

Université de Montréal

***Les autoanticorps anti-ADN topoisomérase I dans la
sclérose systémique : interaction directe avec les
fibroblastes médiée par l'autoantigène***

Présenté par
Mélanie Tremblay

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en biologie moléculaire

Août, 2004

©, Mélanie Tremblay, 2004



QH

506

U54

2005

V. 017

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Les autoanticorps anti-ADN topoisomérase I dans la sclérose
systémique : interaction directe avec les fibroblastes médiée par
l'autoantigène

Présenté par

Mélanie Tremblay

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand, Ph.D.
président-rapporteur

Yves Raymond, Ph. D.
directeur de recherche

Jean-Luc Senécal, M.D.
codirecteur

Guy Boileau, Ph.D.
membre du jury

SOMMAIRE

La sclérose systémique (SSc) est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'autoanticorps (aAc) spécifiques dirigés contre des protéines nucléaires, tels les anti-ADN topoisomérase I (anti-topo I), et dont l'une des complications majeures est la fibrose. Aucun lien n'a encore été établi entre la présence des anti-topo I et les dérèglements au niveau des fibroblastes à l'origine de la fibrose.

Nous avons observé la liaison spécifique des IgG de sérums SSc, mais seulement ceux avec anti-topo I, à la surface des fibroblastes et non sur les cellules endothéliales et musculaires lisses. Les aAc anti-topo I purifiés par affinité, à partir de ces sérums, ont été démontrés comme responsables de cette liaison aux fibroblastes. De plus, nous avons observé que la liaison des anti-topo I aux fibroblastes était médiée par l'autoantigène (aAg), la topo I. Un fragment recombinant de la topo I, reconnu par la majorité des sérums avec anti-topo I, pouvait aussi se lier spécifiquement à la surface des fibroblastes.

Cette étude est la première à décrire la liaison d'un aAg nucléaire majeur de la SSc, la topo I, à la surface des fibroblastes. À partir de nos résultats, un nouveau modèle de la pathogenèse de la SSc impliquant les cellules endothéliales, les macrophages et les fibroblastes est proposé, qui ouvre la porte au développement de nouvelles avenues thérapeutiques.

Mots clés : sclérose systémique, fibrose, fibroblaste, autoanticorps, ADN topoisomérase I

Systemic sclerosis (SSc), an autoimmune disease, is characterized by specific autoantibodies (aAb) against nuclear proteins, such as anti-DNA topoisomerase I (anti-topo I). One of the main complications of SSc is fibrosis. No relationship has been yet demonstrated between presence of anti-topo I and the dysregulation of fibroblast physiology, thus giving rise to fibrosis.

We have observed specific binding of IgG from SSc sera, but only from those with anti-topo I, to the cell surface of fibroblasts. No binding was observed on endothelial and smooth muscle cells. Affinity-purified anti-topo I aAb from these sera was shown responsible for fibroblast binding. Furthermore, binding of anti-topo I to fibroblasts has been shown to be mediated by the autoantigen (aAg), topo I. A recombinant fragment of topo I, recognized by the majority of anti-topo I sera, could also bind specifically to the fibroblasts.

This is the first study that describes binding of a major nuclear SSc aAg, topo I, to the surface of fibroblasts. From our results, a new model for SSc pathogenesis involving endothelial cells, macrophages and fibroblasts is proposed, that opens the door to the development of new therapeutic avenues.

Key words : Systemic sclerosis, fibrosis, fibroblast, autoantibody, DNA topoisomerase I

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XV
INTRODUCTION	1
Le système immunitaire	2
La sclérose systémique	3
<i>Diagnostic</i>	4
<i>Atteintes de la peau</i>	4
<i>Atteintes du poumon</i>	5
<i>Autres atteintes</i>	6
<i>Traitements actuels</i>	6
<i>Épidémiologie</i>	7
<i>Génétique de la SSc</i>	8
<i>Implication environnementale</i>	9
Pathogenèse	10
<i>Cellules endothéliales</i>	10
<i>Cellules immunitaires</i>	11
<i>Fibroblastes</i>	12
Régulation du collagène.....	12
Le TGF- β	13
Myofibroblastes	14
Inflammation.....	14

Les autoanticorps	16
ANA	16
Anticorps anticentromère (ACA).....	16
Anti-ARN polymérase (a-RNP).....	18
Anti-ADN topoisomérase I (anti-topo I)	18
Les autoantigènes.....	21
<i>Disponibilité</i>	21
<i>La topo I</i>	22
Structure.....	23
Clivage de la topo I	26
PROBLÉMATIQUE	27
MATÉRIELS ET MÉTHODES	29
Sérums	30
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	30
Purification d'anti-topo I.....	31
Culture cellulaire	32
Cytométrie en flux	33
cell-based ELISA (cELISA)	34
Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel	
Electrophoresis (SDS-PAGE)	34
Immunobuvardage	35
Production des fragments de topo I.....	36
<i>Souches de bactéries d'Escherichia coli</i>	36
<i>Amplification et dosage des vecteurs</i>	37
<i>Polymerase chain reaction (PCR)</i>	38
<i>Sous-clonage</i>	39
pIVEX 2.4b Nde/t250.....	39
pCR TOPO/t250 et pCR TOPO/t600.....	40
pIVEX 2.3/t600 et pIVEX 2.4b Nde/t600.....	40

<i>Criblage de clones positifs</i>	41
<i>Expression et purification des protéines recombinantes</i>	41
Tests statistiques	43
RÉSULTATS	44
Liaison à la surface des fibroblastes	45
<i>Fréquence de distribution des AFA</i>	48
<i>Implication clinique des AFA</i>	49
<i>Présence d'aAc anti-topo I</i>	51
Liaison des anti-topo I aux fibroblastes	54
Liaison de la topo I aux fibroblastes	57
Liaison d'un fragment de topo I aux fibroblastes	64
<i>Production des fragments de topo I</i>	64
<i>Liaison des sérums aux fragments de topo I</i>	70
<i>Liaison des fragments aux fibroblastes</i>	73
DISCUSSION	76
Anticorps antifibroblastes	77
Liaison aux cellules en suspension et adhérentes	78
Cible de la topo I	79
Les fragments de topo I	81
<i>Épitopes reconnus par les anti-topo I</i>	81
<i>Liaison du fragment de topo I aux fibroblastes</i>	83
Implications physiologiques	84
<i>Provenance de la topo I</i>	86
<i>Établissement du modèle pathogénique</i>	86
Cellules endothéliales	88
Cellules du système immunitaire.....	88
Fibroblastes.....	90

Perspectives.....	91
Un nouveau mécanisme pathogénique en auto-immunité	92
<i>Son initiation</i>	92
<i>Son maintien</i>	93
Avenues thérapeutiques.....	93
RÉFÉRENCES.....	96
ANNEXE	XVI
Annexe I Article	xvii
Annexe II Carte des vecteurs utilisés	
et séquence du linker.....	xliv

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Autoanticorps dans la SSc	17
Tableau II	Études des épitopes reconnus par les aAc anti-topo I.....	20
Tableau III.	Spécificité cellulaire des AFA	47
Tableau IV.	Incapacité pulmonaire et décès chez les AFA positifs.....	50

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Relation entre les cellules impliquées dans la pathogenèse de la SSc.....	15
Figure 2.	Structure en rubans de la topo I reconstituée, déduite grâce aux études cristallographiques.....	25
Figure 3.	Liaison des IgG à la surface des fibroblastes	46
Figure 4.	Liaison des IgG à la topo I en ELISA	52
Figure 5.	Corrélation entre les titres d'anti-topo I en ELISA et l'activité de liaison en cytométrie en flux	53
Figure 6.	Purification d'anti-topo I	55
Figure 7.	Liaison des IgG anti-topo I purifiés aux fibroblastes	56
Figure 8.	Liaison des anti-topo I aux fibroblastes par cytométrie en flux, en présence de topo I.....	58
Figure 9.	Liaison des anti-topo I purifiés aux fibroblastes, en présence de topo I	59
Figure 10.	Liaison des sérums anti-topo I positifs aux fibroblastes adhérents préincubés avec la topo I	61
Figure 11.	Liaison des anti-topo I purifiés aux fibroblastes pulmonaires via la topo I	63

Figure 12.	Représentation schématique de la structure de la topo I	65
Figure 13.	Migration sur gel d'agarose des fragments d'ADN de la topo I amplifiés par PCR.....	66
Figure 14.	Expression des fragments recombinants de la topo I	68
Figure 15.	Purification des fragments de topo I	69
Figure 16.	Liaison des sérums anti-topo I positifs aux fragments de 15 et 25 kDa de la topo I	71
Figure 17.	Corrélation entre la liaison des sérums anti-topo I positifs aux fragments de topo I, H15 et 25H, et à la topo I entière en ELISA	72
Figure 18.	Liaison aux fibroblastes du fragment de 25 kDa de la topo I.....	74
Figure 19.	Corrélation entre la liaison des sérums au fragment 25H en ELISA et en cELISA	75
Figure 20.	Modèle proposé de la pathogénicité des aAc anti-topo I.....	87

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- 7-AAD** : 7-amino-actinomycine D
- aAc** : autoanticorps
- aAg** : autoantigène
- ACA** : anticorps anticentromère
- ADCC** : *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*
- AECA** : anticorps anticellules endothéliales
- AFA** : anticorps antifibroblaste
- ANA** : anticorps antinucléaire
- Anti-topo I** : anti-ADN topoisomérase I
- AR** : arthrite rhumatoïde
- A-RNP** : anti-ARN polymérase
- BAL** : lavage broncho-alvéolaire
- CENP-B** : protéine centromérique de type B
- CREST** : calcinose, Raynaud, œsophage, sclérodactylie, télangiectasie
- DLCO** : capacité de diffusion du monoxyde de carbone
- HMVEC-d** : cellule humaine endothéliale de microvasculature de derme
- HMVEC-I** : cellule humaine endothéliale de microvasculature de poumon
- HUVEC** : cellule humaine endothéliale de veine ombilicale
- MIF** : moyenne d'intensité de fluorescence
- NHDF-Ad** : fibroblaste de derme normal humain adulte
- NHDF-néo** : fibroblaste de derme normal humain nouveau-né
- NHLF** : fibroblaste de poumon humain normal
- OA** : ostéoarthrite
- AP** : arthrite psoriasique
- PAMSC** : cellule musculaire lisse d'artère pulmonaire
- ROS** : espèce de radicaux oxygénés
- SA** : spondylarthrite ankylosante
- SLE** : lupus érythémateux systémique

SSc : sclérose systémique

Topo I : ADN topoisomérase I

TP : température de la pièce

UCD-200 : *University of California at Davis Line-200*

WI-38 : fibroblaste embryonnaire pulmonaire

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces deux dernières années. Le groupe SSc : Jill, pour le partage du projet ; Isabelle, particulièrement pour le « coaching » à mon arrivée ; Geneviève, ma conseillère ADN. Mais aussi, Marie-Soleil, pour les stat! ; Nathalie, qui sait toujours où trouver quoi.

Sans oublier celles et celui qui n'y sont plus. Monique, pour les questions (!) ; Dr Mélanie D., pour les conseils ; Martin, le seul gars! En plus des stagiaires : Julie A. (bonne chance!), Julie M., Mélanie D., Karelle et Marianne.

Un gros merci pour le support, les conseils, les discussions et les rires. J'ai fait d'heureuses rencontres qui m'ont fait apprécier mon passage dans ce labo. En espérant vous recroiser personnellement et professionnellement. Lâchez-pas, j'ai confiance en vous!

Merci aussi à mes deux directeurs de recherche, Dr Yves Raymond et Dr Jean-Luc Senécal, pour leur accueil et leur aide.

Je terminerais avec un gros remerciement pour ma mère qui a bien voulu prendre le temps de corriger les fautes de français et de frappe de mes premières épreuves. Et qui, comme la majorité de ceux qui m'entourent, n'y comprend pas grand chose mais qui m'encourage et me supporte!

INTRODUCTION

Le système immunitaire

Le système immunitaire joue un rôle crucial dans notre défense contre les pathogènes, les virus et les bactéries. L'immunité innée étant une première ligne de défense insuffisante pour les organismes supérieurs, l'immunité adaptative déploie alors une variété de mécanismes contribuant à la protection de l'hôte, le soi. Beaucoup plus adaptable aux situations d'attaques, elle permet une défense plus ciblée et plus modulée dans le temps.

Les lymphocytes T comptent parmi les intervenants principaux du système immunitaire¹. Leur développement se déroule dans le thymus, où a lieu la maturation de leur *T-cell receptor* (TCR). Les thymocytes, après maturation en lymphocytes CD4+ ou CD8+ suite à la sélection positive, peuvent alors reconnaître un peptide dans le contexte d'un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi. Toutefois, si un thymocyte reconnaît trop fortement un peptide du soi, il sera éliminé par apoptose durant le processus de sélection négative. Afin de créer un répertoire de cellules T, les antigènes du soi doivent être exposés durant cette sélection. Outre les protéines ubiquitaires présentes dans le thymus, des transcrits d'ARNm de protéines périphériques sont aussi exprimés dans cet organe². Plus récemment, il a été démontré qu'un facteur de transcription, *autoimmune regulator* (AIRE), induisait l'expression de gènes ectopiques dans le thymus³.

Cette tolérance centrale est complétée par divers mécanismes de tolérance périphérique, pour éviter une reconnaissance du soi. Certains antigènes du soi sont en si faible quantité que les cellules T ne peuvent les reconnaître, cette situation étant nommée ignorance immunologique. De plus, en absence de signaux de costimulation de la part des cellules présentatrices d'antigènes (APC), les cellules T s'orientent vers un état anergique, ne pouvant donc induire de réponse immunitaire. Il peut aussi

arriver que ces cellules T soient tout simplement déletées. De plus, un type de cellules T, les cellules T régulatrices, patrouillent le corps et induisent l'anergie ou la suppression des cellules T autoréactives. Les APC, comme les cellules dendritiques, sont aussi impliquées dans la tolérance périphérique en présentant des épitopes processés sans la présence de molécules de costimulation, induisant alors délétion ou anergie.

Ces mécanismes aussi se produisent dans la moelle osseuse lors de la maturation des cellules B, responsables de l'immunité humorale par la production des anticorps. Les mêmes phénomènes de tolérance périphérique s'appliquent également aux lymphocytes B.

Toutefois, il peut arriver que cet état de tolérance soit brisé par un phénomène appelé l'auto-immunité. Il consiste en une agression du soi se présentant sous différentes formes. L'attaque localisée d'un tissu ou d'un organe peut provenir des cellules T ou des autoanticorps (aAc). Par contre, lorsque l'organisme entier est visé, il se développe un désordre auto-immun systémique. Parmi ces maladies se classe la sclérose systémique (SSc) ou la sclérodermie.

La sclérose systémique

La SSc est une maladie auto-immune généralisée du tissu conjonctif présentant des manifestations cliniques hétérogènes. Les organes majoritairement touchés sont la peau, les poumons, les reins, le tractus gastro-intestinal et le cœur. La cause à l'origine de la SSc est à ce jour toujours inconnue. Il est toutefois clair que les cellules endothéliales, les cellules du système immunitaire et les fibroblastes sont impliqués. En effet, l'altération du réseau microvasculaire, l'infiltration des cellules inflammatoires dans les tissus environnants ainsi qu'un dépôt excessif de

collagène dans les organes cibles constituent les éléments clé dans la pathogenèse de la SSc.

Diagnostic

Pour qu'un patient soit diagnostiqué SSc, il doit présenter le critère majeur ou deux des trois critères mineurs de l'*American College of Rheumatology*⁴. Le critère majeur consiste en un épaissement proximal, bilatéral et symétrique de la peau. Parmi les critères mineurs, il est admis la sclérodactylie, les ulcères ischémiques des doigts et la fibrose pulmonaire. De plus, les aAc sont les marqueurs sériques les plus courants.

La SSc est, selon l'atteinte dermique des patients, subdivisée en 4 sous-groupes⁵. La forme limitée implique une atteinte dermique restreinte aux mains ainsi que les symptômes du CREST (acronyme signifiant calcinose, Raynaud, implication de l'œsophage, sclérodactylie et télangiectasie). La forme intermédiaire implique une atteinte proximale des membres alors que la forme diffuse consiste en une atteinte proximale des membres et du tronc. Quant à la quatrième forme, il y a la présence du phénomène de Raynaud, une manifestation vasculaire périphérique et/ou une atteinte viscérale, alors que la peau ne doit pas être touchée.

Atteintes de la peau

Dans la SSc, l'organe externe le plus touché est la peau⁴. Les doigts sont la principale cible, ils deviennent d'abord œdémateux puis, graduellement, la peau s'épaissit et durcit. Les doigts sont alors si atteints que la contraction des jointures ne peut plus être faite (sclérodactylie). Cette aggravation arrive de façon très variable au cours de la maladie : en quelques mois pour les patients souffrant de SSc diffuse et après des

décennies chez ceux ayant la forme limitée. De plus, la peau s'épaississant, l'expression faciale se fige. L'utilisation clinique d'une échelle semi-quantitative, le score de Rodnan, permet de quantifier la détérioration ou l'amélioration de l'épaississement de la peau.

Un second aspect de l'atteinte tégumentaire est l'ulcération, généralement causée par une ischémie. Dégénérant en nécrose, le bout des doigts devient douloureux et diminue la qualité de vie des patients.

De plus, chez les patients touchés par la forme limitée, des dépôts de calcium (calcinose) s'accumulent dans ou sous la peau.

Atteintes du poumon

Les complications au niveau pulmonaire, survenant au cours de la SSc, sont généralement graves, débilitantes et entraînent le décès⁴.

L'hypertension pulmonaire artérielle aggrave généralement les cas de SSc limités. L'augmentation de la pression dans les poumons est provoquée par un épaississement des vaisseaux sanguins, ce qui entraîne une baisse dans la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) et la capacité vitale forcée (FVC).

Plus commune dans les cas de SSc diffuse, la fibrose pulmonaire est un phénomène difficilement réversible qui diminue la survie des malades. Elle est souvent accompagnée d'inflammation alourdissant les complications cliniques. Il est possible de détecter la présence de macrophages ou de lymphocytes dans les alvéoles ou l'interstitium alvéolaire de la surface épithéliale pulmonaire par biopsie ou lavage broncho-alvéolaire (BAL). Ce sont ces cellules du système immunitaire, par leur sécrétion de diverses composantes, qui provoquent l'inflammation dans les tissus pulmonaires. Quant à elle, la fibrose pulmonaire se détecte par radiographie du thorax, par tomographie haute résolution ou par des tests fonctionnels de la capacité pulmonaire.

Autres atteintes

Les autres organes majoritairement touchés sont les reins, le tractus gastro-intestinal et le cœur⁴. La crise rénale est généralement associée à la forme diffuse de la SSc. L'atteinte du tractus gastro-intestinal est une cause de morbidité. La fibrose entraîne une obstruction progressive de l'œsophage ne permettant plus le transit des aliments vers l'estomac et les intestins. La fibrose peut aussi attaquer les vaisseaux du cœur et provoquer de la dyspnée, des palpitations, de l'arythmie ou de l'insuffisance cardiaque congestive.

La SSc est souvent accompagnée du phénomène de Raynaud. Celui-ci est causé par une vasoconstriction anormale des artéoles suite à une exposition au froid. Les épisodes récurrents de dommages au réseau microvasculaire laissent éventuellement la peau transparente et fragile.

Traitements actuels

Aucun traitement curatif n'a été découvert malgré les nombreux essais thérapeutiques qui ont été faits. L'arsenal médicamenteux présentement utilisé sert surtout à contrôler la maladie et, dans le meilleur des cas, à ralentir la progression des symptômes. Les *disease-modifying drugs* sont divisées en quatre grandes classes ciblant les principales pathologies : les dommages vasculaires (vasodilatateur), l'inflammation (immunosuppresseur), la fibrose et les manifestations auto-immunes⁶. Quelques idées thérapeutiques ont été suggérées, sans toutefois avoir démontré leur efficacité ni leur applicabilité à grande échelle, telles que l'injection intraveineuse d'immunoglobulines, le transfert adoptif de gènes ou la reconstitution immunitaire par des cellules souches.

Épidémiologie

La sclérodermie touche majoritairement les femmes. Le ratio femme : homme varie, selon les cohortes, de 2 :1 à 14 :1^{7,8}. Au Québec, ce ratio est de 6 : 1⁵. La maladie se déclare généralement à l'âge moyen (environ 40 ans), quoique, dans certains cas, elle puisse se déclarer durant l'enfance^{5,9}.

Selon les études épidémiologiques, l'incidence varie de 3.8 à 19.3 nouveaux cas par million d'individus par année¹⁰⁻¹⁴. Les estimés concernant la prévalence de la SSc varient selon les populations étudiées. Au Japon⁸ et en Nouvelle-Zélande¹¹, la prévalence est de 38 et 31 cas par million d'individus. En Angleterre¹⁰, en Islande¹² et en Australie¹³, la prévalence est semblable avec respectivement 71, 88 et 86 cas par million de personnes. Dans le nord des États-Unis¹⁴ et dans le sud australien¹⁵, la SSc est plus présente (respectivement de 242 et 233 cas par million). La prévalence la plus élevée (660 cas par million) a toutefois été retrouvée chez les Indiens Choctaw, résidant en Oklahoma aux États-Unis¹⁶.

