induit fortement une réponse cellulaire de toutes les personnes atteintes de SSc (Veeraraghavan et al., 2004; Oriss et al., 2001). Collectivement, les données obtenues chez l'humain et de nos souris expérimentales suggéreraient que la pathogenèse de la SSc dépend de la région spécifique de la protéine TOPOI (TOPOIA [dans la partie N-terminale] vs TOPOIB [dans la partie DIDII]).



Les immunisations de DCs chargées de peptides de la TOPOI par injection intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) et intrapéritonéale/sous-cutanée (IP+Sc) provoquaient d'importants productions d'IgG polyclonaux. Pour ces deux voies d'injection, la réponse immunitaire de type IgG3 était faible (résultats non présentés) alors qu'il y avait une augmentation très marquée de la réponse de type IgG1 dans les trois groupes de souris expérimentales (TOPOIA, TOPOIB et « Unpulsed DC »), signifiant que la réponse immunitaire de type IgG1 était antigène-indépendante. Je me suis donc concentré sur les autres sous-classes des IgG, soit la réponse de type IgG2a ou IgG2b. Effectivement, des augmentations statistiquement significatives de la réponse IgG2a et IgG2b ont été observées chez les souris expérimentales comparativement aux souris naïves. L'injection intratrachéale/sous-cutanée (IT+Sc) induit une augmentation prédominante des IgG2a et IgG2b alors que l'injection intrapéritonéale/sous-cutanée (IP+Sc) induit une augmentation de la réponse immunitaire de type IgG2b. Nous avons également observé une augmentation de la réponse immunitaire polyclonale de nos souris ayant reçu l'injection de CFA comparativement celles dépourvues de cette injection (Résultats non présentés), une conclusion partagée avec une équipe de recherche japonaise qui avait observé une surexpression de fibrose cutanée chez les souris ayant reçu 4 injections consécutives avec du CFA (Yoshizaki *et al.*, 2011). Cette procédure utilisée par l'équipe de recherche japonaise est toutefois interdite par le comité de protection des animaux du Canada. Par ailleurs, l'augmentation de la réponse d'anticorps chez les souris expérimentales correspond à celle observée chez les personnes atteinte de SSc qui ont également une augmentation de la production des IgG par des cellules mémoires B (Sato *et al.*, 2004).

En accord avec l'hypothèse « No inflammation, no fibrosis » publiée par Wick et al., les résultats histologiques des souris TOPOIA DCs (sacrifiées à la 10<sup>e</sup> semaine d'expérimentation) suggéraient que le développement de l'inflammation pulmonaire précédait celui de la fibrose (Résultats non présentés). Les observations au niveau des poumons démontraient également que les souris TOPOIA DCs (sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation) avaient des infiltrations cellulaires beaucoup plus sévères et des fibroses pulmonaires plus accrues que les autres groupes de souris. Ces observations ont ensuite été confirmées par une évaluation semi-quantitative basée sur une grille d'évaluation établie par l'équipe du laboratoire et d'après l'article d'Ashcroft *et al.*, 1988. De plus, les observations histologiques au niveau cutané permettaient de conclure que les souris TOPOIA DCs avaient un épaissement du derme ainsi qu'une infiltration cellulaire hypodermique beaucoup plus importants que celui des souris expérimentales « Unpulsed DCs ». Alors que le peptide TOPOIB était responsable majoritairement de l'épaississement du derme, les souris immunisées avec TOPOIA semblaient montrer un épaissement cutané plus important. Chez l'humain, les analyses histologiques ont démontré que l'épaississement cutané des patients atteints de la SSc est principalement au niveau du derme (Jinnin, 2010). Comme mentionné antérieurement, l'accumulation de collagène cutané chez les souris est un processus naturel au cours du vieillissement ce qui explique le léger épaissement du derme chez une souris naïve d'âge adulte. Cependant, les épaissements observés chez nos souris TOPOIA DCs sont plus marqués que les autres groupes de souris et plus spécifiquement, la peau (épiderme, derme et hypoderme) de ces souris mesurait presque le double de celle des souris naïves.