Certains groupes raciaux sont plus touchés que d'autres. Outre les Indiens Choctaw précédemment mentionnés, les afro-américaines sont atteintes plus jeunes et ont plus souvent la forme diffuse que les blancs^{14,17}.

La multiplicité des symptômes de la SSc entraîne souvent un sous-diagnostic. Il est par contre difficile de comparer des études qui n'utilisent pas les mêmes systèmes de recrutement et d'analyses. Certains auteurs suggèrent toutefois qu'il y a augmentation de l'incidence de la SSc¹⁰.

La mortalité et la survie des patients SSc ont aussi été analysées. Les décès survenant dans ces populations sont plus fréquents que dans la population normale⁵. La survie, à 10 ans suivant le diagnostic, varie de 55 à 82%^{12,14,18,19}.

Génétique de la SSc

Les différences de prévalence et de gravité observées entre les ethnies suggèrent une composante génétique à la SSc. Chez les proches d'un patient diagnostiqué SSc, le risque d'être touché par la maladie est plus élevé (1.6%) que celui de la population générale (0.026%)²⁰. Chez les indiens Choctaw, le gène de la fibrillarine est associé à la SSc de façon héréditaire²¹. Toutefois, la SSc ne se déclare pas nécessairement chez des jumeaux identiques, discréditant la cause uniquement héréditaire²². Des associations entre les principaux groupes d'aAc et les *human leukocyte antigen* (HLA) ont été montrées²³. Toutefois, ces mêmes auteurs mentionnent que les séparations entre les allèles ne sont pas suffisantes pour expliquer l'exclusivité de ces aAc. D'autres études ont montré des polymorphismes dans des gènes possiblement associés à la SSc, tels que ceux codant pour le *tumor necrosis factor* (TNF)²⁴, le *transforming growth factor-β1* (TGF-β1)²⁵, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)²⁶, IL-1A²⁷ ou une protéine de la matrice extracellulaire, la *Secreted protein, acidic and rich in cysteine* (SPARC)²⁸. Toutes ces études convergent vers une implication des composantes génétiques, malgré tout, insuffisantes pour expliquer complètement la complexité de la pathologie.

Durant la grossesse, les fœtus perdent des cellules ou de l'ADN qui persistent dans la circulation ou les tissus maternels²⁹. Des cellules étrangères sont aussi retrouvées chez l'hôte suite à une transfusion ou une transplantation³⁰. L'observation de la présence persistante de ces corps étrangers a conduit au développement d'une hypothèse, le microchimérisme, pour expliquer les réactions auto-immunes. Ces éléments du non-soi permettraient l'activation des cellules immunitaires qui, suite à un bris de tolérance, réagiraient démesurément contre le soi. Cette théorie du microchimérisme est toutefois controversée^{31,32} et n'explique certainement pas à elle seule l'apparition de la SSc.

Implication environnementale

Il avait été suggéré que l'exposition à des solvants, comme le chlorure de vinyle ou les dérivés du benzène³³ ainsi qu'à la silice¹⁵, puisse être responsable de la SSc. Ces observations ont été faites sur la base de variations génétiques de type polymorphismes dans les enzymes de détoxification comme le cytochrome P450³⁴ et la glutathione S-transférase³⁵, chez les patients SSc. Ces études occupationnelles ou environnementales n'ont toutefois pas démontré une implication suffisante de ces produits toxiques justifiant le développement de la maladie chez l'ensemble des patients SSc.

Les infections bactériennes ou virales, principalement dues à *Helicobacter pylori* ou au cytomégalovirus, ont été considérées comme des éléments pouvant activer le développement de la SSc³⁶. De plus, des cellules infectées par le parvovirus B19 ont été retrouvées chez les patients SSc, en absence d'une virémie détectable³⁷. Le mimétisme moléculaire fait partie des hypothèses visant à expliquer l'auto-immunité. Des similarités entre les séquences du soi et du non-soi (le germe pathogène) permettraient une trans-activation des cellules T. Ces infections activeraient donc le système immunitaire de façon non désirée. Cette réponse se ferait au détriment de l'hôte, son système immunitaire se méprenant sur la cible à éliminer. Cette hypothèse est accréditée par la détermination de séquences similaires à celles de protéines virales dans la séquence d'un autoantigène (aAg) fréquent dans la SSc, l'ADN topoisomérase I (topo I)³⁸. Aucune preuve directe n'a toutefois été fournie qu'une infection aussi courante puisse mener à une maladie aussi rare que la SSc.

Pathogenèse

Bien que les causes de la SSc ne soient pas encore connues, trois types cellulaires semblent tenir une grande place dans sa pathogenèse. Des relations complexes s'établissent entre les cellules endothéliales, les cellules du système immunitaire et les fibroblastes par l'entremise de divers facteurs tels que les cytokines ou les chimiokines.

Cellules endothéliales

Formant une barrière entre la circulation et les tissus, l'endothélium contrôle la perméabilité vasculaire, régularise le flux sanguin, maintient le tonus vasculaire et offre une surface de recrutement aux cellules hématopoïétiques³⁹.

Sous l'influence de différents stimuli, la mort apoptotique des cellules endothéliales entraîne une perméabilisation vasculaire et de l'hypoxie localisée. La dysfonction endothéliale est caractérisée par une diminution de facteurs vasodilatateurs comme la prostacycline ou le nitroxyde d'azote (NO)⁴⁰. La perturbation touche aussi les facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline-1. Il est observé dans la SSc une augmentation de ce peptide, produit, entre autres, par les fibroblastes⁴¹. L'endothéline a des effets mitogéniques sur les fibroblastes et les cellules musculaires lisses⁴². Tout en étant profibrotique pour les fibroblastes, elle a des actions pro-inflammatoires par son activation des neutrophiles, des mastocytes et des monocytes⁴².

Les lésions endothéliales se forment précocement au cours de la SSc. Il a été observé, chez un modèle de poulet développant spontanément la SSc, la lignée *University of California at Davis Line 200* (UCD 200), l'apparition de cellules endothéliales apoptotiques, précédant l'infiltration de cellules mononucléaires et le dépôt de collagène⁴³.

De nombreux facteurs retrouvés dans les sérums sont indicateurs de dommages vasculaires, tels que les molécules d'adhésion des cellules endothéliales ou la thrombomoduline, une glycoprotéine endothéliale membranaire⁴⁴. L'état anormal de l'endothélium activé attire plus facilement les plaquettes. Il en découle des problèmes de coagulation et le dépôt de fibrine dans les vaisseaux⁴⁵. De plus, la dysfonction endothéliale procure un site privilégié pour le recrutement des lymphocytes³⁹.

Cellules immunitaires

Il a été montré que les lymphocytes isolés de patients SSc migraient au-travers de la barrière endothéliale aux sites lésionnels de la peau plus aisément que les lymphocytes normaux⁴⁶. Ces lymphocytes infiltrés dans la peau montrent des signes d'activation⁴⁷. Certaines cellules s'y développent par expansion oligoclonale *in situ*, stimulées par un antigène non identifié⁴⁸. Des lymphocytes T activés, présents dans la circulation et les poumons, ont été observés dans des biopsies de peau atteinte⁴⁶. Les monocytes et les macrophages sont aussi retrouvés dans la peau lésionnelle, attirés par le *monocyte chemoattractant protein-1* (mcp-1), une chimiokine présente dans les biopsies dermiques des patients SSc⁴⁹. En plus, les mastocytes peuvent aussi s'infiltrer dans ces lésions.

La population totale de cellules B périphériques est aussi perturbée dans la SSc. Son nombre est plus bas et la distribution des cellules B naïves-mémoire est modifiée par rapport aux donneurs normaux⁵⁰.

Chez les patients SSc ayant une inflammation du poumon, des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ ont été retrouvés dans les liquides au BAL⁵¹. Ces cellules sont activées, présentent un phénotype mémoire et ont des propriétés profibrotiques⁵¹.

Le dérèglement du système immunitaire se remarque aussi par le nombre de cytokines dont les niveaux sont modifiés au cours de la SSc⁵². L'établissement de plusieurs corrélations entre ces cytokines et l'étendue de la fibrose dermique ou pulmonaire a révélé leurs implications dans la SSc. Les cellules du système immunitaire, par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et profibrotiques, engendrent une cascade d'événements initiant et amplifiant l'inflammation, la fibrose dermique et pulmonaire.

Fibroblastes

La fibrose, composante fondamentale de la SSc, est causée par un dépôt excessif de collagène dans les organes, secrété par les fibroblastes. Les phénomènes régissant ce dérèglement de la sécrétion de la matrice extracellulaire (ECM) sont à ce jour inexplicés. Il est toutefois notoire que le phénotype des fibroblastes SSc diffère de celui des fibroblastes normaux, principalement par une production accrue de collagène de type I.

La régulation et l'activation des fibroblastes dépendent de plusieurs cytokines, de facteurs autocrines et paracrines. Ceux-ci sont relâchés dans l'environnement local par les fibroblastes, les cellules endothéliales, les plaquettes et les lymphocytes.

Régulation du collagène

La transcription du collagène de type I est modulée par de nombreux éléments régulateurs présents sur l'ADN, des facteurs de transcription et des cytokines⁵³. Entre autres, le facteur de transcription Sp1, dont la phosphorylation est augmentée dans les fibroblastes SSc⁵⁴, est impliqué dans la transcription du collagène. Certaines cytokines ayant des effets profibrotiques, comme IL-4 ou IL-13, ont des niveaux plus élevés chez les patients SSc⁵⁵.

Le TGF- β

Une des cytokines profibrotiques les plus importantes dans la SSc, le TGF- β , est produit par les fibroblastes et les cellules endothéliales. Il augmente la sécrétion par les fibroblastes de composantes de l'ECM (collagène I et III, fibronectine), tout en inhibant la production des métalloprotéases de la matrice et en augmentant la production des inhibiteurs de protéases des tissus, empêchant ainsi la dégradation de l'ECM⁵⁶.

Malgré certains résultats divergents, la signalisation impliquant le TGF- β semble défectueuse chez les fibroblastes SSc. D'ailleurs, le blocage de celle-ci par un anti-TGF- β aboutit à une production décriue de collagène⁵⁷.

Les récepteurs du TGF- β (TGF- β R I et II) s'associent pour transduire le signal vers le noyau. Ces récepteurs sont surexprimés chez les fibroblastes SSc et le ratio de ces récepteurs est modifié⁵⁸, ce qui mène à une activation transcriptionnelle plus élevée du collagène⁵⁹, via les facteurs de transcription Smad. Dans les fibroblastes SSc, il a été remarqué que la protéine inhibitrice Smad7 est sous-exprimée alors que le co-activateur Smad3 est en surabondance⁶⁰.

Récemment, plusieurs auteurs ont démontré un dysfonctionnement dans la signalisation impliquant le TGF- β ou le collagène⁶¹⁻⁶³. Les études des molécules ou des voies antagonistes à celles du TGF- β devraient permettre de comprendre les mécanismes anti-fibrotiques^{64,65}.

Induit par le TGF- β 1, le *connective tissue growth factor* (CTGF) a des effets mitogéniques et induit l'expression de protéines de l'ECM telles que le collagène⁶⁶. En créant une boucle de rétroaction positive, le CTGF, aussi produit par les fibroblastes, a été proposé comme la cytokine maintenant la fibrose dans la SSc.

Myofibroblastes

Les myofibroblastes sont un type cellulaire spécialisé dans la cicatrisation. De phénotype intermédiaire entre les fibroblastes et les cellules musculaires lisses, ils sont souvent nommés « fibroblastes activés ». Les fibroblastes peuvent être différenciés en myofibroblastes par le TGF- β 1⁶⁷ et par la thrombine⁶⁸. Des médiateurs relâchés par les mastocytes peuvent aussi contribuer à la différenciation en myofibroblastes⁶⁹. Ils sont caractérisés par une sécrétion accrue de l'ECM et par d'importantes activités contractiles grâce à la quantité considérable d'actine musculaire lisse qu'ils possèdent. Ils sont recrutés lors de la réparation des tissus pour leur capacité de remodelage de l'ECM et ils disparaissent lorsque cette tâche est terminée. Ils sont trouvés en plus grand nombre dans les peaux lésionnelles de patients SSc que dans la peau des donneurs normaux⁶⁷. Dans la SSc, ces cellules persistent suite à la réparation cicatricielle, probablement à cause de leur résistance accrue à l'apoptose⁷⁰.

Inflammation

Il a été proposé que les fibroblastes aient aussi un rôle pro-inflammatoire en sécrétant eux-mêmes des cytokines. L'expression aberrante de l'IL-1 α chez les fibroblastes SSc module l'induction de l'IL-6 et du *Platelet Derived Growth Factor-A* (PDGF-A), qui ont des fonctions respectives dans la production de collagène et dans la mitogénèse des fibroblastes⁷¹.

Les relations entre ces 3 types cellulaires sont complexes. Deux schémas simplifiés (Figure 1) proposent des modèles par lesquels cette communication s'établit, afin d'expliquer lésions microvasculaires ainsi que la fibrose, toutes deux observés dans la pathologie de la SSc.

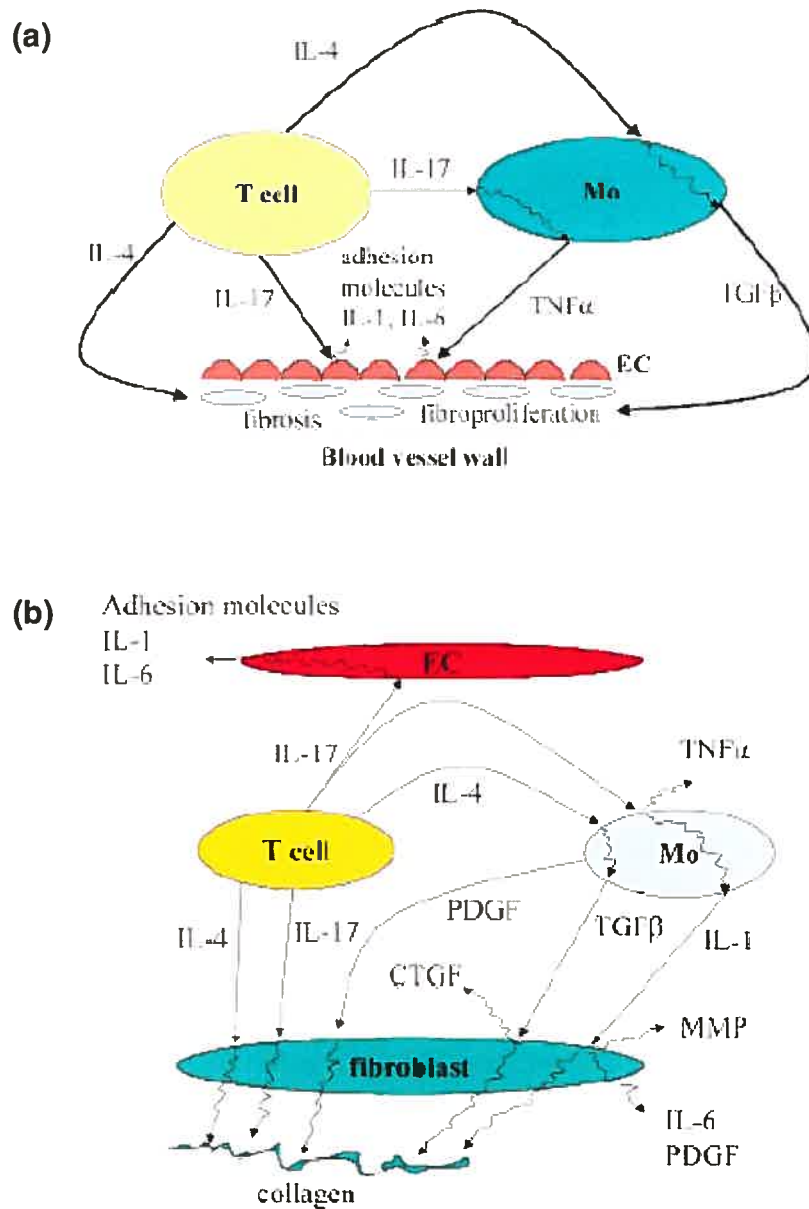


Figure 1. Relation entre les cellules impliquées dans la pathogenèse de la SSc

Schéma des interactions entre les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules T et les fibroblastes afin d'expliquer (a) les lésions microvasculaires et (b) la fibrose. Figure tirée de Sakkas *et al.*⁷²

EC: cellules endothéliales, Mo : macrophages

Les autoanticorps

Les aAc caractérisent les maladies auto-immunes et permettent de les distinguer entre elles. Le diagnostic clinique peut souvent être appuyé par la présence ou l'absence d'un aAc particulier.

Il existe de nombreux aAc spécifiques à la SSc (tableau I). Parmi ceux-ci, les anti-fibrillarine, les anti-PM-Scl ou les anti-Th/To sont moins courants. Curieusement, les maladies auto-immunes systémiques ont en commun la présence d'autoanticorps dirigés contre des antigènes nucléaires, les ANA.

ANA

Ce groupe d'aAc, le plus pertinent cliniquement, est généralement détecté par immunofluorescence indirecte. Le substrat cellulaire le plus classiquement utilisé est la cellule épithéliale HEp-2. Chaque type d'aAc se lie selon un patron propre. Ces aAc circulants sont présents à très haut titre et sont persistants au cours de la maladie. Ils sont retrouvés dans 75 à 95% des sérums de SSc⁷³. Cliniquement utilisés pour le diagnostic, les types divers d'ANA ont été observés comme étant mutuellement exclusifs. Certains des ANA ne sont jamais retrouvés simultanément.

Anticorps anticentromère (ACA)

Environ 30% des patients SSc, selon leur ethnicité, possèdent des anticorps reconnaissant les protéines centromériques, principalement celle de type B, CENP-B. La présence des ACA est associée à la forme limitée de la SSc et à un meilleur pronostic⁷³.

Tableau I Autoanticorps présents dans la SSc

Autoantibody	Methods of testing	Prevalence in SSc	Clinical and serologic associations	Prognosis
Anti-centromere	IF IB ELISA	20-30%	CREST lcSSc ↓Pulmonary fibrosis Pulmonary hypertension	Better prognosis than anti-Scl-70 ↑Survival compared with anti-Scl-70 or anti-nucleolar antibodies No benefit in following levels over time
Anti-Scl-70	ID CIE IB ELISA	~15-20%	Mutually exclusive with ACA dcSSc Pulmonary fibrosis and secondary cor pulmonale	Worse prognosis ? Levels by ELISA fluctuate with extent of disease involvement
Anti-PM-Scl	ID IP	~3% (Rare in Japanese)	lcSSc PM/SSc overlap	Benign (chronic) course with better response to steroids
Anti-TivTo	IP	~2-5% (More common in Japanese)	Mutually exclusive with ACA lcSSc ↓Joint involvement ↑purpy fingers, small bowel involvement, hypothyroidism	Worse prognosis with reduced 10-year survival
AFA	IP	~4%	Mutually exclusive with ACA, anti-Scl-70, anti-RNAP dcSSc Myositis, pulmonary hypertension, renal disease	Seen in younger patients with greater internal organ involvement
Anti-RNAP	IP	~20%	dcSSc Anti-RNAP II with ↓lung function Cor pulmonale unrelated to pulmonary fibrosis	Increased mortality

ACA, anticentromere antibodies; AFA, antibrilliant anti-U3-ribonucleoprotein; Anti-RNAP, anti-RNA polymerase; Anti-Scl70, anti-DNA topoisomerase I; CIE, counter-immunoelectrophoresis; CREST, calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia; dcSSc, diffuse systemic sclerosis; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IB, immunoblotting; ID, immunodiffusion; IP, immunoprecipitation; lcSSc, limited cutaneous systemic sclerosis; PM-Scl, polymyositis-scleroderma overlap

Tableau modifié de Ho *et al.*⁷³

Anti-ARN polymérase (a-RNP)

Les a-RNP, retrouvés dans 20% des cas de SSc, sont associés à la forme diffuse. Associée à une diminution de la capacité pulmonaire, la présence d'a-RNP prédit une mortalité plus élevée⁷³.

Anti-ADN topoisomérase I (anti-topo I)

La présence d'anti-topo I est connue depuis longtemps pour son association à la SSc⁷⁴. Ces aAc ont précédemment été détectés par divers procédés : double immunodiffusion, immunobuvardage et ELISA. Cette dernière technique étant beaucoup plus sensible et spécifique⁷⁵, les diagnostics cliniques se font aujourd'hui principalement par ELISA. Les anti-topo I sont caractérisés par un patron moucheté (*speckled*) et nucléolaire sur le noyau, par immunofluorescence indirecte.

Les anti-topo I forment un groupe d'ANA communément retrouvé, dans une proportion d'environ 20% chez les patients SSc⁷³. Ils sont exclusifs des autres ANA, c'est-à-dire que peu (<5%) de patients ont à la fois des ACA et des anti-topo I⁷⁶. Ceux-ci ne sont présents que chez les patients souffrant de SSc et, exceptionnellement, dans de très rares cas de SLE⁷³. En effet, la spécificité des anti-topo I est très élevée. Par contre, leur sensibilité diagnostique l'est beaucoup moins et ne permet donc pas de diagnostiquer tous les malades SSc uniquement par la présence d'anti-topo I⁷³.

Jusqu'à 40% des patients ayant des anti-topo I ont la forme diffuse de la maladie⁷³. Cette présence d'anti-topo I est associée à la fibrose pulmonaire ainsi qu'à une mortalité accrue⁷³. La présence d'anti-topo I a été observée en parallèle avec les gènes HLA-DRB1 et DQB1 dans les populations caucasiennes et japonaises⁷³.

Une équipe a pu relier les titres d'IgG anti-topo I avec la sévérité de la maladie via un indice de l'atteinte de la peau⁷⁷. Les titres d'anti-topo I se maintiennent dans le temps, quoique dans quelques cas, il puisse y avoir perte de la positivité des anti-topo I. Ce renversement de la

sérologie s'accompagne alors de manifestations pulmonaires et cutanées plus légères et d'une évolution plus favorable de la maladie^{77,78}. Par contre, il a été observé lors d'études longitudinales que les titres pour certains épitopes de la topo I peuvent changer⁷⁹.

La présence de tous les sous-types d'IgG (1 à 4) d'anti-topo I des patients SSc indique une stimulation chronique des cellules B⁸⁰. *In vitro*, la production d'anti-topo I par les lymphocytes B nécessite la collaboration directe des cellules Th1 et Th2^{81,82}. Afin d'observer une sécrétion d'IgG anti-topo I, des clones de cellules B isolés de patients SSc doivent être cultivés en présence d'IL-6, d'IL-12 et de cellules Th spécifiques. Ces cellules Th présentent un TCR spécifique, restreint aux chaînes $\alpha\beta$ et aux allèles HLA-DR⁸³.

Des données suggèrent que les cellules T autoréactives, spécifiques à la topo I, font partie du répertoire normal des lymphocytes^{83,84}. Des clones de cellules T, obtenus de donneurs normaux et SSc, prolifèrent suite à incubation avec de la topo I ou ses fragments peptidiques. Toutefois, dans ces deux études, ce ne sont pas les mêmes épitopes que les cellules reconnaissent.

De nombreuses études ont examiné les épitopes reconnus par les sérums anti-topo I positifs (tableau II). Malgré les divergences, un consensus réunit ces observations. Les aAc anti-topo I sont hétérogènes et polyclonaux. Des différences ont été observées entre les portions de la topo I qui sont ciblées, selon les différents contextes ethniques⁸⁵. De plus, les épitopes majoritairement reconnus se trouvent dans la partie C-terminale de la topo I. Un épitope immunodominant, présent sur la topo I entre les acides aminés 489 à 573, était plutôt de type conformationnel que linéaire⁸⁶.

Tableau II Études des épitopes reconnus par les aAc anti-topo I

Épitopes	Sensibilité	Spécificité	Source de topo I	Méthode(s) d'analyse	Références
1-213	1/40				
207-441	38/40		Protéines de fusion MaBP	ELISA, IB	Hu, 2004 ⁸⁷
433-636	31/40				
625-765	18/40				
205-224*	29/51	30/32	Peptides (20-mer)	ELISA	Rizou, 2000 ⁸⁸
349-368*	47/66	42/43			
397-416*	45/58	31/32			
517-536*	46/66	38/43			
489-573	98/100	55/55	Protéines de fusion MaBP	IB, ELISA	Kuwana, 1999 ⁸⁶
1-229	26/35		Protéines de fusion β -gal	IB, ELISA, DID	Kato, 1993 ⁸⁹
200-401	16/35				
349-570*	35/35				
565-686	10/35				
658-765	25/35				
1-139	49/66		Protéines de fusion GST	IB	Cram, 1993 ⁹⁰
242-347	3/66				
342-458	35/66				
453-560*	58/66				
555-663	16/66				
658-765	42/66				
74-248*	37/43		Protéines de fusion β -gal	IB	Kuwana, 1993 ⁹¹
316-441	19/43				
485-601*	37/43				
658-700	18/43				
653-704	39/59		Protéines de fusion β -gal	IB	Meesters, 1992 ⁹²
256-640	13/13		Protéines recombinantes	IB	Piccinini, 1991 ⁹³
↳405-484*					
277-484	14/20		Protéines de fusion	IB	D'Arpa, 1990 ⁹⁴
484-765	17/20				
344-589			Protéines de fusion	IB	Verheijen, 1990 ⁷⁹
589-567					
657-765					

MaBP : *maltose-binding protein*, GST: glutathione-S-transférase, β -gal : β -galactosidase, IB : immunobuvardage, DID : double immunodiffusion, ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

*décrit par les auteurs comme l'épitope majeur, immunodominant ou universel

Les autoantigènes

Disponibilité

Lors d'un bris de tolérance de la part du système immunitaire, le développement d'une réponse *antigen-driven* s'initierait et se maintiendrait par l'afflux continuels d'antigènes. La disponibilité des aAg, principalement nucléaires, reste une question à élucider afin de comprendre comment ceux-ci deviennent accessibles aux cellules immunitaires.

Le bris de la tolérance immune pourrait être causé par le déplacement d'une réponse immunitaire initiale d'un épitope vers un autre épitope voisin, l'*epitope spreading*. Des cas ont été observés d'une réponse immunitaire, des autoanticorps dirigés contre un certain antigène, dont la réponse se déplaçait de manière inter- ou intramoléculaire vers un antigène du soi. Par exemple, l'homologie existant avec un épitope de l'histone H3 a plutôt favorisé le développement d'une réponse des anticorps contre CENP-A/B⁹⁵.

Les aAg, dont la topo I, sont exportés par des vésicules à l'extérieur de fibroblastes lors d'un stress de relaxation d'une matrice de collagène⁹⁶.

La libération des antigènes généralement inaccessibles est possible lors de l'apoptose⁹⁷. Cette mort programmée entraîne des changements à la surface des cellules et une redistribution des aAg potentiels à l'intérieur ou à la surface des corps apoptotiques. De plus, durant l'apoptose, les protéines elles-mêmes subissent des modifications comme le clivage par les caspases ou le changement de leur état de phosphorylation. En plus de ces « nouveaux » antigènes disponibles, les cellules apoptotiques sont elles-mêmes très immunogéniques. Elles sont phagocytées par les APC qui en présentent le contenu à l'ensemble des cellules formant le système immunitaire.

Les espèces de radicaux oxygénés (ROS) sont générées lors de processus comme la respiration métabolique ou la phagocytose. Ces ROS peuvent aussi être produits lors des périodes d'ischémie-reperfusion observées dans le phénomène de Raynaud accompagnant souvent la SSc. Les métaux comme le fer et le cuivre sont des intermédiaires lors des réactions chimiques utilisées pour se débarrasser des ROS, dommageables à la fois pour les cellules, l'ADN et les protéines. De tels ions métalliques fragmentent la topo I, tout comme plusieurs autres aAg, en de multiples produits de dégradation⁹⁸.

Les aAg, pouvant être externalisés ou clivés, se reçoivent et génèrent des nouvelles séquences pour les cellules immunitaires. Ces épitopes cryptiques, malgré qu'ils représentent le soi, n'avaient pas été initialement reconnus par les cellules B en maturation et n'avaient donc pas été éliminés durant la sélection négative. Ces dernières deviennent donc des lymphocytes autoréactifs. Ces cellules produisent alors des aAc circulants, qui peuvent attaquer les tissus et les organes.

La topo I

Cet aAg joue normalement un rôle très important dans la survie des cellules. Cette enzyme nucléaire de distribution ubiquitaire, modifie la topologie de l'ADN lors de sa réplication, sa transcription, sa recombinaison ou sa réparation. Le mécanisme d'action de la topo I a été très étudié et est revu dans Champoux *et al.*⁹⁹. L'ADN est d'abord clivé par la topo I puis cette phase est suivie d'une rotation de l'acide nucléique. Cette étape supprime le stress de torsion de l'ADN enroulé, permettant ainsi à l'ADN d'être accessible aux protéines qui doivent s'y lier. La ligature et le relâchement de l'ADN par la topo I sont ensuite complétés.

L'importance de la topo I pour les cellules a été thérapeutiquement exploitée par de nombreux agents anticancéreux de la famille de la

camptothécine. Ces poisons cellulaires stabilisent le lien entre la topo I et l'ADN, bloquant ainsi sa réparation, sa transcription ou sa réplication, ce qui mène éventuellement à l'apoptose de la cellule cancéreuse.

Le gène codant pour la topo I est localisé sur le chromosome 20q11.2-13.1 et il n'encode qu'un seul polypeptide. La topo I fait partie de la sous-famille des topoisomérases de type 1B (EC 5.99.1.2). Ces enzymes peuvent relaxer des acides nucléiques superenroulés de façon positive ou négative. Le substrat préféré de la topo I est l'ADN superenroulé¹⁰⁰. Son action est large, elle a très peu de spécificité pour la séquence d'ADN à dérouler, malgré la détermination d'une préférence pour la séquence 5'-(A/T)(G/C)(A/T)T-3' lorsqu'elle est située à la position -4 à -1 du site de clivage. Cette famille de la topo I ne requière pas d'ion magnésium pour être active, contrairement aux enzymes de la famille 1A. Bien que dispensables, les ions comme le Mg^{2+} ou le Ca^{2+} augmentent l'activité de l'enzyme topo I¹⁰¹.

Structure

La topo I humaine est formée de 765 acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 91 kiloDaltons (kDa) mais dont la migration sur un gel de polyacrylamide indique plutôt un poids de 100 kDa. Il a été déterminé que la topo I était composée de 4 domaines¹⁰². Le domaine en N-terminal (acides aminés 1 à 214) sert principalement à la localisation cellulaire de la topo I. Très positivement chargé, celui-ci renferme les séquences pour les signaux de localisation nucléaire. De plus, il est le site d'interaction pour de nombreuses protéines dont la nucléoline, p53, l'antigène T du SV40 (*simian virus 40*) ou la *TATA binding protein*⁹⁹. Selon ses fonctions cellulaires, la topo I peut aussi se localiser dans les nucléoles.

Le second domaine est constitué de 421 acides aminés (215-635) (Figure 2). Sa séquence est très conservée entre les topoisomérases et se subdivise en trois sous-domaines¹⁰³. Les sous-domaines I et II sont

très rapprochés et forment le « couvercle » de l'enzyme. Le sous-domaine I est associé au sous-domaine III par deux « lèvres » qui rejoignent une grande hélice α , reliant les deux sous-domaines. Composé des acides aminés 434 à 635, le sous-domaine III est exposé à la surface de la molécule. Il contient tous les résidus du site actif de l'enzyme sauf la tyrosine723. Ce sous-domaine forme la « porte d'entrée » s'ouvrant et se fermant sur l'ADN lors de son clivage.

Le domaine « linker » de 76 acides aminés (636-712) fait le pont avec le domaine C-terminal de 52 résidus (acides aminés 713-765) qui comprend le résidu du site actif Tyr723 essentiel pour la catalyse. La mutation de ce résidu inactive la topo I¹⁰³. L'enzyme, en brisant un lien phosphodiester de l'ADN, forme alors un lien temporaire entre la topo I et l'ADN via cette tyrosine. Cette forme intermédiaire, après le relâchement de la tension de l'ADN, est résolue par l'expulsion de la tyrosine. La religaturation de l'ADN se fait par le groupement hydroxyle laissé libre en 5' de la tyrosine723. Les acides aminés Arg488, Arg590 et His632 permettent la stabilisation de l'intermédiaire Tyr723-ADN durant la réaction de clivage.

Il est possible de mélanger les deux domaines catalytiquement actifs (2 et 4) et de retrouver une activité similaire à celle de l'enzyme complète. Cette technique a permis de cristalliser cette enzyme reconstituée (Figure 2)¹⁰³.

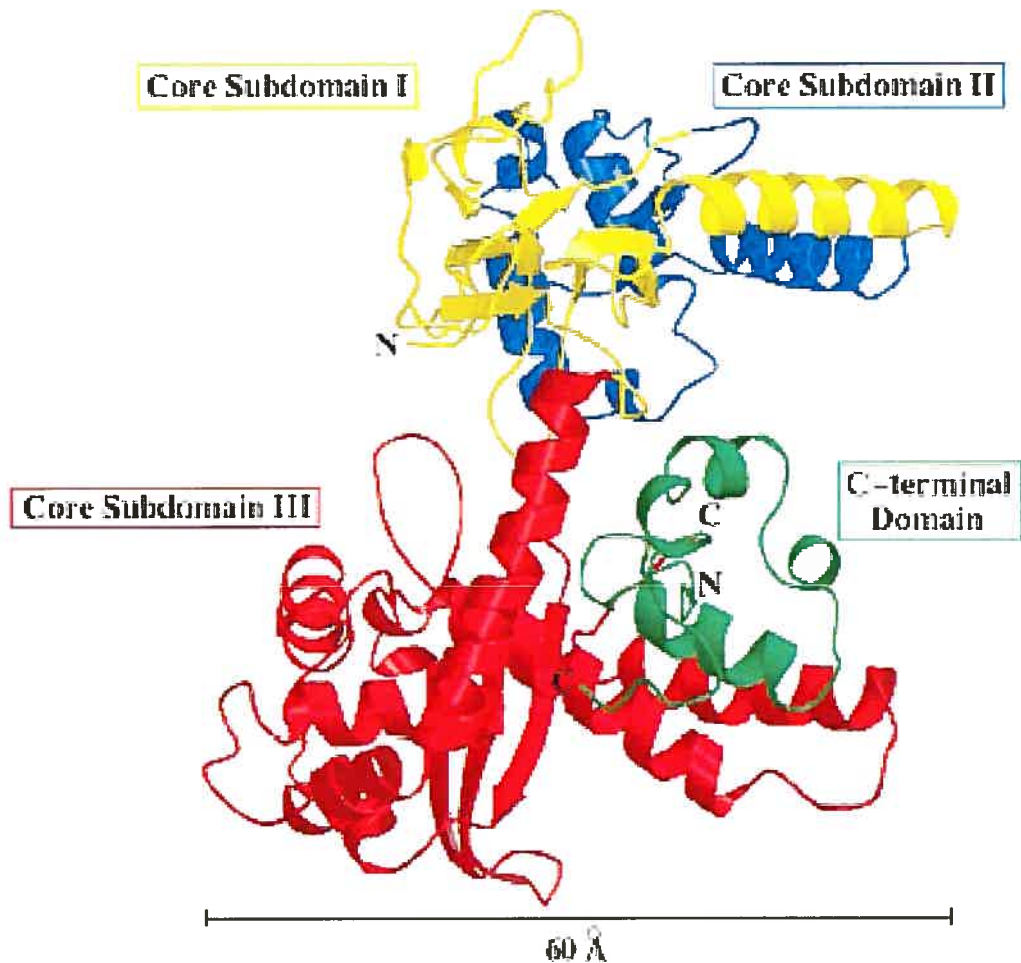


Figure 2. Structure en rubans de la topo I reconstituée, déduite grâce aux études cristallographiques.

Le domaine C-terminal (inclus entre les acides aminés 713 à 759), représenté en vert ainsi que la partie centrale (acides aminés 175-659) ont été exprimés chez *Escherichia coli*, purifiés et mélangés afin d'obtenir une enzyme active. Ce domaine central est divisé en 3 sous-domaines I, II et III, montré respectivement en jaune, bleu et rouge. La Figure est tirée de Redinbo *et al.*¹⁰³.

Clivage de la topo I

Durant l'apoptose des cellules, les caspases 3 et 6 peuvent couper la topo I en des fragments d'environ 80 kDa¹⁰⁴. Le granzyme B peut aussi cliver la topo I. Cette enzyme est contenue dans les granules des cellules T cytotoxiques et génère un fragment de la topo I d'environ 72 kDa¹⁰⁵.

La protéine se dégrade facilement en N-terminal en une forme d'environ 70 kDa, tout en conservant son activité enzymatique¹⁰⁶. Pour cette raison, les expérimentateurs ont toujours éprouvé de nombreuses difficultés à obtenir la topo I sous sa forme complète. Historiquement, l'aAg a d'ailleurs été initialement identifié sous sa forme de poids moléculaire de 70 kDa¹⁰⁷, qui a alors été nommé Scl-70. Disponible commercialement, cette protéine tronquée est purifiée de différentes sources comme le thymus de veau ou le placenta humain. Seule l'utilisation du système d'expression du baculovirus a permis l'obtention de la protéine recombinante complète, sous sa forme de 100 kDa¹⁰⁶.

PROBLÉMATIQUE

L'étiologie de la SSc est toujours inconnue et, au cours des ans, de nombreuses hypothèses et plusieurs modèles ont été élaborés. La compréhension de la pathologie se révèle d'une importance capitale pour le développement de traitements ou de médicaments spécifiques et adaptés à la SSc.

Très largement incomprise, la production d'aAc reste toujours un mystère. De plus, le rôle de ces aAc dans les maladies auto-immunes n'est pas clair. Deux écoles de pensée confrontent leurs théories à ce sujet. Pour certains, la présence des aAc n'est qu'un épiphénomène et ne peut servir qu'à suivre la progression des maladies auto-immunes¹⁰⁸. Il est observé que la présence d'aAc généralement admis comme spécifique d'une maladie, est aussi possible chez des sujets sains ou parfois chez des sujets atteints d'une autre maladie. De plus, dans le cas de plusieurs maladies, les patients asymptomatiques présentent une phase pré-clinique où ils sont, malgré cela, sérologiquement positifs.

Par opposition, il a été suggéré que les aAc aient un rôle qui soit plus qu'indicateur, en contribuant à la pathogénicité¹⁰⁹. L'exemple le plus frappant d'anticorps pathogéniques est celui des anticorps anticellules endothéliales (AECA). Ceux-ci, par leur liaison, induisent l'apoptose des cellules endothéliales¹¹⁰ via la voie de Fas¹¹¹ par *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Les aAc peuvent aussi provoquer le dysfonctionnement de cellules ou de tissus. Par exemple, un anticorps anti-M3-récepteur muscarinique inhibe la contraction des muscles, ce qui suggère un mécanisme affectant la neurotransmission cholinergique dans les intestins altérés de patients SSc¹¹². Toutefois, aucun aAc du groupe des ANA n'a été établi comme directement pathogénique.

Les fibroblastes jouent un rôle crucial dans la pathologie, particulièrement dans le développement de la fibrose, un phénomène morbide et aggravant la SSc. Par des études antérieures, il a été mis en évidence la présence d'aAc reconnaissant les fibroblastes (AFA) chez les patients souffrant de SSc¹¹³⁻¹¹⁶. Toutefois, la relation entre ces deux éléments clés dans la pathogenèse de la SSc, les aAc et les fibroblastes, a été peu étudiée. Notre étude vise donc à comprendre le lien entre les ANA, particulièrement les anti-topo I, les fibroblastes et les AFA.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Sérums

Les sérums provenaient de plusieurs cohortes de patients recrutés à la clinique de rhumatologie de l'hôpital Notre-Dame (Centre hospitalier de l'Université de Montréal, QC)⁵. La cohorte canadienne-française SSc a été décrite dans Hénault *et al.*¹¹⁷ (voir *patients and methods* dans l'annexe I). Elle comporte 309 malades, avec un ratio femme : homme de 6 :1. L'âge au moment du diagnostic était de 39.9 ± 13.9 ans chez les femmes alors qu'il était de 43.7 ± 11.4 ans chez les hommes. Sous-divisé par diagnostic, 29 cas de SSc (9.4%) étaient de forme diffuse, 152 patients (49.2%) souffraient de la forme limitée, 78 (25.2%) étaient diagnostiqués de la forme intermédiaire alors que 50 patients (16.2%) avaient la peau normale. Le taux de mortalité chez ces patients était de 21.3% (66 malades)⁵.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Des plaques 96-puits (Immulon 2HB; Thermolab Systems, MA) ont été enduites avec 5 μ mol de protéines (350 ng de topo I, 125 ng de 25H et 75 ng de H15; voir plus loin pour la définition de 25H et 15H) par puits dans du tampon carbonate/bicarbonate (30 mM NaHCO₃ et 20 mM Na₂CO₃, pH 9.6) pendant 1 heure à 37°C. Suite à 4 lavages de 2 minutes avec du *phosphate-buffered saline* (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ et 2 mM KH₂PO₄ pH 7.4) contenant 0.5% Tween-20, les plaques ont été incubées pendant 16 heures à 37°C dans du tampon de blocage composé de PBS additionné de 2% de sérum bovin foetal (FBS), 1% albumine de sérum bovin (BSA) et 0.5% Tween-20. Les plaques ont ensuite été lavées, puis incubées 1 heure à

37°C avec les sérums ou un anticorps anti-penta histidine (1:1000; QIAexpress®, QIAGEN, CA) dilués dans du tampon de blocage. Après 4 lavages, la liaison des IgG a été révélée avec un IgG chèvre anti-humain spécifique au fragment Fc γ (1 :10 000) ou anti-souris spécifique au fragment Fc γ (1 :5 000), tous deux couplés à la *horseradish peroxidase* (HRP; Jackson ImmunoResearch, PA), et dilués dans le tampon de blocage pendant 1 heure. Finalement, suite à 4 lavages, la révélation de la liaison a été faite avec 0.8 mg/mL du substrat *o*-phénylènediamine (OPD; Sigma, MO) dilué dans un tampon contenant 92 mM de citrate de sodium, 8 mM d'acide citrique (pH 6.0) et 0.006% H₂O₂ pendant 10 minutes à température de la pièce (TP) et à la noirceur. Après l'arrêt de la réaction avec une solution de 2 M H₂SO₄, la densité optique (DO) a été prise à 490 nm avec un lecteur de plaques *MRX revelation* (Dynex, VA).