Considérant que l'hydroxyproline est un acide aminé non-protéogénique qui se retrouve seulement dans le collagène et dans l'élastine des mammifères ainsi que dans certaines protéines végétales (Shoulders & Raines, 2009), la quantification de l'hydroxyproline semblait idéale pour évaluer le contenu en collagène dans les tissus puisque cet acide aminé se retrouve en abondance. Différents tissus et organes ont été analysés pour quantifier le collagène par la méthode de l'hydroxyproline et, dans des résultats non présentés, nous avons également fait l'étude de la fibrose cutanée proximale versus distale. En effet, notre modèle est le premier modèle murin de SSc qui démontre une forte présence de fibrose cutanée, même au-delà d'un millimètre du site d'injection. Dans plusieurs modèles murins, dont celui induit par la bléomycine, la fibrose est quasiment inexistante au-delà du millimètre de circonférence du site d'injection alors que dans notre modèle de souris, la fibrose était présente même à 18 mm du site d'injection (Résultats non présentés, manuscrit soumis par le laboratoire ; Lakos *et al.* 2004). Ceci révélait que l'immunisation avec les DCs chargées de peptides de la TOPOI induisait de la fibrose diffuse. Nous avons également analysé la composition en hydroxyproline dans d'autres organes tels que les reins de nos souris expérimentales, où une augmentation du collagène est également observée (résultats non présentés, manuscrit soumis par le laboratoire). Les résultats démontraient aussi que l'accumulation de collagène dans les poumons et dans la peau des souris TOPOIA DCs et TOPOIB DCs était supérieure comparativement aux souris naïves, confirmant ainsi les observations histologiques effectuées sur nos modèles expérimentaux de SSc. Conformément à ce qui est rapporté chez les personnes atteintes de SSc, où la fibrose est systémique et touche donc plusieurs organes vitaux (Ebmeier & Horsley, 2015), nos

souris présentaient également une accumulation de fibrose dans tous les organes analysés (peau, poumons, rein, etc.).

Les réponses immunitaires adaptatives et innées semblent contribuer au développement de la fibrose (van Bon L *et al.* 2011; Chizzolini *et al.* 2011; Gu *et al.* 2013). Dans l'étude préliminaire du profil des cytokines, nous avons observé une augmentation de IL-17 dans le surnageant d'explants pulmonaires des souris sacrifiées précocement à la 10<sup>e</sup> semaine d'expérimentation. Le profil de la réponse adaptative incluant Th1, Th2 et Th17 est toujours débattu dans la SSc (Okamoto *et al.*, 2012; Radstake *et al.* 2009; Valentini *et al.* 2001; Truchetet *et al.* 2013). Par conséquent, la contribution des Th17 reste encore à prouver. L'administration de CFA à la 10<sup>e</sup> semaine d'expérimentation augmentait la réponse immunitaire polyclonale mais cette injection de CFA diminuerait la production des interleukines. La concentration des IL-17 était indétectable dans l'explant pulmonaire chez les souris ayant reçu une injection de CFA à la 10<sup>e</sup> semaine (sacrifiées à la 12<sup>e</sup> semaine d'expérimentation) alors qu'il y avait une augmentation statistiquement significative de la concentration des IL-17 entre les souris expérimentales dépourvues de cette injection de CFA (sacrifiées à la 10<sup>e</sup> semaine d'expérimentation).

Dans des études en cours, nous avons également examiné au niveau moléculaire l'expression des cytokines qui sont impliquées dans le processus fibrotique par la technique de RT-PCR. Cette méthode a permis d'identifier les cytokines exprimées dans la peau de nos souris expérimentales. En utilisant les souris naïves comme référence, on a remarqué que les souris TOPOIB DCs sembleraient exprimer fortement les gènes codant pour IL-13, IL-17 et IFN $\gamma$  comparativement aux autres groupes de

souris expérimentaux. De plus, les cytokines IL-13, IL-17 et IFN $\gamma$  sembleraient exprimer chez les souris « Unpulsed DCs ». Les données étaient encore très préliminaires, aucune conclusion n'a pu être tirée de cette étude puisque le nombre d'échantillons utilisés était insuffisant (n=3). Les perspectives pour la continuation de ce projet sont tout d'abord d'augmenter le nombre d'échantillons de peau pour confirmer les résultats préliminaires et établir des comparaisons statistiques. Ensuite, il faudra également analyser l'expression des cytokines au niveau des poumons et des reins de nos souris expérimentales par RT-PCR. Par ailleurs, il faudra approfondir l'étude de la fibrose par la coloration histologique des  $\alpha$ SMA+ ( $\alpha$ -smooth muscle actin positive), marqueurs des myofibroblastes.