Purification d'anti-topo I

La purification des anti-topo I des sérums humains a été réalisée grâce à une colonne d'affinité de topo I (*Vivapure Epoxy Protein Coupling Kit* de Vivascience, Allemagne). La topo I (30 μ g, Immunovision, AR), préalablement dialysée contre du PBS pH 8.0, a été couplée de façon covalente sur une membrane époxy, selon les instructions du fabricant. Les étapes de purification des anti-topo I ont été adaptées à partir du protocole fourni avec la trousse. Brièvement, les sérums anti-topo I positifs (dilués 1 :10 dans du PBS pH 7.4) ont été centrifugés avec un clarificateur fourni. Après incubation avec la membrane de topo I et de 2 lavages avec le tampon suggéré, les anticorps ont été élués avec une solution 0.1 M glycine pH 2.8, puis neutralisés avec une solution de 1 M Tris pH 9.0. Les anticorps ont ensuite été concentrés par ultrafiltration avec des *Vivaspin 500* ou *4* (Vivascience), selon le volume d'élution, et le tampon a alors été changé pour du PBS pH 7.4. Les anticorps ont été

dosés avec la trousse *Easy-Titer[®] Human IgG (H+L) Assay Kit* (Pierce, IL) selon les instructions fournies. La concentration des anticorps se situait entre 10 et 120 ng/ μ L.

Culture cellulaire

Les fibroblastes embryonnaires pulmonaires WI-38 (*American Type Culture Collection* [ATCC], VA) ont été cultivés dans du *fibroblast basal medium* (FBM; Cambrex, MD) auquel 10% FBS et 100 μ g/mL de gentamycine (Wisent, QC) ont été ajoutés.

Les fibroblastes embryonnaires de souris NIH-3T3 et de rat RAT-2 (ATTC) ont été cultivés dans du *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Wisent) contenant 10% FBS et 100 μ g/mL de gentamycine. Les fibroblastes immortalisés de prépuce hTERT-BJ1 (*human Telomerase Reverse Transcriptase-BJ1*; BD Biosciences, CA) ont été cultivés dans du DMEM avec 20% de médium 199 (Sigma), 10% FBS-TET (BD Biosciences) et 100 μ g/mL de gentamycine. Les fibroblastes de poumon humain normal (NHLF), les fibroblastes de derme normal humain, adulte ou nouveau-né (NHDF-Ad et NHDF-néo), ont été cultivés dans du FBM avec 2% FBS, 5 μ g/mL d'insuline bovine, 1 ng/mL of *human fibroblast growth factor-B* (hFGF-B), 0.1% gentamycine/sulfate d'amphotéricine-B.

Les cellules humaines endothéliales de veine ombilicale (HUVEC), de microvasculature de poumon ou de derme (HMVEC-I et HMVEC-d) (Cambrex) ont été cultivées dans du milieu basal pour cellules endothéliales (EBM) supplémenté avec EGM-2MV (5% FBS, 0.1% *insulin-like growth factor-1*, 0.1% acide ascorbique, 0.4% hFGF-B, 0.1% *human epidermal growth factor* [hEGF], 0.04% hydrocortisone, 0.1% *human vascular endothelial growth factor* et 0.1% gentamycine).

Les cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire (PAMSC; Cambrex) ont été cultivées dans du milieu basal pour cellules musculaires

lisses (SmBM; Cambrex) additionné de 5% FBS, 0.1% hEGF, 0.1% insulin, 0.2% hFGF-B et 0.1% gentamycine.

Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère composée d'air et de 5% CO₂. Les cellules ont été passées avant confluence à l'aide de trypsine-*ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) et de solution neutralisante de trypsine (Cambrex). Les cellules primaires ont été utilisées entre les passages 4 et 6.

Cytométrie en flux

Les cellules adhérentes ont été détachées avec du PBS contenant 0.5% EDTA, puis ont été lavées 3 fois au PBS. Des IgG de chèvre (1µg/mL; Sigma) ont été utilisées pour bloquer les interactions non-spécifiques. L'ajout de topo I (de 0.63 à 10 µg/mL) a été fait en même temps que l'incubation avec les anticorps primaires (30 minutes à TP), dans un volume fixe de 100 µL. Les cellules ont été marquées soit avec des sérums (1 :200), soit un anticorps monoclonal IgM souris anti-topo I humaine (1 :50, BD Biosciences), soit un IgG anti-chaîne α V de l'intégrine (anti-CD51; 1 :1000; Sigma), soit des IgG anti-topo I purifiés (2.5 µg/mL) dilués dans du PBS contenant 3% BSA. La liaison a été détectée par des IgG de chèvre anti-humain spécifique au fragment Fc γ ou anti-souris spécifique au fragment Fc γ couplés à la phycoérythrine (PE) (Jackson ImmunoResearch) dilués 1:50 ou un IgM chèvre anti-souris spécifique à la chaîne μ -PE dilué 1 :100 (Cedarlane, ON) dans du tampon PBS/3% BSA, pendant 30 minutes à TP. La perméabilité des cellules vivantes a été évaluée par le 7-amino-actinomycine D (7-AAD; Sigma), un dérivé fluorescent qui lie l'ADN. Les données ont été collectées par un FACScan (BD Biosciences) et analysées par le logiciel Cellquest (BD Biosciences).

Cell-based ELISA (cELISA)

Les cellules (WI-38 ou HUVEC) ont été cultivées jusqu'à confluence dans des plaques 96-puits qui avaient préalablement été recouvertes avec $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de collagène I de peau de veau (Sigma) dilué dans du PBS (Wisent) pendant 3 heures à 37°C ou 16 heures à TP. La topo I ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ dans du DMEM) ou ses fragments ($5\text{-}100 \mu\text{g}/\text{mL}$ dans du DMEM) ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C avec les cellules. Deux lavages avec du PBS ont été suivis par le blocage avec des IgG de chèvre ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$ dans du DMEM, 10 minutes à 37°C) afin d'éliminer les interactions non-spécifiques. Les sérums (1 :5000 à 1 :1000) ou les anticorps anti-topo I purifiés (0.06 à $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$) ont été ensuite incubés avec les cellules pendant 1 heure à 37°C . Après une seconde ronde de lavages avec du PBS, un anticorps IgG chèvre anti-humain spécifique au fragment $\text{Fc}\gamma$, couplé avec la HRP (1 :10 000 dans du DMEM; 30 minutes à 37°C) a été incubé avec les cellules. Finalement, la liaison a été révélée avec $8 \text{ mg}/\text{mL}$ du substrat OPD dans les conditions mentionnées à la section ELISA.

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel

Electrophoresis (SDS-PAGE)

Les NHLF confluents ont été lavés avec du PBS et ont été lysés avec une solution bouillante contenant 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM Na_3VO_4 et 1% SDS. Après sonication de l'ADN, les lysats ont été quantifiés avec la trousse *Micro BCA Protein Assay* (Pierce), selon les instructions fournies par le manufacturier. Les protéines ont été diluées dans du *SDS sample buffer* (SSB; 25 mM Tris pH 6.8, 10% glycérol, 1% SDS,

2% β -mercaptoéthanol, 0.25% bleu de bromophénol) et ont été dénaturées par une incubation de 5 minutes à 100°C.

Le protocole standard de Laemmli¹¹⁸ a été suivi pour les électrophorèses en système tampons discontinus en utilisant les appareils *Mini Protean[®]3 cell* (Bio-Rad, CA). Les gels de 8% de polyacrylamide ayant servi pour la migration des lysats cellulaires ont été équilibrés dans la solution de transfert (31 mM Tris pH 8.75, 240 mM glycine, 20% méthanol). Les protéines ont ensuite été transférées de manière *semi-dry* sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) avec un appareil *trans blot[®] SD Semi dry transfer cell* (40 minutes, 25 Volt [V]); Bio-Rad). Les membranes ont été colorées préalablement à l'immunobuvardage avec une solution de Ponceau S (3% acide trichloroacétique, 3% acide sulfosalicyclique et 2% Ponceau S) afin de s'assurer de l'efficacité du transfert.

Les fragments recombinants de la topo I ont été résolus par SDS-PAGE 15%. Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose ou colorées au bleu de Coomassie¹¹⁹. La coloration a été faite pendant 5 minutes au four à micro-ondes dans une solution contenant 0.25% de *R-250 Coomassie[®] Brilliant Blue* (Bio-Rad), 25% d'isopropanol et 10% d'acide acétique suite à un rinçage à l'eau. Les gels ont ensuite été décolorés dans une solution contenant 10% d'acide acétique, au micro-ondes durant 5 minutes et ont baigné dans cette solution jusqu'à décoloration complète.

Immunobuvardage

Les sites non-spécifiques des membranes de nitrocellulose ont été bloqués avec une solution *Tris-Buffered Saline* (TBS; 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) additionnée de 5% de lait écrémé en poudre et de 0.5% Tween-20 pendant 3 heures à TP ou 16 heures à

4°C. Les sérums (1 :200), les anti-topo I purifiés (0.5 µg/mL), l'anticorps monoclonal IgM anti-topo I (1 :500) tous dilués dans la solution de blocage, ont ensuite été incubés pendant 1 heure à TP. L'anticorps anti-penta histidine a été dilué 1 :1000 dans du TBS/2% caséine et a été incubé pendant 1 heure avec la membrane. Après 5 lavages avec du TBS/2% Tween-20, les membranes ont été incubées pendant 1 heure avec le tampon de blocage contenant des IgG chèvre anti-humain spécifiques au fragment Fc γ (1 :40 000), des IgG chèvre anti-souris spécifiques au fragment Fc γ (1 :20 000) ou des IgM chèvre anti-souris spécifiques à la chaîne μ (1 :20 000), tous conjugués à la HRP (Jackson ImmunoResearch). Les membranes ont ensuite été incubées 5 minutes avec le substrat *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent* (Pierce) et exposées à des films *BioMax XAR* de Kodak (NY).

Production des fragments de topo I

Souches de bactéries d'*Escherichia coli*

Les étapes d'amplification des vecteurs et de sous-clonage ont été faites avec les bactéries compétentes *SoloPack[®] Gold* (Stratagene, CA). Leur génotype (Tet^r $\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1⁻ recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F⁺ *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]) permet d'améliorer la qualité de l'ADN obtenu grâce à leur déficience en endonucléase (*endA*) alors que l'insert y est plus stable à cause de l'absence du gène de la recombinaison *recA*. Le phénotype Hte augmente l'efficacité de la transformation de longs brins d'ADN ligaturés.

Le vecteur du clonage TOPO a été transformé dans des bactéries de souche TOP10F⁺ (*TOPO TA Cloning[®]*, Invitrogen, CA) de génotype F⁺ {*lacIq Tn10* (Tet^R)} *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$

recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG. Le répresseur *lacIq* permet le criblage bleu/blanc avec l'ajout d'isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG).

Les bactéries BL21-AITM (Invitrogen; F- *ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm araB::T7RNAP-tet*) ont été utilisées pour la production protéique. Cette souche, dérivée des BL21, est déficiente en protéases (*lon, OmpT*), ce qui diminue la dégradation des protéines. Une insertion chromosomale du gène de l'ARN polymérase T7, sous contrôle du promoteur *araBAD*, permet une régulation stricte par les sucres (glucose comme répresseur, L-arabinose comme inducteur) pour les gènes possiblement toxiques.

Toutes ces bactéries ont été ensemencées dans du milieu *Luria-Bertani* autoclavé (LB; 10g/L NaCl, 10 g/L tryptone et 5 g/L d'extrait de levures, pH 7.0) fraîchement additionné de carbanécilline (CB; Sigma) à une concentration finale de 100 µg/mL. Du LB-CB, contenant 20 g/L d'agar, a été coulé dans des pétris de 100 mm. L'addition de glucose (20 mM) a permis d'activer le système de répression catabolique durant la culture à 37°C, prévenant ainsi l'expression basale des protéines hétérologues.

La transformation des vecteurs a été effectuée en suivant les instructions fournies dans chacun des manuels des souches bactériennes utilisées.

Amplification et dosage des vecteurs

Les vecteurs ont été amplifiés par des minipréparations grâce à la trousse *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche, IN) selon le protocole du manufacturier. L'ADN a été, selon les besoins, concentré par précipitation avec de l'éthanol 95% (EtOH) et avec 10% d'une solution acétate de sodium 3M pH 5.2. L'ADN a été dilué dans un tampon de chargement 6x (0.25% bleu de bromophénol et 40% sucrose) pour être déposé sur un gel d'agarose 0.8%. Le gel a été préparé par la dissolution de l'agarose dans

du tampon *Tris-Acetate-EDTA* (TAE, 40 mM Tris-acétate et 1 mM EDTA pH 8.0) par ébullition et par l'ajout du colorant bromure d'éthidium à une concentration de 0.35 µg/mL, avant la gélification. La migration a été faite à 100 V durant 30-60 minutes dans le tampon TAE recouvrant les gels dans un appareil *Mini SubTM Cell* (Bio-Rad). Le dosage des plasmides a été réalisé par densitométrie (Alphamager, Alpha Innotech, CA) suite à une exposition aux ultraviolets (UV) par comparaison à un *DNA Molecular Weight (MW) marker XIV* (Roche) ou à une échelle moléculaire de *1 kb DNA ladder* (Invitrogen). Les poids des vecteurs ont été analysés avec le *MW Supercoiled DNA ladder* (Invitrogen).

Polymerase chain reaction (PCR)

Les fragments de topo I ont été amplifiés à partir du vecteur pbluescript II SK(+)/topo I (annexe IIa; 3329 pb, correspondant aux nucléotides 246 à 3682 des 3734 paires de bases (pb) de l'ADNc de topo I; GenBank 19913404) décrit précédemment¹²⁰.

Les amorces suivantes ont été utilisées pour le fragment *t250* comprenant les acides aminés 489 à 573:

sens : CATGCCATGGCTCTGAGAGCAGGCAATGAAAAG

anti-sens : TATACCCGGGCAGAATACCAGTATTGAGTCTATC ;

et pour le fragment *t600* (acides aminés 434-635):

sens : CATGCCATGGGTGCGAATCAAGGGTGAGAAGGAC

anti-sens : TATACCCGGGTGCCCTCTGATGGTTACAAAG.

Les amorces ont été conçues pour que les amplicons puissent être en phase lors de leur insertion dans les vecteurs d'expression. Les nucléotides soulignés indiquent les sites de restriction NcoI en 3' et XmaI en 5' utilisés lors du sous-clonage. Toutes les amorces utilisées ont été synthétisées par AlphaDNA (QC), diluées dans de l'eau DEPC et dosées par spectrophotométrie UV à 280 nm.

Le vecteur pbluescript/topo I (10 ng) a été mélangé avec le tampon *GeneAmp® PCR Buffer* (10 mM Tris pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ et 0.001% w/v gélatine; Applied Biosystems, CA), 0.2 mM déoxyribonucléosides triphosphate (dNTP; Amersham Biosciences, NJ), 0.5 μM de chacune des amorces, 1 unité (U) du mélange d'enzymes *Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System* (Roche) et complété avec de l'eau DEPC à un volume de 20 μL. Le programme du PCR (*Gene Amp® PCR System 9700*; Applied Biosystems) fut le suivant : dénaturation initiale (94°C, 5 minutes), dénaturation (94°C, 1 minute), hybridation (50°C, 1 minute), élongation (72°C, 1 minute) et élongation finale (72°C, 7 minutes). L'amplification a été faite en 25 cycles. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% par comparaison à une échelle de poids moléculaire.

Sous-clonage

Deux stratégies ont été suivies en parallèle pour insérer les fragments de la topo I dans les vecteurs pIVEX 2.3 et 2.4b Nde (Roche, annexe IIb et c). Les digestions enzymatiques ont été faites dans les conditions optimales (tampon, température et nombre d'unités d'enzymes) et ce, selon les suggestions des manufacturiers.

pIVEX 2.4b Nde/t250

Le fragment *t250* a été digéré par les enzymes NcoI/XmaI (New England Biolabs [NEB], MA), puis centrifugé avec les concentrateurs de type *Montage-PCR* (Millipore, MA) selon les instructions fournies par le manufacturier. Le vecteur pIVEX 2.3 a été digéré par NcoI/XmaI. L'ADN a ensuite été déphosphorylé pendant 1 heure à 60°C en présence de 0.3 U de phosphatase alcaline de *E. coli* (Amersham) dans du tampon contenant 100 mM Tris pH 7.6 et 2 mM ZnCl₂. La réaction a été arrêtée par une incubation à 37°C pendant 1 heure suite à l'ajoute de 0.1% de

SDS et de 0.1 mg/mL de protéinase K (GibcoBRL, CA). Ces étapes ont été suivies d'une précipitation de l'ADN avec de l'EtOH 95% et de 0.2 M NaCl. Le fragment digéré a été ligaturé dans le vecteur pIVEX 2.3 selon différents ratios insert : vecteur (1 :1 à 5 :1) à l'aide du *Rapid DNA Ligation kit* (Roche), selon les indications du manufacturier, pour ensuite être transformé dans les bactéries compétentes *Solopack gold*.

pCR TOPO/t250 et pCR TOPO/t600

Le sous-clonage des fragments PCR a été fait dans le vecteur de clonage pCR[®]2.1-TOPO[®] de la trousse *TOPO TA Cloning[®]* (Invitrogen, annexe IId). Ce plasmide linéarisé, ayant des extrémités en 3' de déoxythymidines, permet la ligature des déoxyadénosines en 3' (dA) des produits PCR et ce, via la topoisomérase de virus qui est liée de manière covalente au vecteur. Le protocole fourni a été légèrement modifié par l'ajout d'une étape optionnelle permettant de s'assurer de la création des dA aux amplicons (0.5 U *AmpliTaq DNA Polymerase* [Applied Biosystems] et 20 µM dNTP; 15 minutes à 72°C). L'ADN amplifié (0.5 µL) a alors été mélangé avec la solution saline, l'eau et 5 ng du vecteur TOPO (tous de la trousse) pendant 45 minutes à TP. Les vecteurs ont été transformés dans les bactéries TOP10F' selon le protocole fourni dans cette même trousse.

pIVEX 2.3/t600 et pIVEX 2.4b Nde/t600

Le vecteur obtenu, pCR TOPO/t600, a ensuite été digéré par NcoI/XmaI. Quatre enzymes SapI (NEB), SphI, PvuI et DraI (Pharmacia) ont servi à dégrader l'ADN du vecteur. Le résultat de cette digestion, contenant le t600, a ensuite été ligaturé dans les vecteurs pIVEX 2.3 et 2.4b Nde digérés et déphosphorylés (voir plus haut).

Criblage de clones positifs

L'identification des clones positifs a été faite par analyse de restriction et par PCR suivi d'une migration sur gel d'agarose d'un pourcentage approprié. La réaction PCR a été faite dans les conditions décrites précédemment, avec les amorces universelles du promoteur T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') ainsi que celles du terminateur T7 (5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3') dont les sites sont présents dans les vecteurs de la série pIVEX. Les constructions ont toutes été confirmées par un séquençage automatique (séquenceur ABI PRISM 3100, service de séquençage du CHUM) avec les amorces du promoteur T7 et du terminateur T7.

L'insertion du fragment *t250* dans pIVEX 2.3 a été contre-vérifiée par une digestion BamHI/NdeI (NEB) libérant un fragment de 837 pb. La réussite du clonage TOPO a été évaluée par une digestion avec les enzymes BamHI et XhoI (NEB), permettant de générer, dans le cas du *t250*, un fragment de 432 pb. Un fragment de 682 pb a été observé suite à cette digestion d'un clone positif pour l'insertion du *t600*. L'insertion du fragment *t600* dans les pIVEX 2.3 et 2.4b Nde a été vérifiée par digestion NdeI/BamHI, permettant, dans le premier cas, d'obtenir une bande à 1200 pb et dans le second cas, une bande à 634 pb.

Expression et purification des protéines recombinantes

Les vecteurs d'expression, pIVEX 2.3 et pIVEX 2.4b Nde contiennent une queue hexa-histidines respectivement en C-terminal et en N-terminal de l'insert. Les protéines résultantes ont été nommées selon leur poids moléculaire attendu, soit de 15 et 25 kDa et selon la position de la queue d'histidines (H25 vs 25H).

Les bactéries BL21-AI (Invitrogen) ont été transformées avec 10 ng des 3 vecteurs pIVEX 2.4b Nde/*t250* (H15), pIVEX 2.3/*t600* (25H) et pIVEX 2.4b Nde/*t600* (H25). Trois clones ont été repiqués afin

d'ensemencer une culture de départ qui a été incubée 16 heures à 25°C. Cette culture a été diluée 1 :20 dans du milieu frais (10 mL pour le criblage d'expression et 200 mL pour la purification), puis a été incubée à 30°C jusqu'à l'atteinte d'une $DO_{600\text{ nm}}$ d'environ 0.6. Les bactéries ont alors été induites avec 0,2% L-arabinose (Anachemia, QC) pendant 2 heures (criblage) ou 4 heures (criblage et purification) à 30°C. La concentration d'inducteur et les temps d'induction ont été choisis selon le manuel d'instructions fourni par Invitrogen. Des échantillons (1 mL de culture bactérienne centrifugée et solubilisée dans du SSB) ont été récoltés au départ et après induction. Pour la purification des protéines recombinantes, les bactéries ont été centrifugées, en culots de 50 mL, pendant 10 minutes à 3000 g.

Deux de ces culots bactériens de 50 mL ont été utilisés pour la purification. Les bactéries ont été suspendues dans le tampon de lyse fourni avec le kit ProBond (Invitrogen) contenant 6 M guanidine-HCl, 20 mM NaPO_4 pH 7.8 et 500 mM NaCl. Après sonication (4 cycles de 5 secondes entrecoupés de 10 secondes de pause dans un bain de glace), les lysats ont été centrifugés à 3000 g durant 15 minutes, décantés et re-centrifugés à 20000 g pendant 2 minutes. Le lysat clarifié a alors été appliqué (45 minutes, TP) sur une résine de nickel (ProBond™, Invitrogen), à laquelle se sont liés les résidus d'histidine des protéines recombinantes. La colonne avait été préalablement équilibrée avec un tampon de liaison (8 M urée, 20 mM NaPO_4 pH 7.8, 500 mM NaCl et 20 mM imidazole). Des lavages en conditions dénaturantes avec le tampon de liaison à différents pH (deux fois à pH 7.8 et deux fois à pH 6.0) ont permis d'éliminer les interactions non-spécifiques. Finalement, afin de favoriser la renaturation des protéines, trois lavages en conditions natives ont été effectués (50 mM NaPO_4 pH 8.0, 0.5 M NaCl et 30 mM imidazole). Les fractions ont été récoltées par une élution avec un compétiteur pour la liaison au nickel, l'imidazole (250mM), ajouté au tampon de condition native (50 mM NaPO_4 pH 8.0 et 0.5 M NaCl). Un

échantillon de chacune des fractions (25 μ L) a été mis sur gel pour évaluer la pureté et la quantité des protéines récoltées. Les sept premières fractions (environ 8 mL) ont été centrifugées dans un concentrateur Vivaspin 4 (*molecular weight cut-off* [MWCO] de 10 000 Da, Vivascience) par centrifugation à 4°C jusqu'à un volume d'environ 500 μ L. Ce volume a ensuite été dialysé pendant 16 heures contre du PBS pH 7.4 dans des cassettes de dialyse *Slide-A-lyzer 0.5-3 mL* (MWCO de 3 500 Da, Pierce). Finalement, la concentration des trois protéines recombinantes a été déterminée par un dosage Bradford (Bio-Rad) alors que la pureté a été évaluée par SDS-PAGE.

Tests statistiques

Les données ont été analysées avec un test de Kruskal-Wallis, permettant de comparer 2 séries de données. Les échantillons d'ELISA ont été évalués en duplicata et soustraits d'un contrôle sans antigène. Les valeurs de DO ont été normalisées avec comme référence un pool de sérums positifs présent sur chaque plaque. Un test de Student a été utilisé pour évaluer les différences statistiques. Les valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) ont été normalisées avec le même pool de référence. Toutes les corrélations ont été validées par un test de corrélation Pearson. Les tests ont été faits avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, CA).

RÉSULTATS

Liaison à la surface des fibroblastes

Pour trouver un lien entre les fibroblastes et les aAc observés chez les patients atteints de SSc, nous avons d'abord voulu confirmer la présence d'AFA. La liaison d'IgG de sérums a donc été observée à la surface des fibroblastes, par cytométrie en flux (Figure 3). Des fibroblastes embryonnaires pulmonaires (WI-38) ont été détachés, puis incubés avec des sérums pour être ensuite marqués par un anti-IgG humain couplé à la phycoérythrine. Les cellules perméables ont été exclues de l'analyse grâce à un marqueur nucléaire, le 7-AAD, qui ne pénètre pas dans les cellules intactes. Un sérum normal et un sérum négatif, utilisés comme témoins, n'ont montré aucune liaison (Figure 3). Un anticorps témoin dirigé contre la chaîne alpha V de l'intégrine (anti-CD51) a été utilisé comme marqueur de la surface cellulaire (non-montré). La liaison était bien due aux IgG, car l'utilisation de sérums totaux ou des IgG purifiées à partir des sérums aboutissaient à une liaison identique (non montré).

La liaison des IgG à la surface de cellules était spécifique aux fibroblastes, quelle que soit leur origine (Tableau III). Les cellules du poumon (WI-38 et NHLF) et de la peau humains (NHDF-Ad, NHDF-néo) montraient la même liaison que les cellules du prépuce immortalisées (hTERT-BJ1). De plus, chez deux lignées de fibroblastes d'origine animale, de souris (NIH-3T3) et de rat (RAT-2), nous avons observé une liaison similaire des IgG. Les mêmes sérums n'ont démontré aucune activité de liaison sur les autres types cellulaires testés : endothélial (HUVEC, HMVEC-I, HMVEC-d) et musculaire lisse (PAMSC).

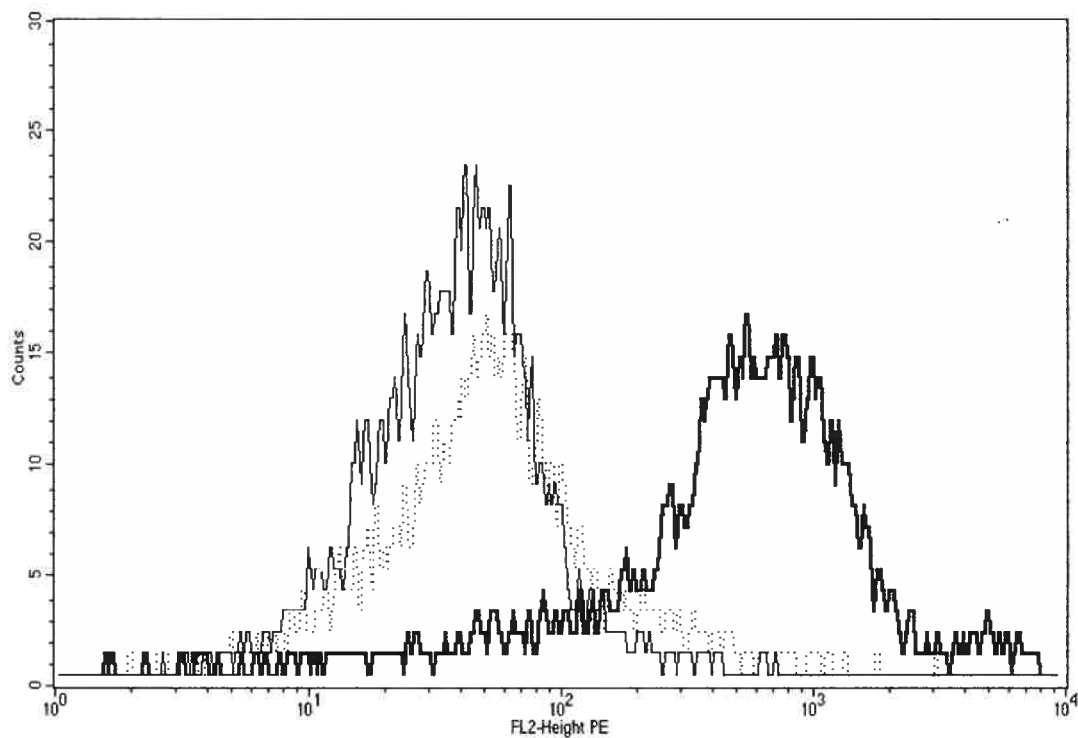


Figure 3. Liaison des IgG à la surface des fibroblastes

Liaison des IgG d'un sérum (dilution 1:200) normal (-), négatif (- -) ou positif (—) à la surface des fibroblastes embryonnaires pulmonaires WI-38, par cytométrie en flux. Les données sont exprimées sous forme d'intensité de la fluorescence, due au conjugué anti-IgG humain couplé à la phycoérythrine (PE). Les cellules perméables ont été exclues par marquage intranucléaire avec le 7-AAD.

Tableau III. Spécificité cellulaire des AFA

Cellules POSITIVES	Cellules NÉGATIVES
Fibroblastes Poumon, embryon (WI-38) Prépuce, immortalisé (hTERT-BJ1) Poumon, adulte (NHLF) Derme, adulte (NHDF-ad) Derme, nouveau-né (NHDF-néo)	Endothéliales Veine ombilicale (HUVEC) Microvasculaire, derme (HMVEC-d) Microvasculaire, derme (HMVEC-l)
Rat, embryon (RAT-2) Souris, embryon (NIH-3T3)	Musculaires lisses Poumon, artère (PASMC)

Lignées cellulaires testées pour la liaison des IgG de sérums AFA positifs. Parmi les lignées fibroblastiques positives, se retrouvaient des lignées d'origine humaine et animale. Parmi les cellules négatives, se trouvaient des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.

Pour visualiser les AFA liés à la surface cellulaire, des fibroblastes vivants ont été marqués par des IgG, puis observés par double immunofluorescence en microscopie confocale¹¹⁷ (voir la figure 5 dans l'annexe I). Les fibroblastes WI-38 n'avaient pas été perméabilisés ni fixés afin d'éviter une coloration du noyau par les ANA contenus dans les sérums SSc. En utilisant un conjugué anti-IgG humain couplé à la fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) et un marqueur de surface cellulaire (anti-CD51), révélé par un anti-IgG de souris couplé au Cy3, nous avons pu localiser les IgG de patients AFA positifs à la surface cellulaire. Le patron de distribution ponctuel de ceux-ci nous indiquait une répartition hétérogène de la cible membranaire. Seuls les AFA positifs démontraient une telle coloration, les sérums des groupes AFA négatifs et normaux ne produisant qu'un marquage faible ou indétectable.

Fréquence de distribution des AFA

Afin de déterminer la fréquence des AFA, des sérums provenant de patients souffrant de SSc, et aussi de témoins normaux ou malades, ont été testés pour leur activité de liaison aux fibroblastes. Avec un seuil de positivité égal ou supérieur à 10 déviations standards (SD) de la moyenne de l'intensité de fluorescence (MIF) du groupe des normaux, nous avons retrouvé des sérums ayant des AFA principalement dans la cohorte de patients SSc (26/99, 26%)¹¹⁷ (voir la figure 2 dans l'annexe I). Le MIF différait significativement entre les groupes ($P < 0.0001$), tel que déterminé par un test de Kruskal-Wallis. Parmi d'autres maladies rhumatologiques telles que l'arthrite rhumatoïde (AR), la spondylarthrite ankylosante (SA), l'arthrite psoriasique (AP), l'ostéoarthrite (OA), le seul autre groupe ayant des sérums positifs a été le lupus érythémateux systémique (SLE) (5/30, 17%). La moyenne du groupe SSc différait significativement ($P < 0.05$) de celle de tous les autres groupes, sauf pour le SLE.

Implication clinique des AFA

Pour comprendre l'importance des AFA dans la pathologie de la SSc, la cohorte de patients a été fractionnée selon les trois sous-types de la maladie. Il n'y avait pas de différence significative ($P=0.8$) entre la fréquence de AFA positifs selon la forme de SSc : la fréquence de AFA positifs y était de 27% chez les limités, 30% pour les intermédiaires et de 38.5% chez les diffus¹¹⁷ (résultats non-montrés dans l'annexe I).

Toutefois, le groupe AFA positif présentait des caractéristiques cliniques spécifiques résumées au Tableau IV. Le syndrome restrictif pulmonaire a été retrouvé plus fréquemment chez les AFA positifs que chez les AFA négatifs ($P<0.005$)¹¹⁷ (voir l'annexe I). De plus, une valeur de DLCO inférieure à 60% de la valeur normale prédite était plus fréquente chez les AFA positifs que dans le groupe AFA négatif ($P<0.02$). Une fibrose pulmonaire et/ou un syndrome restrictif et/ou une DLCO sous 60% étaient plus courants chez les AFA positifs que chez les AFA négatifs ($P=0.01$). Finalement, les patients AFA positifs avaient un taux de mortalité significativement plus élevé que les patients AFA négatifs ($P<0.02$).

Tableau IV. Incapacité pulmonaire et décès chez les AFA positifs

	AFA positif	AFA négatif	valeur p
Syndrome restrictif	8/23 (34.8%)	6/61 (9.8%)	P<0.005
DLCO <60%	14/27 (51.8%)	17/71 (22%)	P<0.02
Fibrose pulmonaire et/ou DLCO <60% et/ou syndrome restrictif	16/27 (59.2%)	21/71 (29.6%)	P=0.01
Mortalité	13/27 (48.1%)	15/71 (21.1%)	P<0.02

Caractéristiques cliniques des patients atteints de SSc (n=99). Les valeurs de P ont été déterminées par des tests de Chi-carré.

Présence d'aAc anti-topo I

Une des caractéristiques majeures de la SSc est le développement d'aAc très spécifiques tels que les anti-topo I. La réactivité des anticorps des sérums AFA positifs a donc été révélée par immunobuvardage sur des lysats de fibroblastes pulmonaires primaires (NHLF)¹¹⁷ (voir la figure 3 dans l'annexe I). Une bande commune à 100 kDa correspondant au poids moléculaire de la topo I y a été observée; puisqu'un anticorps monoclonal anti-topo I commercial détectait une bande à cette même position, ceci suggérait la présence d'anti-topo I dans les sérums des patients AFA positifs. Pour vérifier ce postulat, un immunobuvardage utilisant comme source d'antigène la topo I purifiée, a ensuite été réalisé¹¹⁷ (voir la figure 3 dans l'annexe I). Tous les sérums AFA positifs réagissaient avec la topo I dénaturée. Par contre, les 5 sérums AFA positifs du groupe SLE ne reconnaissaient ni la topo I cellulaire ni la purifiée¹¹⁷ (voir la figure 3 dans l'annexe I).

Les titres d'aAc anti-topo I ont ensuite été mesurés par ELISA. La moyenne des titres d'anti-topo I était significativement plus élevée ($p < 0.0001$) dans le groupe AFA positif que le groupe AFA négatif (Figure 4). Nous avons noté une corrélation fortement significative ($P < 0.0001$, $R^2 = 0.66$) entre les titres d'anti-topo I en ELISA et l'activité de liaison en cytométrie en flux (Figure 5). Cette observation suggérait fortement que les aAc anti-topo I puissent être directement responsables de la liaison des AFA aux fibroblastes.

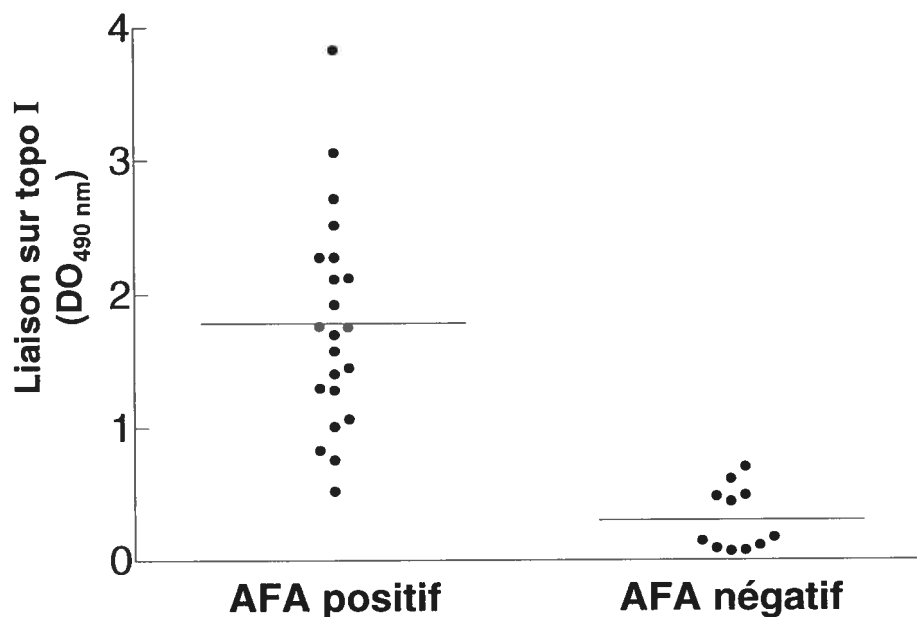


Figure 4. Liaison des IgG à la topo I en ELISA

Niveau d'anticorps IgG anti-topo I des sérums AFA positifs et AFA négatifs (n=33). Chaque point représente un sérum (dilution 1 :1000) d'un patient SSc. La barre horizontale représente la moyenne de chacun des groupes. Les valeurs de DO_{490 nm} ont été normalisées par rapport à un sérum positif répété à chaque expérience. La valeur de P (<0.0001) a été validée par un test t de Student.

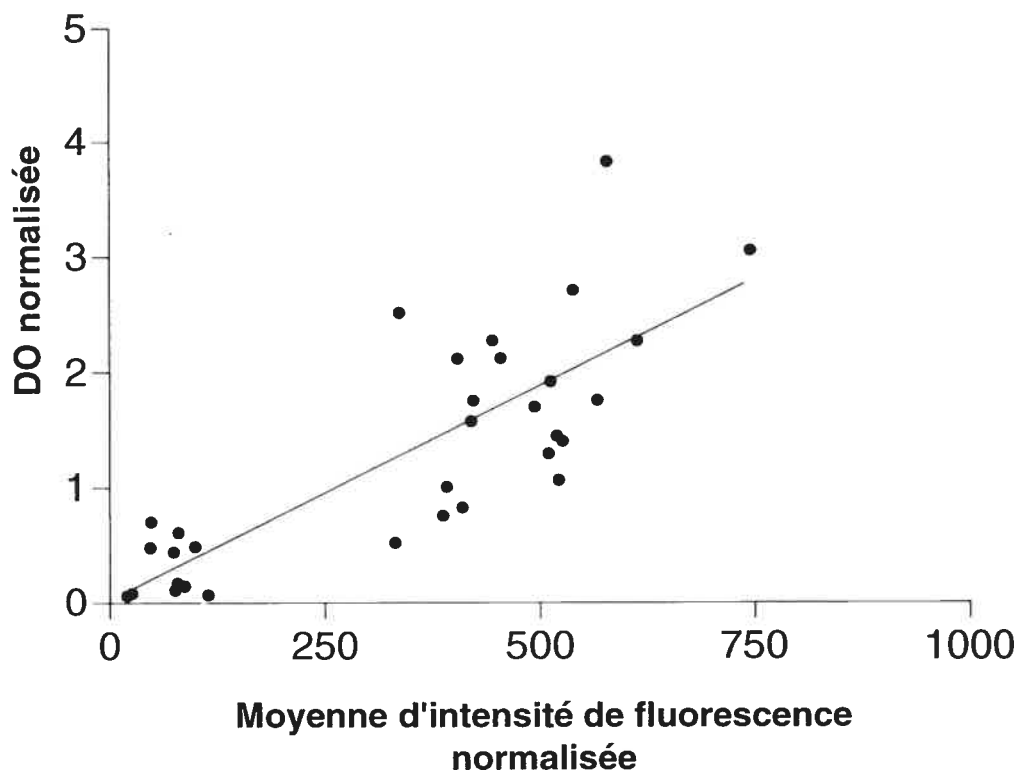


Figure 5. Corrélation entre les titres d'anti-topo I en ELISA et l'activité de liaison en cytométrie en flux

Corrélation significative entre les titres d'anti-topo I déterminés par ELISA et l'intensité de fluorescence mesurée par cytométrie en flux. Chaque valeur a été normalisée par rapport au même sérum AFA positif. La valeur de P (<0.0001) a été obtenue par une corrélation de Pearson ($R^2 = 0.66$).

Liaison des anti-topo I aux fibroblastes

Pour s'assurer que la liaison des IgG aux cellules était imputable aux anti-topo I, ceux-ci ont été purifiés par affinité à partir de sérum humain, à l'aide d'une résine portant la topo I immobilisée. Le résultat typique d'une telle purification est montré à la figure 6. Par immunobuvardage sur un lysat de fibroblastes pulmonaires (NHLF), les anticorps ainsi purifiés ne reconnaissaient que la topo I cellulaire.

Ces anti-topo I purifiés ont ensuite été utilisés en immunofluorescence. Le patron de marquage obtenu avec les anti-topo I et les IgG totaux était semblable, ce qui indiquait que ce sont les anti-topo I qui étaient liés à la surface cellulaire¹¹⁷ (voir la figure 5 dans l'annexe I).