## CONCLUSION.

Les souris traitées par la bléomycine et le réarrangement du gène Tsk-1 ont contribué grandement à la compréhension de la maladie, étant les deux principaux modèles pour l'étude de la SSc, mais ces souris ont plusieurs limitations et lacunes (Dumoitier *et al.* 2014; Moeller *et al.* 2008; Beyer *et al.* 2010; Del Galdo *et al.* 2014). Les souris Tsk-1 développent de la fibrose cutanée systémique mais au niveau des poumons, elles développent de l'emphysème au lieu de la fibrose pulmonaire (Szapiel *et al.*, 1981). Les souris traitées par la bléomycine ont une importante fibrose pulmonaire qui est cependant réversible à l'arrêt de l'administration de la bléomycine, ce qui limite l'évaluation de l'efficacité des produits pharmaceutiques contre la SSc (Chung *et al.*, 2003). Contrairement à ces deux modèles murins, nos souris expérimentales développent de l'inflammation interstitielle pulmonaire chronique avec un épaississement septal alvéolaire associé à une infiltration cellulaire et de la fibrose. Nos souris présentent également des atteintes pulmonaires qui seraient donc semblables à la pneumonie interstitielle non-spécifique observée dans les poumons des patients atteints de la SSc (Murray *et al.*, 2012). Actuellement, aucun modèle murin disponible ne récapitule complètement toutes les caractéristiques de la maladie observée chez l'humain. En étudiant de manière encore plus approfondie le profil de la réponse immunitaire de notre modèle de souris, nous pourrions mieux comprendre l'étiologie et la pathogénèse de cette maladie complexe. Notre modèle expérimental pourrait mieux compléter les modèles animaux actuellement utilisés dans l'étude préclinique de la SSc. Dans un futur rapproché, il sera donc possible et envisageable de faire des essais

thérapeutiques précliniques sur notre modèle avec certains médicaments en développement contre la SSc.

## BIBLIOGRAPHIE.

1. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. *The pathogenesis of systemic sclerosis*. Annu Rev Pathol. 2011;6:509-37. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130312.
2. Dumoitier N, Lofek S, Mouthon L. *Pathophysiology of systemic sclerosis: State of the art in 2014*. Presse Med. 2014 Oct;43(10 Pt 2):e267-78. doi: 10.1016/j.lpm.2014.08.001.
3. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. *Pathogenesis of Systemic Sclerosis*. Front Immunol. 2015 Jun 8;6:272. doi: 10.3389/fimmu.2015.00272
4. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. *Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities*. Nat Rev Rheumatol. 2011 Oct 25;8(1):42-54. doi: 10.1038/nrrheum.2011.149
5. Domsic RT. *Scleroderma: the role of serum autoantibodies in defining specific clinical phenotypes and organ system involvement*. Curr Opin Rheumatol. 2014 Nov;26(6):646-52. doi: 10.1097/BOR.0000000000000113
6. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite AE. *Vascular involvement in systemic sclerosis (scleroderma)*. J Inflamm Res. 2011;4:105-25. doi: 10.2147/JIR.S18145.
7. Varga J, Abraham D. *Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder*. J Clin Invest. 2007 Mar;117(3):557-67.
8. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. *Scleroderma*. N Engl J Med. 2009 May 7;360(19):1989-2003. doi: 10.1056/NEJMra0806188.



9. Artlett CM. *Animal models of scleroderma: fresh insights*. Curr Opin Rheumatol. 2010 Nov;22(6):677-82. doi: 10.1097/BOR.0b013e32833e307b
10. Ramos-Casals M, Fonollosa-Pla V, Brito-Zeron P, Siso-Almirall A. *Targeted therapy for systemic sclerosis: how close are we?* Nat Rev Rheumatol. 2010 May;6(5):269-78. doi: 10.1038/nrrheum.2010.48.
11. Stummvoll GH. *Current treatment options in systemic Sclerosis (Scleroderma)*. Acta Med Austriaca. 2002;29(1):14-9.
12. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. *Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer*. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2009 Jan;3(1):73-80.
13. Lafyatis R, Kissin E, York M, Farina G, Viger K, Fritzler MJ, Merkel PA, Simms RW. *B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis*. Arthritis Rheum. 2009 Feb;60(2):578-83. doi: 10.1002/art.24249.
14. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpissinger TF, Feichtinger J, Zelger B et al. *The immunology of fibrosis*. Annu Rev Immunol. 2013;31:107-35. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095937.
15. van Bon L, Cossu M, Radstake TR. *An update on an immune system that goes awry in systemic sclerosis*. Curr Opin Rheumatol. 2011 Nov;23(6):505-10. doi: 10.1097/BOR.0b013e32834b0dac.
16. Sondergaard K, Stengaard-Pedersen K, Zachariae H, Heickendorff L, Deleuran M, Deleuran B. *Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) in scleroderma skin*. Br J Rheumatol. 1998 Mar;37(3):304-10.

17. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. *Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma*. J Pathol. 1992 Mar;166(3):255-63.
18. Senecal JL, Henault J, Raymond Y. *The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma)*. J Rheumatol. 2005 Sep;32(9):1643-9.
19. Lu TT. *Dendritic Cells: Novel Players in Fibrosis and Scleroderma*. Curr Rheumatol Rep. 2012 Feb;14(1):30-8. doi: 10.1007/s11926-011-0215-5.
20. Wynn TA, Ramalingam TR. *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nat Med. 2012 Jul 6;18(7):1028-40. doi: 10.1038/nm.2807.
21. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. *Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis*. Autoimmun Rev. 2011 Mar;10(5):276-81. doi: 10.1016/j.autrev.2010.09.016.
22. Koenig M, Dieude M, Senecal JL. *Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies*. Autoimmun Rev. 2008 Sep;7(8):588-93. doi: 10.1016/j.autrev.2008.06.010.
23. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G et al. *Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis*. Arthritis Rheum. 2008 Dec;58(12):3902-12. doi: 10.1002/art.24038.

24. 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 Jun;50(6):1918-27.
25. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. *Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis*. Mol Immunol. 2004 Nov;41(12):1123-33.
26. 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 Aug;165(2):641-50.
27. 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 Sep;169(3):954-66.
28. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. *Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease*. Arthritis Rheum. 2013 Aug;65(8):1953-62. doi: 10.1002/art.37988.
29. Asano Y, Sato S. *Vasculopathy in scleroderma*. Semin Immunopathol. 2015 Sep;37(5):489-500. doi: 10.1007/s00281-015-0505-5.
30. Fleming JN, Nash RA, Mahoney WM, Jr., Schwartz SM. *Is scleroderma a vasculopathy?* Curr Rheumatol Rep. 2009 Apr;11(2):103-10.
31. De Langhe E, Lories R. *Fibrogenesis, novel lessons from animal models*. Semin Immunopathol. 2015 Sep;37(5):565-74. doi: 10.1007/s00281-015-0510-8.

32. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H et al. *Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma.* J Invest Dermatol. 1999 Apr;112(4):456-62.
33. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. *The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?* Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(3):362-82
34. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. *Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations.* Arthritis and rheumatism, 2010;62:2831-44.
35. Degryse AL, Lawson WE. *Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis.* Am J Med Sci. 2011 Jun;341(6):444-9. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31821aa000
36. Lee R, Reese C, Bonner M, Tourkina E, Hajdu Z, Riemer EC et al. *Bleomycin delivery by osmotic minipump: similarity to human scleroderma interstitial lung disease.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014 Apr 15;306(8):L736-48. doi: 10.1152/ajplung.00210.2013.
37. Del Galdo F, Matucci-Cerinic M. *The search for the perfect animal model discloses the importance of biological targets for the treatment of systemic sclerosis (editorial).* Ann Rheum Dis. 2014 Apr;73(4):635-6. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203910
38. Jimenez SA, Millan A, Bashey RI. *Scleroderma-like alterations in collagen metabolism occurring in the TSK (tight skin) mouse.* Arthritis Rheum. 1984 Feb;27(2):180-5.

39. 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 Apr 1;175(4):1103-9.
40. 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 Jun 1;153(6):1640-59.
41. Veeraraghavan S, Renzoni EA, Jeal H, Jones M, Hammer J, Wells AU et al. *Mapping of the immunodominant T cell epitopes of the protein topoisomerase I.* Ann Rheum Dis. 2004 Aug;63(8):982-7.
42. Oriss TB, Hu PQ, Wright TM. Distinct autoreactive T cell responses to native and fragmented DNA topoisomerase I: influence of APC type and IL-2. J Immunol. 2001 May 1;166(9):5456-63.
43. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. *Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale.* J Clin Pathol. 1988 Apr; 41(4): 467–470.
44. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hsu DL, Iwakura Y et al. *Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice.* Arthritis Rheum. 2012 Nov;64(11):3726-35. doi: 10.1002/art.34643.
45. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM et al. *The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc*

*phenotypes*. PLoS One. 2009 Jun 17;4(6):e5903. doi: 10.1371/journal.pone.0005903.