De plus, six préparations d'anti-topo I provenant de sérums anti-topo I positifs différents ont été testés en cytométrie en flux. La liaison de deux d'entre eux est illustrée à la figure 7. De plus, un anticorps monoclonal commercial spécifique à la topo I montrait aussi une activité de liaison aux fibroblastes. Tout comme les sérums complets, cette activité de liaison aux cellules était spécifique aux WI-38 et n'a pas été observée sur les HUVEC (Figure 7). Un anti-intégrine anti-CD51, un marqueur de la surface cellulaire, était positif pour les deux types cellulaires (Figure 7). Nous avons donc pu démontrer la liaison directe d'aAc anti-topo I purifiés à la surface des fibroblastes.

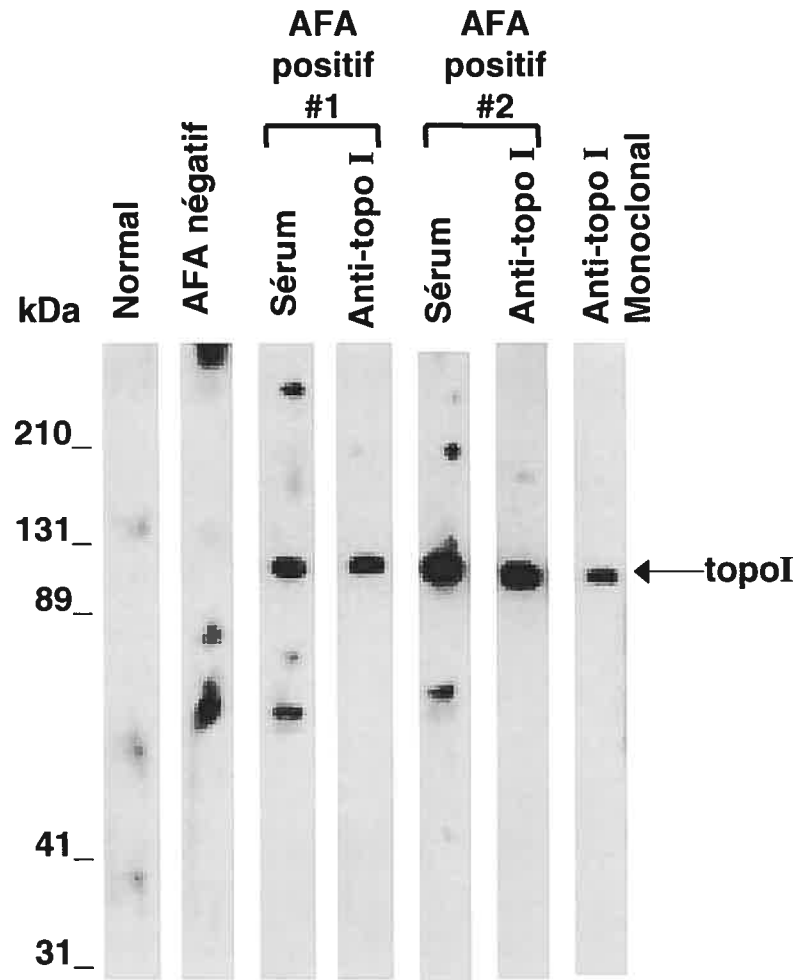


Figure 6. Purification d'anti-topo I

Immunobuvardage sur un lysat de NHLF avec un sérum normal, un sérum AFA négatif, deux sérums AFA positifs, deux anti-topo I purifiés par affinité provenant des sérums AFA positifs et un anticorps monoclonal IgM anti-topo I. Seule la bande à 95 kDa de la topo I a été reconnue par les IgG purifiés. La position des marqueurs de poids moléculaire (kDa) est indiquée à gauche. Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

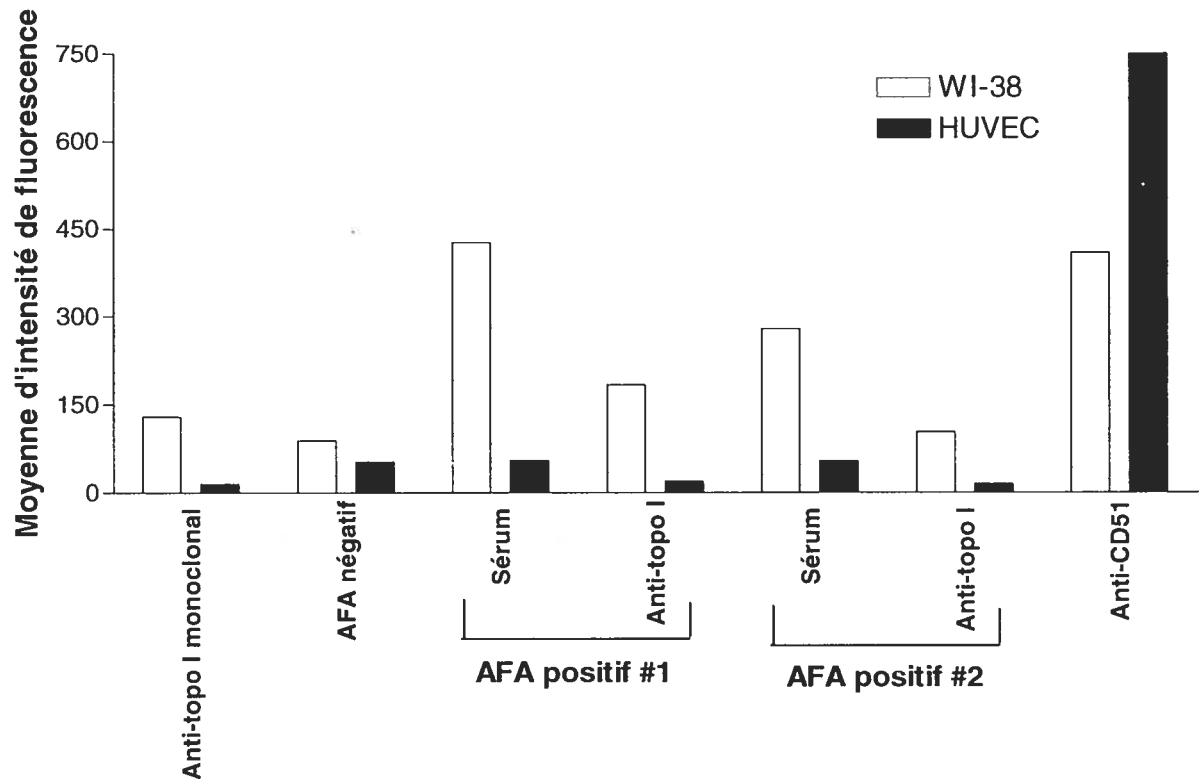


Figure 7. Liaison des IgG anti-topo I purifiés aux fibroblastes

Cytométrie en flux sur des WI-38 (en blanc) et HUVEC (en noir) avec des anti-topo I purifiés par affinité à partir de deux sérums AFA positifs. Un contrôle pour la surface cellulaire, l'anti-intégrine CD51, a été utilisé ainsi qu'un anticorps monoclonal IgM anti-topo I. Les sérums normaux et AFA négatifs ne montraient pas de liaison, exprimée sous forme de MIF.

Liaison de la topo I aux fibroblastes

Pour obtenir une preuve supplémentaire que les IgG anti-topo I se liaient bien à la surface cellulaire, nous avons procédé à une compétition avec l'antigène. L'hypothèse était que l'adsorption des anticorps par l'antigène empêcherait la liaison des aAc aux cellules, analysée par la suite en cytométrie en flux.

Toutefois, contrairement à ce qui était attendu, en présence de topo I exogène, l'intensité de fluorescence augmentait à la mesure de l'augmentation de la quantité de topo I (Figure 8). L'intensité de la liaison était la même que la topo I soit d'abord ajoutée directement aux fibroblastes ou que les anticorps soient au préalable incubés avec la topo I, avant d'être exposés aux cellules (non montré). Par contre, l'incubation d'un sérum anti-topo I négatif avec les mêmes concentrations de topo I n'avait pas vu la liaison aux cellules de celui-ci augmenter (Figure 8). L'ajout de topo I à un anticorps ne reconnaissant pas la topo I, l'anti-CD51, n'avait provoqué aucun accroissement de liaison (non montré).

Tous les sérums anti-topo I positifs avaient vu soit l'intensité de la fluorescence soit le pourcentage de cellules positives augmentés de manière significative avec l'ajout de topo I (non montré). Des anti-topo I purifiés par affinité démontraient eux aussi une augmentation significative de la liaison suite à l'incubation avec 2.5 µg/mL de topo I (Figure 9). Nous avons donc conclu que la topo I devait se lier directement aux fibroblastes, formant ainsi un nombre croissant de sites pour la liaison des anti-topo I.

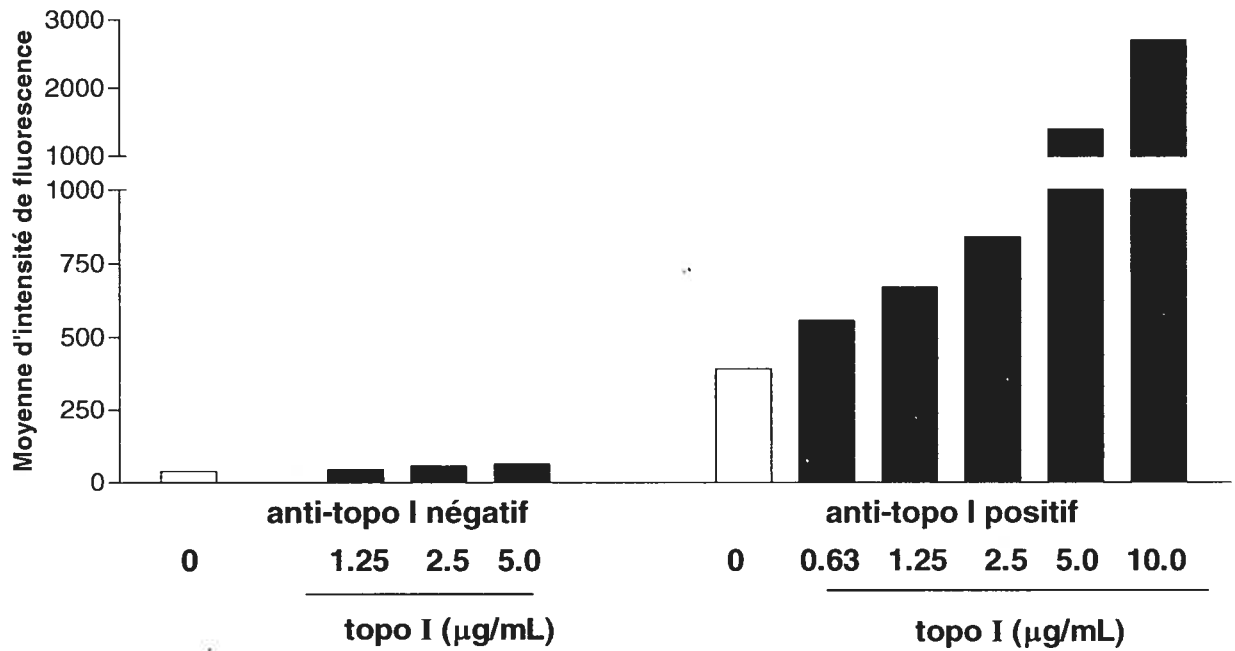


Figure 8. Liaison des anti-topo I aux fibroblastes par cytométrie en flux, en présence de topo I

Courbe dose-réponse de la liaison des IgG anti-topo I, en fonction de la quantité de topo I exogène ajoutée aux cellules WI-38 en suspension. La liaison a été détectée pour un sérum anti-topo I positif et un sérum anti-topo I négatif et est exprimée sous forme de MIF.

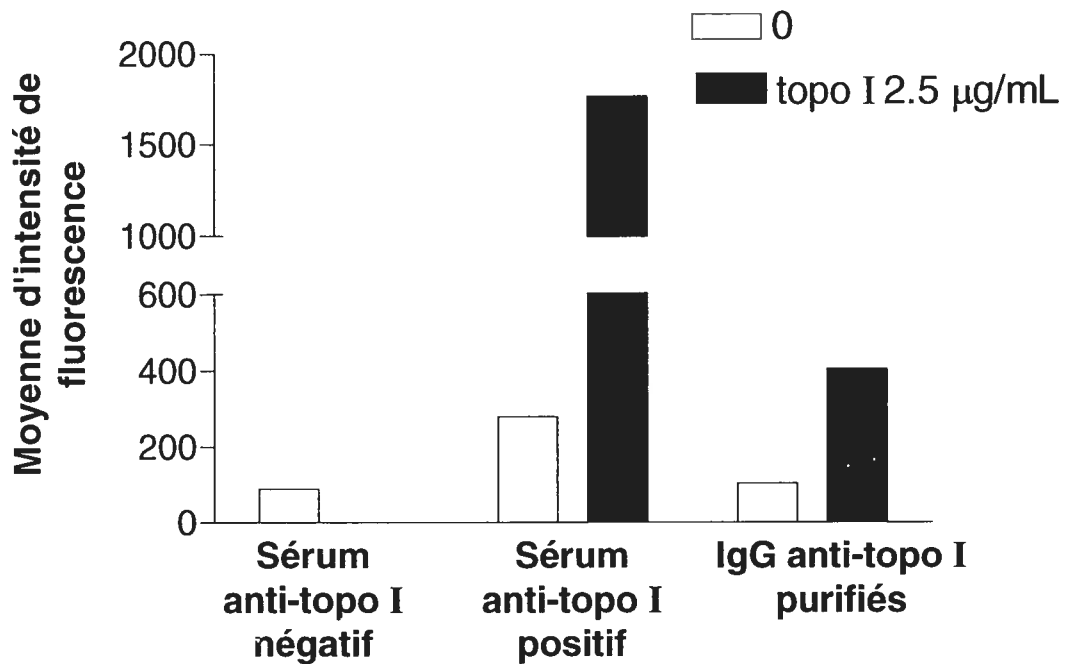


Figure 9. Liaison des anti-topo I purifiés aux fibroblastes, en présence de topo I

Liaison mesurée par cytométrie en flux d'une préparation d'anti-topo I, purifiés par affinité, en absence (en blanc) ou en présence de 2.5 µg/mL de topo I (en noir), sur des fibroblastes pulmonaires WI-38.

Cette liaison directe de la topo I aux cellules a pu être démontrée en cELISA. Des WI-38 adhérents à une surface enduite de collagène, pour éviter une perte excessive de cellules durant les manipulations, ont servi de cible antigénique aux aAc. Après préincubation des cellules avec la topo I, les sérums ont été mis en contact avec les fibroblastes et la liaison a été révélée avec un anti-IgG humain couplé à la peroxydase. La concentration optimale de topo I, permettant d'observer des différences entre les sérums, avait préalablement été établie à 0.5 µg/mL (Hénault, J., communication personnelle). Contrairement aux résultats de cytométrie en flux, les sérums anti-topo I positifs, sans ajout de topo I, ne démontraient aucune liaison aux fibroblastes adhérents (non montré). Après incubation des WI-38 avec la topo I, une quantité croissante de sérum a été appliquée sur les cellules. La Figure 10a montre une courbe en hyperbole représentative de la liaison des sérums anti-topo I positifs aux fibroblastes par cELISA. Un sérum représentatif du groupe normal et un sérum anti-topo I négatif ne liaient pas la surface cellulaire malgré l'ajout de topo I exogène (Figure 10b).

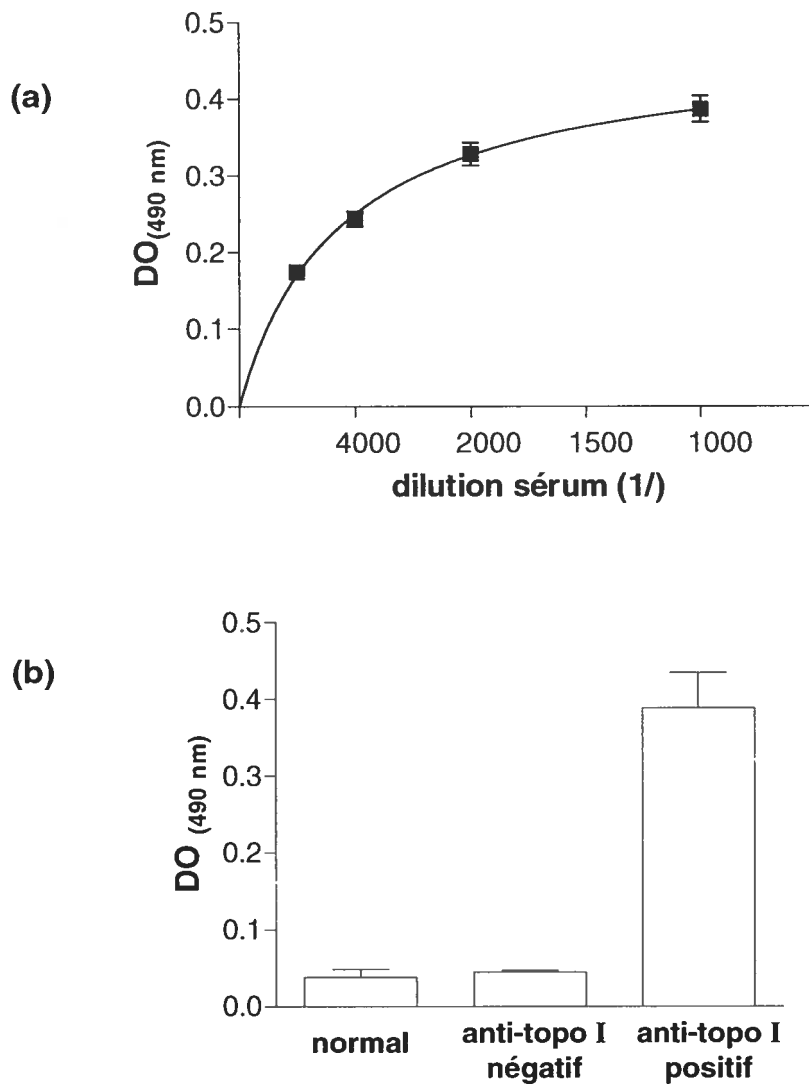


Figure 10. Liaison des sérums anti-topo I positifs aux fibroblastes adhérents préincubés avec la topo I

(a) Courbe de liaison de la topo I aux WI-38 obtenue par cELISA. La topo I ($0.5\ \mu\text{g/mL}$), ajoutée aux cellules, a été détectée avec une concentration croissante de sérum anti-topo I positif. **(b)** Données représentatives de la liaison de sérums anti-topo I positif, anti-topo I négatif ou normal (dilution 1:1000) par la technique de cELISA. Les données illustrées sont les moyennes \pm SD des échantillons testés en duplicata et les résultats sont exprimés sous forme de $DO_{490\text{ nm}}$.

Les anti-topo I purifiés décrivaient aussi une telle courbe hyperbolique en cELISA (Figure 11). Le titrage de deux anti-topo I purifiés montrait une affinité différente des anticorps de type IgG pour la topo I. La valeur du K_D , la concentration d'anticorps pour laquelle 50% de la liaison maximale est obtenue, était plus basse pour les anti-topo I du sérum 10 669 ($K_D = 14 \text{ ng}/\mu\text{L}$) que pour le 4905 ($K_D = 0.75 \text{ ng}/\mu\text{L}$). Cette donnée indique une affinité plus forte des anti-topo I 10 669 par rapport au 4905. Toutefois, la valeur du B_{max} , soit la capacité maximale de liaison exprimée sous forme de densité optique, variait peu entre les deux préparations d'anti-topo I. Pour le sérum le plus fort, elle était de 0.32 DO alors que pour le sérum le plus faible, elle était de 0.38 DO.

En cELISA, la topo I se liait relativement peu aux cellules endothéliales HUVEC, soit un niveau d'environ 50% de celui des fibroblastes (non-montré). Cependant, par immunofluorescence, la liaison de la topo I aux HUVEC était totalement indétectable (Hénault, J., communication personnelle).

La confirmation que la topo I se liait à la surface cellulaire des fibroblastes adhérents a été effectuée par immunofluorescence (Hénault, J., communication personnelle). La liaison de cet aAg, la topo I, était donc spécifique aux fibroblastes et se retrouvait à la surface cellulaire.

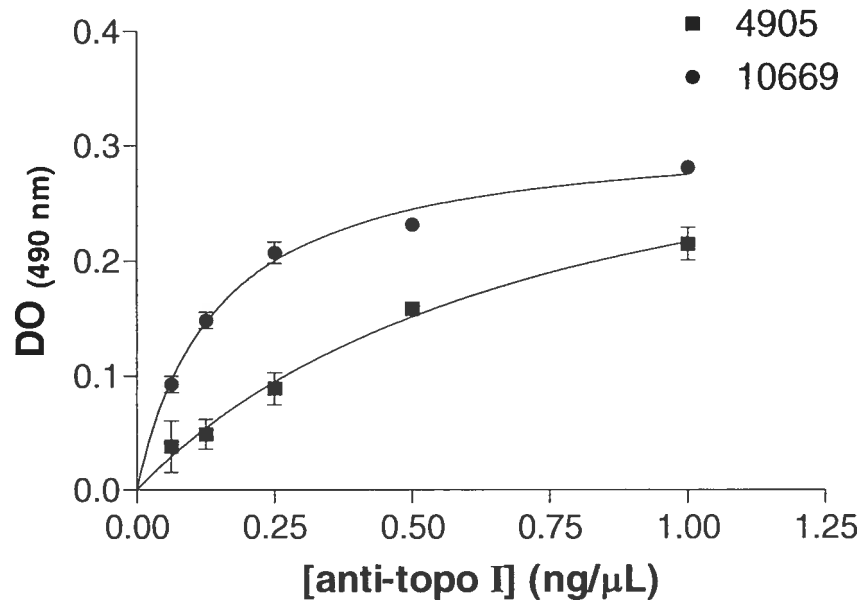


Figure 11. Liaison des anti-topo I purifiés aux fibroblastes pulmonaires via la topo I

Titration des anti-topo I, purifiés par affinité à partir de deux sérums anti-topo I positifs, sur les fibroblastes WI-38 préincubés avec 0.5 μg/mL de topo I. Les données présentées sont les moyennes ± SD des échantillons testés en duplicata et les résultats sont exprimés sous forme de $DO_{490\text{ nm}}$.