46. Valentini G, Baroni A, Esposito K, Naclerio C, Buommino E, Farzati A et al. *Peripheral blood T lymphocytes from systemic sclerosis patients show both Th1 and Th2 activation*. J Clin Immunol. 2001 May;21(3):210-7.
47. Truchetet M-E, Brembilla N-C, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S et al. *Interleukin-17A+ Cell Counts Are Increased in Systemic Sclerosis Skin and Their Number Is Inversely Correlated With the Extent of Skin Involvement*. Arthritis Rheum. 2013 May;65(5):1347-56. doi: 10.1002/art.37860.
48. McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G et al. *Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice*. Immunity. 1998 Sep;9(3):423-32.
49. Michel ML, Pang DJ, Haque SF, Potocnik AJ, Pennington DJ, Hayday AC. *Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing gammadelta cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Oct 23;109(43):17549-54. doi: 10.1073/pnas.1204327109
50. Raymond M, Van VQ, Wakahara K, Rubio M, Sarfati M. *Lung dendritic cells induce T(H)17 cells that produce T(H)2 cytokines, express GATA-3, and promote airway inflammation*. J Allergy Clin Immunol. 2011 Jul;128(1):192-201.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2011.04.029
51. Weir CR, Nicolson K, Backstrom BT. *Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in naive mice by dendritic cells presenting a self-peptide*. Immunol Cell Biol. 2002 Feb;80(1):14-20.

52. Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, Kurrer MO, Oudit GY, Watts TH et al. *Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity*. Nat Med. 2003 Dec;9(12):1484-90. Epub 2003 Nov 16. Erratum in: Nat Med. 2004 Jan;10(1):105.
53. Price JD, Tarbell KV. *The Role of Dendritic Cell Subsets and Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Other Autoimmune Diseases*. Front Immunol. 2015 Jun 15;6:288. doi: 10.3389/fimmu.2015.00288.
54. Marchal-Somme J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Valeyre D, Soumelis V, Crestani B et al. *Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis*. J Immunol. 2006 May 15;176(10):5735-9.
55. Bantsimba-Malanda C, Marchal-Somme J, Goven D, Freynet O, Michel L, Crestani B et al. *A role for dendritic cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice?* Am J Respir Crit Care Med. 2010 Aug 1;182(3):385-95. doi: 10.1164/rccm.200907-1164OC.
56. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, Sato S. *Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling*. Arthritis Rheum. 2011 Nov;63(11):3575-85. doi: 10.1002/art.30539.
57. Jinnin M. *Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis*. J Dermatol. 2010 Jan;37(1):11-25. doi: 10.1111/j.1346-8138.2009.00738
58. Shoulders MD, Raines RT. *Collagen structure and stability*. Annu Rev Biochem. 2009;78:929-58. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.

59. Simon D, Czompoly T, Berki T, Minier T, Peti A, Toth E et al. *Naturally occurring and disease-associated autoantibodies against topoisomerase I: a fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus*. Int Immunol. 2009 Apr;21(4):415-22. doi: 10.1093/intimm/dxp008.
60. Lakos G, Takagawa S, Varga J. *Animal Models of Scleroderma*. Curr Opin Rheumatol. 2010 Nov;22(6):677-82. doi: 10.1097/BOR.0b013e32833e307b.
61. Ebmeier S, Horsley V. *Origin of fibrosing cells in systemic sclerosis*. Curr Opin Rheumatol. 2015 Sep 8. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26352735.
62. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. *The immunobiology of systemic sclerosis*. Semin Arthritis Rheum. 2008 Oct;38(2):132-60. doi: 10.1016/j.semarthrit.2007.10.010.
63. Szapiel SV, Fulmer JD, Hunninghake GW, Elson NA, Kawanami O, Ferrans VJ et al. *Hereditary emphysema in the tight-skin (Tsk/+) mouse*. Am Rev Respir Dis. 1981 Jun;123(6):680-5.
64. Chung MP, Monick MM, Hamzeh NY, Butler NS, Powers LS, Hunninghake GW. *Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Sep;29(3 Pt 1):375-80.
65. Murray LA, Rubinowitz A, Herzog EL. *Interstitial lung disease: is interstitial lung disease the same as scleroderma lung disease?* Curr Opin Rheumatol. 2012 Nov;24(6):656-62