Liaison d'un fragment de topo I aux fibroblastes

Afin de cartographier les épitopes reconnus par les anti-topo I, deux fragments de topo I ont été produits. Les 2 fragments se retrouvent en partie C-terminale de la topo I (Figure 12). Un fragment d'environ 15 kDa (84 acides aminés; 489 à 573) a précédemment été trouvé comme portant l'épitope conformationnel majeur de la topo I parmi la cohorte SSc analysée par Kuwana⁸⁶. Le second fragment, de 25 kDa (201 acides aminés; 434 à 635), englobe l'épitope précédent ainsi que des séquences flanquantes ajoutant un élément conformationnel au fragment contenant l'épitope. En effet, il s'agit du sous-domaine III de la topo I, comprenant tous les sites de liaison de l'ADN sauf le résidu du site actif, la tyrosine723. De plus, ce sous-domaine se retrouve à la surface de la molécule¹⁰³.

Production des fragments de topo I

Les fragments de 250 pb et 600 pb correspondant aux fragments protéiques désirés ont été amplifiés par PCR à partir du vecteur pBluescript/topo I contenant l'ADNc de la topo I (Figure 13). Les amorces contenaient les sites de restriction NcoI et XmaI et les amplicons furent digérés par ces enzymes et insérés dans un vecteur de clonage TOPO[®]. Le sous-clonage a ensuite été complété dans les vecteurs pVEX 2.3 et 2.4b Nde, contenant respectivement une queue de hexa-histidines en C-terminal et en N-terminal de la séquence insérée.

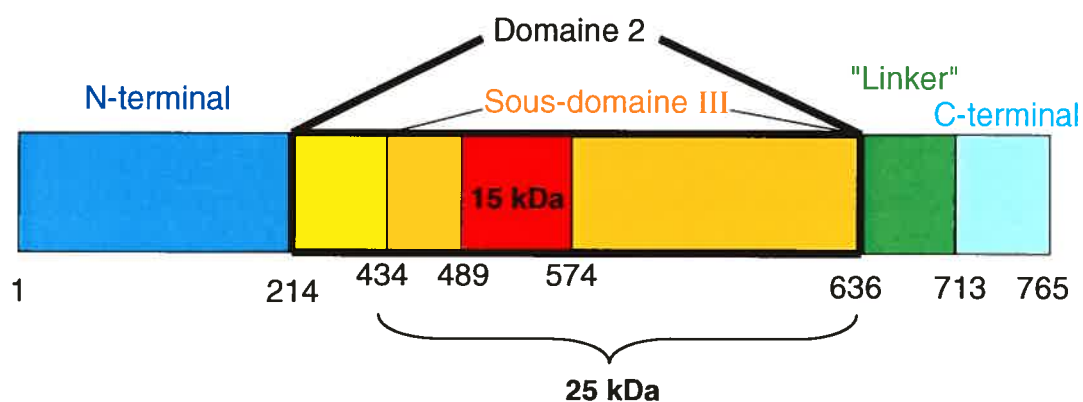


Figure 12. Représentation schématique de la structure de la topo I

Les deux fragments produits font partie du domaine 2. L'épitope conformationnel, le fragment de 15 kDa, est en rouge et se compose des acides aminés 489 à 573. Le second fragment, de 25 kDa, est représenté en orange et contient l'épitope précédent (acides aminés 434 à 635)

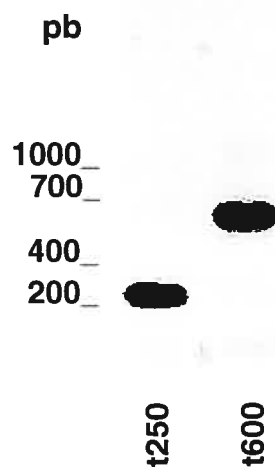


Figure 13. Migration sur gel d'agarose des fragments d'ADN de la topo I amplifiés par PCR

Fragments de 250 et 600 pb amplifiés à partir de l'ADNc de la topo I par PCR avec les amorces indiquées dans la section matériel et méthodes. La position des marqueurs de poids moléculaire (pb) est indiquée à gauche.

Les protéines ont été nommées selon leur poids moléculaire et la disposition de la queue d'histidines : ainsi, le fragment de 25 kDa avec les histidines en N-terminal a été appelé H25. Les protéines ont été produites dans un système bactérien ayant un promoteur de la T7 polymérase inductible à l'arabinose, les BL21-AI. Après induction de 2 heures ou de 4 heures, les trois protéines étaient surexprimées alors qu'elles étaient absentes du lysat bactérien non-induit (Figure 14). Elles se trouvaient au poids moléculaire attendu d'environ 15 kDa (H15) et 25 kDa (25H et H25) sur gel de polyacrylamide. Ces bandes correspondaient bien aux protéines d'intérêt, car elles ont été reconnues par un anticorps anti-histidine (Figure 14b). Afin de contourner le problème de la dégradation du fragment de 25 kDa par le lysozyme (non montré), l'extraction du lysat bactérien a été faite en conditions dénaturantes. Cette technique avait, de plus, comme avantage d'éviter la dégradation par les protéases, alors inactivées. La purification a ensuite été faite avec une résine de nickel dans des conditions hybrides, c'est-à-dire que les étapes précédant l'élution ont été faites avec des tampons contenant un agent dénaturant alors que celui-ci a été supprimé lors de l'étape finale de l'élution de la protéine. Cette méthode a permis de purifier une quantité importante de protéines recombinantes, variant de 4 à 100 mg de protéines/L de culture bactérienne. Les fractions récoltées étaient pures et exemptes de contaminants, comme il est possible de le voir avec la coloration au bleu de Coomassie (Figure 15). Pour des raisons de commodité, les protéines H15 et 25H ont été utilisées dans les expériences subséquentes.

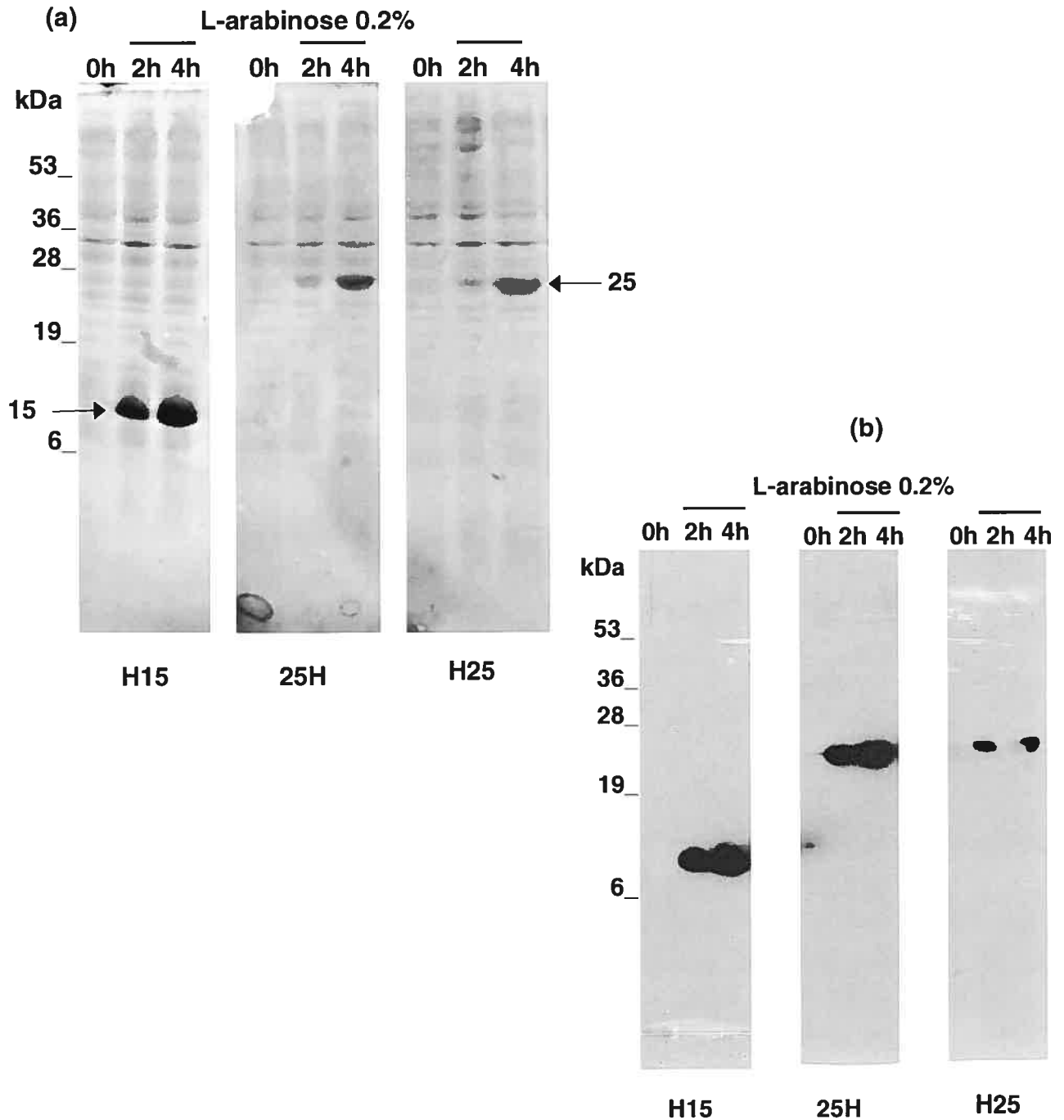


Figure 14. Expression des fragments recombinants de la topo I

(a) Coloration au bleu de Coomassie du lysat bactérien de 3 clones exprimant respectivement les protéines H15, 25H et H25 après divers temps d'induction avec le L-arabinose. La position des marqueurs de poids moléculaire (kDa) est indiquée à gauche. (b) Immunobuvardage des mêmes lysats avec un anticorps anti-penta histidine (dilution 1 :1000).

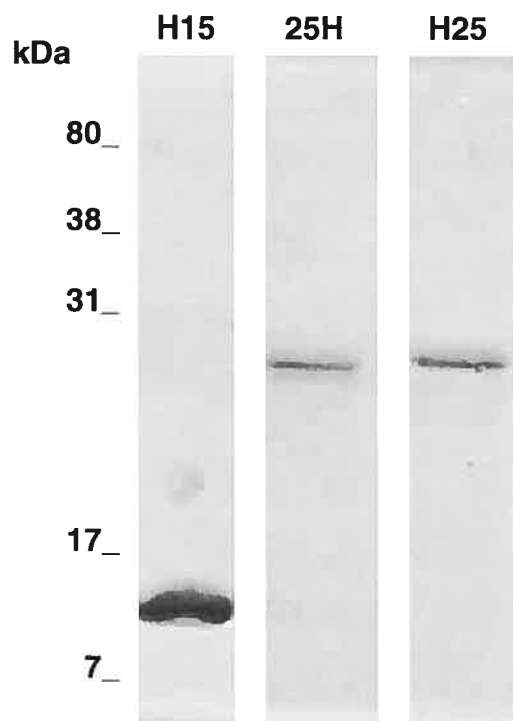


Figure 15. Purification des fragments de topo I

Coloration au bleu de Coomassie des trois protéines recombinantes purifiées H15, 25H et H25 sur une résine de nickel. Les marqueurs de poids moléculaire (en kDa) sont indiqués à gauche.

Liaison des sérums aux fragments de topo I

Ces protéines, contenant un épitope majeur de la topo I, ont ensuite été testées en ELISA avec un échantillon de la cohorte SSc (n=27, Figure 16). Afin de pouvoir comparer la liaison des sérums à la topo I et aux fragments, l'utilisation de 5 μ moles de protéine a été privilégiée (topo I=350 ng, H15=75 ng et 25H=125 ng). Les deux fragments n'ont pas été reconnus par des sérums anti-topo I négatifs ni normaux ni SLE (non-montré). Un anticorps anti-histidine nous avait permis de valider notre test ELISA (non-montré). La majorité des sérums anti-topo I positifs (18/25, 72%) reconnaissaient à la fois les fragments H15 et 25H. En effet, il y avait une corrélation très significative entre la liaison pour H15 et 25H ($R^2=0.78$, $P<0.0001$; Figure 17a). Par contre, les titres d'anti-topo I n'étaient pas un indicateur prédisant la liaison aux protéines recombinantes. Cela nous indique que d'autres épitopes peuvent être reconnus par les sérums. En effet, certains sérums anti-topo I positifs ne reconnaissaient pas les fragments (Figure 16). Les titres mesurés pour la liaison sur H15 avaient peu de corrélation avec ceux pour la topo I, mais était malgré tout statistiquement significative ($R^2=0.42$; $p=0.0003$, Figure 17b). Par contre, les titres pour 25H différaient de ceux pour la topo I, comme nous l'indique l'absence de corrélation ($R^2=0.12$; $p=0.795$, Figure 17c).

D'autre part, les deux anticorps monoclonaux commerciaux disponibles dirigés contre la topo I ne reconnaissaient aucun de ces deux épitopes produits (non montré). Cependant, la majorité des sérums de la cohorte SSc, tout comme dans les études précédentes^{86,90,94}, pouvaient reconnaître ces deux fragments, H15 et 25H, qui se retrouvent plutôt en partie C-terminale de la topo I.

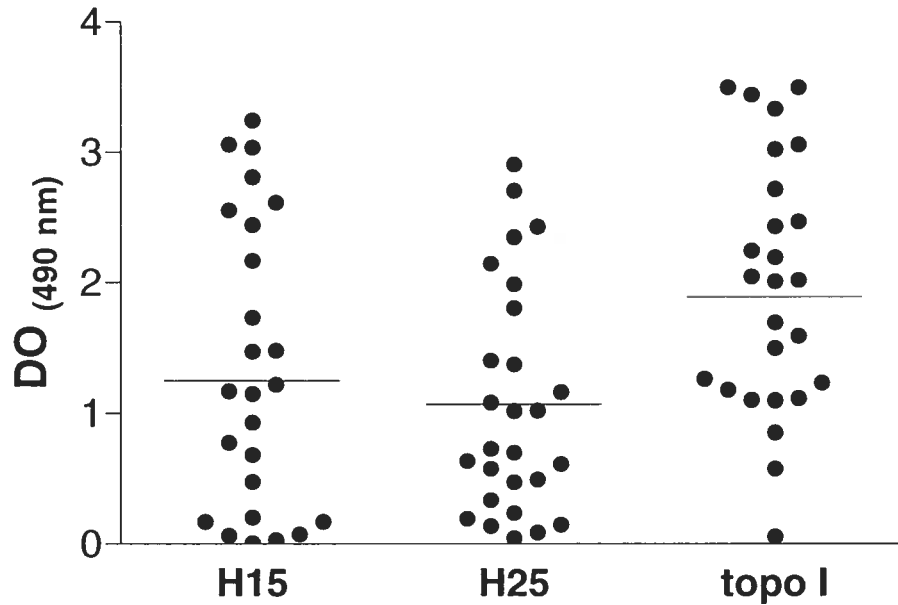


Figure 16. Liaison des sérums anti-topo I positifs aux fragments de 15 et 25 kDa de la topo I

Reconnaissance par les sérums SSc anti-topo I positifs (n=27) des fragments H15 et 25H par ELISA. Chaque sérum a été testé en duplicata sur 5 μ moles de chacune des protéines. Les barres représentent les moyennes et l'ordonnée indique la DO à 490 nm.

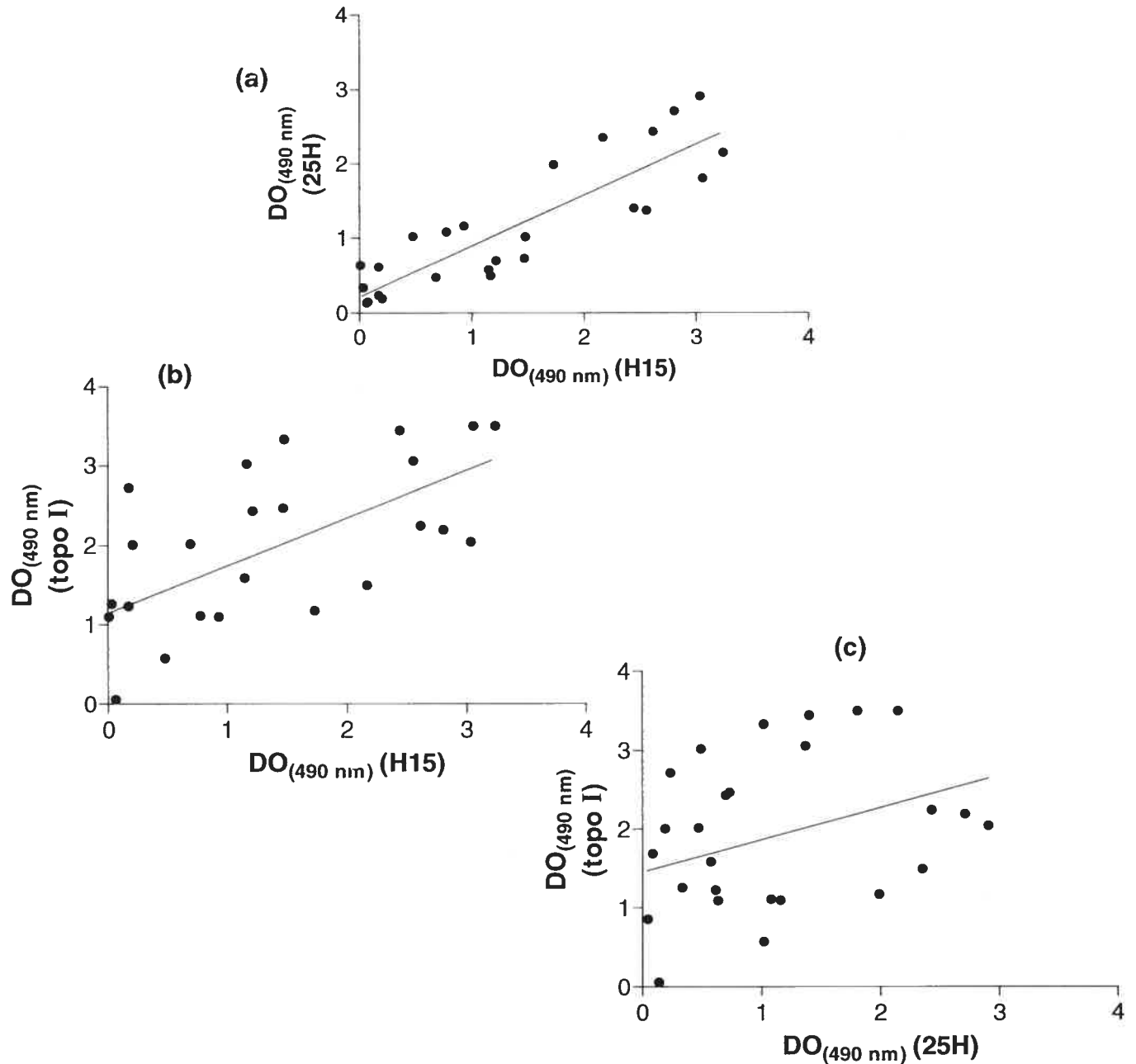


Figure 17. Corrélation entre la liaison des sérums anti-topo I positifs aux fragments de topo I, H15 et 25H, et à la topo I entière en ELISA

Corrélation de la liaison des sérums anti-topo I positifs entre **(a)** H15 et 25H ($R^2=0.78$; $p<0.0001$) **(b)** H15 et topo I ($R^2=0.42$; $p=0.0003$) **(c)** H25 et topo I ($R^2=0.12$; $p=0.795$). Les valeurs de P ont été déterminées par une corrélation de Pearson.

Liaison des fragments aux fibroblastes

Afin de vérifier si ces fragments de topo I pouvaient se lier aux fibroblastes, ils ont été testés en cELISA, sur les WI-38. Après incubation des fragments avec les cellules, un sérum les reconnaissant a été détecté par un anti-IgG humain couplé à la peroxydase. Seul le plus long fragment (25H) se liait aux cellules et a été reconnu par un sérum qui le reconnaissait fortement en ELISA, avec une DO de 2.907 (Figure 18a). La liaison était la même pour le fragment ayant la queue d'histidines en N-terminal, H25 (non-montré). Un sérum, le 3415, ne liant pas le fragment de 25 kDa en ELISA (DO=0.194) ne montrait aucune liaison après incubation de celui-ci sur les cellules. Le fragment court de 15 kDa ne se liait pas aux fibroblastes, car il n'y a pas été détecté par un sérum reconnaissant H15 en ELISA. Aucune liaison n'a été détectée avec un sérum anti-topo I négatif (Figure 18b). Il a été remarqué qu'une concentration importante (39 µg/mL) du fragment 25H était nécessaire pour obtenir une liaison de niveau semblable à celle de la topo I (0.5 µg/mL) (non montré). Tout comme la topo I, la liaison du fragment 25H était spécifique aux fibroblastes, la liaison aux HUVEC étant nulle par cELISA (non-montré).

Les sérums anti-topo I positifs de la cohorte SSc ont été testés en cELISA en utilisant une concentration de 10 µg/mL du fragment 25H. Nous avons pu observer qu'il y avait une corrélation significative ($R^2=0.32$; $p<0.0038$) entre la liaison au fragment 25H en ELISA et la liaison au fragment 25H par la technique de cELISA (Figure 19). Ainsi, un fragment en C-terminal de la topo I, reconnu par des aAc de sérums anti-topo I positifs de patients SSc, reconnaissait la surface de fibroblastes.

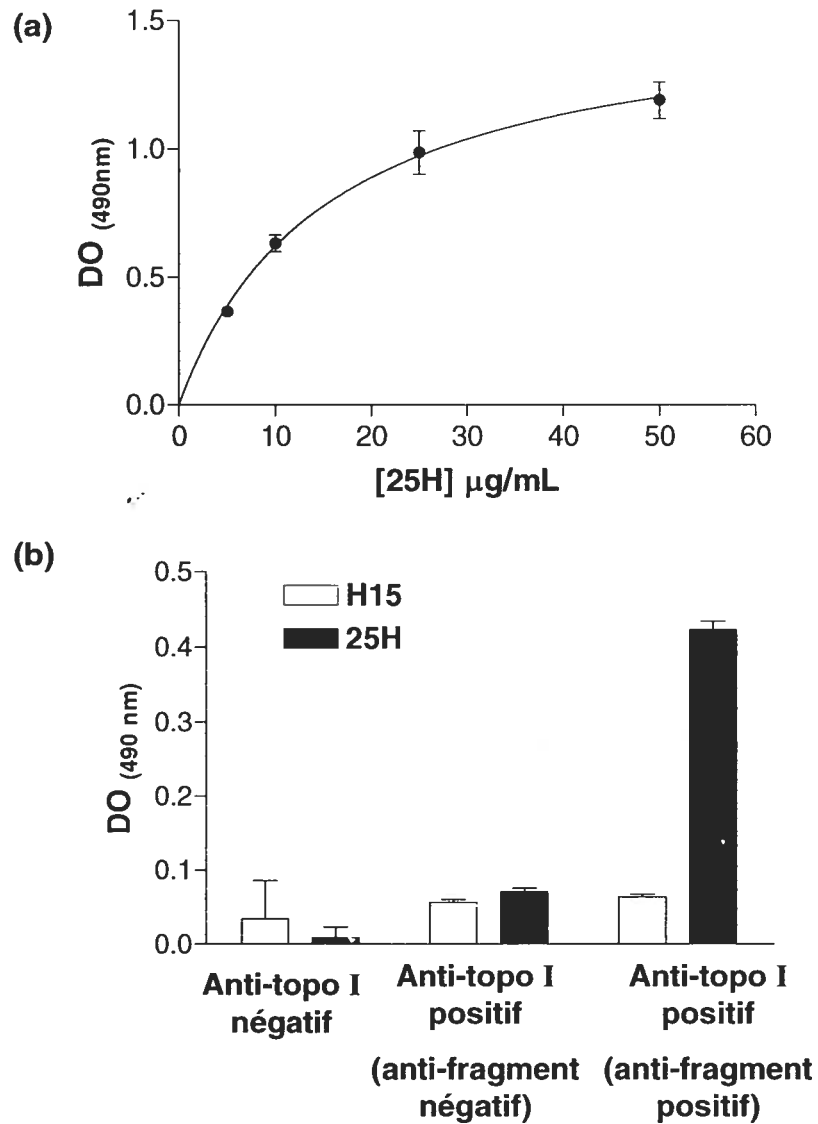


Figure 18. Liaison aux fibroblastes du fragment de 25 kDa de la topo I

(a) Titrage de la liaison du fragment 25H aux fibroblastes WI-38 mesurée par cELISA. La liaison a été détectée par un sérum anti-topo I positif (dilution 1 :1000) reconnaissant fortement le fragment 25H en ELISA (DO=2,907). **(b)** Liaison de sérums anti-topo I négatifs ou positifs aux fibroblastes incubés sur les fragments H15 (en blanc) ou 25H (en noir), à 25 $\mu\text{g/mL}$. Les tests ont été faits en duplicata et l'ordonnée exprime la DO à 490 nm.

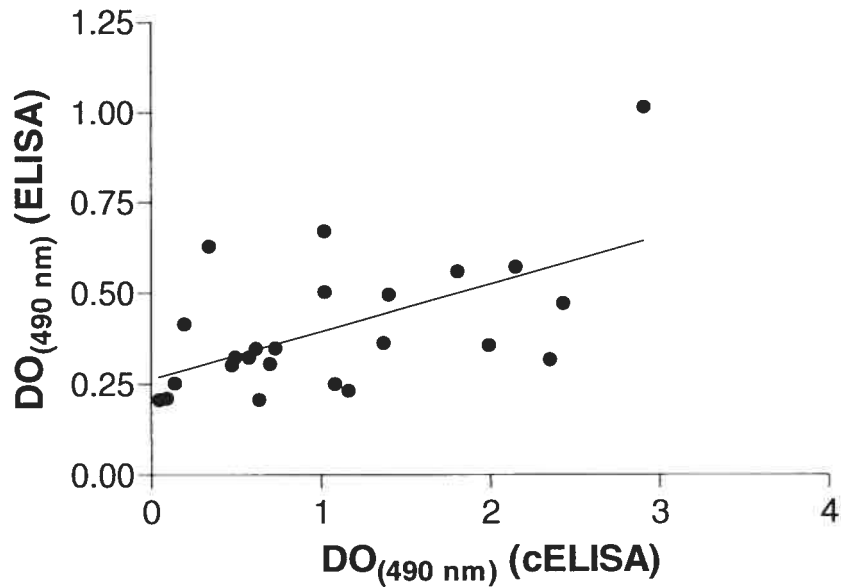


Figure 19. Corrélation entre la liaison des sérums au fragment 25H en ELISA et en cELISA

Corrélation significative entre la liaison des sérums au fragment 25H en ELISA et la liaison aux cellules de ce fragment détectée par ces sérums en cELISA. L'abscisse représente la $DO_{490 \text{ nm}}$ de liaison en ELISA alors que l'ordonnée montre la liaison des sérums obtenue par cELISA en $DO_{490 \text{ nm}}$. La valeur de P ($p < 0.0038$) a été calculée par un test de corrélation de Pearson ($R^2 = 0.32$).

DISCUSSION

Anticorps antifibroblastes

En plus des aAc classiques comme les ANA, d'autres aAc étaient présents dans les sérums de patients SSc : des IgG se liant à la surface des fibroblastes. D'autres études dans le passé avaient déjà mis en évidence la présence d'anticorps reconnaissant les fibroblastes¹¹³⁻¹¹⁶. Les AFA que nous avons identifiés étaient d'isotype IgG, alors que les AFA précédemment décrits étaient tout autant d'isotype IgG que IgM¹¹⁴, ce qui n'a pas été testé pour les sérums de notre cohorte.

La fibrose sclérodermique est une manifestation pathologique impliquant principalement les fibroblastes, ce qui justifie notre intérêt pour l'étude des AFA. Nous avons montré que ceux-ci se liaient spécifiquement aux fibroblastes, et non aux cellules endothéliales ou musculaires lisses. Quelques grands types cellulaires n'ont toutefois pas été testés comme les cellules du système immunitaire, les cellules nerveuses et épithéliales.

Les AFA ont été retrouvés principalement chez les patients SSc¹¹⁴. Nos résultats nous indiquent que, en plus de la SSc, les AFA étaient aussi présents chez une minorité de patients du groupe SLE. Mais, les sérums AFA positifs du groupe SLE n'avaient pas d'activité anti-topo I.

Par contre, les études précédentes n'avaient pas établi de corrélation entre les AFA et les ANA chez ces patients¹¹³⁻¹¹⁶. Nous avons démontré clairement l'identité des AFA, les anti-topo I, par plusieurs techniques : l'ELISA, l'immunobuvardage et l'immunofluorescence¹¹⁷ (voir respectivement la figure 4 ainsi que les figures 3 et 5 dans l'annexe I). Nous avons pu confirmer que les anti-topo I se liaient à la surface cellulaire, car ils montraient la même liaison qu'un anticorps monoclonal dirigé contre la topo I. Des aAc spécifiques à la topo I, purifiés par affinité sur de la topo I à partir de sérums SSc humains, ont aussi démontré la même liaison par cytométrie en flux.

Il est connu que les anti-topo I sont présents principalement chez les patients souffrant de SSc et qu'ils sont associés à la fibrose pulmonaire et à une mortalité accrue⁷³. Il est donc cohérent de retrouver les AFA essentiellement chez les malades SSc. Les patients ayant des AFA avaient une atteinte pulmonaire et un taux de mortalité significativement plus élevés que le groupe AFA négatif. Les associations cliniques des AFA confirment donc indirectement la relation étroite entre les AFA et les anti- topo I.

Dans une étude antérieure, les AFA étaient particulièrement associés à la SSc diffuse, mais n'étaient pas reliés à la fibrose ou d'autres problèmes pulmonaires¹¹⁴. Par contre, nos AFA n'étaient pas associés à aucune forme de la SSc. Ces points soulèvent la possibilité qu'il puisse exister plusieurs types d'AFA.

Liaison aux cellules en suspension et adhérentes

Nous avons observé que les anti-topo I pouvaient se lier à la surface de fibroblastes en suspension, par cytométrie en flux. Il semble contradictoire de constater que ces anti-topo I ne se liaient pas aux fibroblastes adhérents par la technique de cELISA. Cette liaison aux cellules adhérentes aurait été beaucoup plus pertinente physiologiquement, les fibroblastes étant des cellules, par nature, adhérentes à l'ECM qu'ils sécrètent. L'explication est venue de l'observation subséquente qui indiquait que les anti-topo I se liaient à la surface cellulaire via leur aAg, la topo I. Il est donc probable que la liaison détectée par cytométrie en flux des anti-topo I aux cellules détachées ait été due, en fait, directement à la topo I présente dans le milieu. Durant les manipulations, principalement lors du détachement des cellules avec une solution contenant de l'EDTA, une partie des cellules ont été perméabilisées. À l'aide du marqueur fluorescent 7-AAD liant l'ADN, nous

avons pu observer par cytométrie en flux qu'une proportion de 40 à 60% des cellules étaient perméabilisées (non montré). Celles-ci peuvent donc avoir relâché leur contenu cellulaire, dont la topo I, qui se liait ensuite aux fibroblastes intacts que nous analysions pour la présence d'anti-topo I à leur surface.

Il a été remarqué que la liaison de la topo I aux cellules se faisait relativement rapidement. Une incubation de 30 minutes était suffisante pour atteindre le maximum de liaison. De plus, une quantité relativement faible de topo I permettait la détection de la liaison. En effet, à la plus faible concentration utilisée de topo I, soit 0.63 µg/mL, la saturation des sites membranaires était maximale, car près de 100% des cellules étaient liées par la topo I (non-montré). À l'inverse, les cellules adhérentes ne subissant pas de traitements susceptibles de les perméabiliser, aucune topo I cellulaire endogène ne pouvait se lier aux fibroblastes et servir de ligand aux anti-topo I.

Cible de la topo I

La découverte la plus importante de cette étude a été la liaison directe de la topo I aux fibroblastes. Elle a pu être confirmée par cytométrie en flux et par cELISA, à l'aide d'un sérum anti-topo I positif et d'anti-topo I, purifiés par affinité sur de la topo I, ainsi que par immunofluorescence (non-montré). Peu de protéines nucléaires ont été observées à la surface de cellules intacts, non-apoptotiques. La nucléoline, une protéine nucléaire impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire, a été localisée à la surface de nombreux types cellulaires¹²¹⁻¹²³. En effet, il a été montré que la nucléoline faisait la navette entre le noyau et la surface cellulaire¹²². Elle y joue un rôle de récepteur pour plusieurs ligands et ce complexe peut ensuite être endocytosé¹²⁴. Cette protéine a déjà été identifiée comme étant un aAg

dans des maladies telles que le SLE et des infections virales, l'hépatite A aiguë et la mononucléose infectieuse¹²⁵.

Les membres de la famille des histones ou les unités de nucléosome peuvent également se lier à la surface de plusieurs types cellulaires, tels que les leucocytes¹²⁶, les cellules T¹²⁷ ou B¹²⁸. Ces nucléosomes se lieraient aux protéoglycans présents à la surface cellulaire¹²⁷. Les histones sont aussi des cibles pour des aAc, principalement retrouvés chez des patients atteints de SLE¹²⁹.

Par contre, la cible de la topo I semble possiblement beaucoup plus spécifique. En effet, nos résultats démontrent qu'elle se trouve uniquement sur les fibroblastes ou alors, en très faible quantité, sur les cellules endothéliales ou musculaires lisses.

La cible cellulaire de la topo I n'est pas encore connue. Toutefois, nous savons déjà que la topo I ne se lie pas à l'ADN pouvant se trouver à la surface. Des acides nucléiques avaient été précédemment localisés à la surface des cellules Hela et A431¹³⁰. Un traitement préalable des fibroblastes avec de la DNaseI n'a toutefois pas aboli la liaison de la topo I à leur surface (non-montré).

Il serait donc plausible que la topo I interagisse avec une protéine spécifique de la surface des fibroblastes. Différentes méthodes d'études pourraient être employées afin d'identifier la cible de la topo I. Les interactions protéines-protéines peuvent être détectées et identifiées à l'aide d'une banque d'expression d'ADNc codant pour l'ensemble du génome de fibroblastes pulmonaires humains. Sinon, la cible pourrait être identifiée en la détectant par immunobuvardage. Suite à l'incubation de la topo I sur un lysat de fibroblastes transféré sur une membrane de nitrocellulose, la liaison serait révélée par un anticorps anti-topo I. Les bandes correspondantes pourraient alors être découpées du gel et identifiées par spectrométrie de masse. Une seconde façon d'y parvenir serait d'effectuer la biotinylation des protéines de la surface des fibroblastes adhérents. En immunoprécipitant avec un anticorps

spécifique la topo I liée à sa cible, nous pourrions identifier celles-ci en ne révélant que les protéines biotinylées. Cette technique aurait pour avantage d'éliminer les nombreuses interactions possibles avec des protéines cytoplasmiques ou nucléaires, qui sont anticipées dans le cas de la topo I, une enzyme impliquée dans la réplication de l'ADN, entre autres. En effet, certains partenaires connus de la topo I sont des protéines cellulaires telles que p53 ou TATA *binding protein*⁹⁹. Il est également admis que le domaine N-terminal de la topo I est impliqué dans ces interactions. Toutefois, nous avons par la suite montré, par cELISA, que la liaison aux fibroblastes pouvant se faire via un fragment de taille relativement réduite de la topo I (25H). Ce fragment ne comprend pas le domaine N-terminal. Il y a donc de fortes chances que le partenaire membranaire de la topo I n'ait pas encore été décrit.

Les fragments de topo I

Épitopes reconnus par les anti-topo I

Nous avons produit deux fragments de la partie C-terminale de la topo I. Celui de 15 kDa est un fragment contenant un épitope majeur de la topo I : il est délimité par les acides aminés 489 à 573 et avait été reconnu par 98% des sérums anti-topo I positifs des patients SSc étudiés par Kuwana⁸⁶. Nous avons voulu vérifier si cet épitope était reconnu majoritairement par les sérums anti-topo I de notre cohorte. En effet, la plupart de nos sérums anti-topo I positifs, soit 68%, reconnaissaient ce fragment.

Ce même auteur avait montré que des différences ethniques étaient à l'origine des divergences entre les réactivités des sérums pour la topo I⁸⁵. La composition de notre cohorte, comprenant uniquement des canadiens-français, peut donc expliquer cette différence avec l'étude précédente. Des facteurs génétiques, tels que certaines associations de

HLA à la présence d'anti-topo I ou des polymorphismes, ainsi que l'environnement semblent donc influencer la reconnaissance pour cet aAg.

Le second fragment de 25 kDa que nous avons produit est composé des acides aminés formant l'épitope précédent, auquel nous avons ajouté une extension aux deux extrémités, afin d'ajouter un élément conformationnel à l'épitope. En effet, cette séquence d'acides aminés, de 434 à 635, représente un sous-domaine structural de la topo I¹⁰³. La proportion de 72% des sérums anti-topo I positifs qui reconnaissaient ce fragment était assez semblable à celle observée par Hu *et al.*, qui était de 77.5% pour un fragment presque identique⁸⁷. Ce fragment est probablement de taille suffisamment grande pour contenir plusieurs des épitopes immunodominants de la topo I.

Incontestablement, nous n'avons pas fait une cartographie complète des épitopes de la topo I. Il est toutefois évident que nos sérums ciblaient un autre épitope que ceux contenus entre les acides aminés 434 à 635 de la topo I. La minorité, 32%, des sérums anti-topo I positifs ne reconnaissaient aucun des 2 fragments testés. D'autres épitopes en C-terminal avaient déjà été étudiés, par exemple l'épitope situé entre les acides aminés 658 et 765, identifié par Verheijen *et al.*⁷⁹, avait été reconnu par 71% des sérums étudiés par Kato *et al.*⁸⁹. Une proportion de 64% des sérums analysés par Cram *et al.*⁹⁰ reconnaissaient ce même épitope.

Une grande partie de la séquence de la topo I semble être antigénique. Un criblage de la topo I par des peptides chevauchants avait permis d'isoler une séquence, les acides aminés 349-368, reconnue par 71% des sérums anti-topo I positifs de cette cohorte⁸⁸. Ce site antigénique se trouve englobé dans le fragment 207-441 produit par Hu *et al.* et était ciblé par 95% des sérums anti-topo I positifs⁸⁷.

Certains auteurs de ces études portant sur les épitopes ont souvent suggéré l'utilisation de fragments recombinants pour le diagnostic

clinique par ELISA^{90,93}. Suite à l'analyse de nos résultats, nous ne favoriserions pas cette stratégie. La sensibilité pour les deux fragments testés n'est pas suffisante pour être utilisée cette technique de façon courante afin d'établir un diagnostic fiable. La variabilité de la reconnaissance pour la topo I entre les cohortes n'en ferait pas non plus un test universel et fiable.

Liaison du fragment de topo I aux fibroblastes

Afin d'identifier les domaines d'interaction de la topo I, nous avons testé la liaison des deux fragments recombinants aux fibroblastes. Un seul des fragments, celui de 25 kDa, a montré une liaison aux fibroblastes. Celle-ci a été détectée par des sérums anti-topo I positifs qui avaient préalablement été criblés par ELISA pour leur liaison aux deux fragments, H15 et 25H. Toutefois, une question restant en suspens était l'absence de la détection du fragment de 25 kDa lié par l'anticorps anti-histidine. La reconnaissance des résidus histidine avait pourtant été démontrée par immunobuvardage et ELISA avec le même anticorps. Le repliement de la protéine liée pourrait expliquer cette contradiction. L'alternative consiste à postuler que la queue d'histidines est impliquée directement dans la liaison et, par conséquent, non-disponible pour l'anticorps anti-histidine. En effet, l'hypothèse la plus plausible est le masquage de la queue d'histidines lors de la liaison aux cellules, alors qu'elle était accessible à l'anticorps suite à la résolution sur SDS-PAGE ou dans les puits d'ELISA. Il semble plutôt improbable que la liaison soit due uniquement aux résidus histidine : la liaison du fragment de 15 kDa aurait dû alors être détectée puisqu'il porte la même queue d'histidines. Or, ce n'était pas le cas. L'absence de liaison du fragment de 15 kDa pourrait être due aux conditions dénaturantes utilisées lors de son extraction. Les mêmes conditions avaient été utilisées pour le fragment de 25 kDa mais celui-ci, plus long et correspondant à un domaine structural

de la topo I, pourrait avoir plus facilement récupéré une conformation optimale.

La démonstration de la liaison du fragment de 25 kDa à la surface cellulaire serait encore plus convaincante si elle avait été détectée par des anticorps spécifiques à ce fragment, purifiés par affinité à partir de sérum humain. De plus, la liaison du fragment de 25 kDa resterait à être visualisée par immunofluorescence. Nous pourrions ainsi voir si son patron de distribution est le même que celui de la topo I complète.

La grande concentration de fragment nécessaire à la liaison, par comparaison avec la topo I entière, suggère que sa détection ou sa liaison ne soient pas optimales. D'une part, la proportion des anti-topo I utilisés pour sa détection qui sont spécifiques à ce fragment n'étant pas connue, il se peut que le seuil de liaison ait été surestimé. D'autre part, le fragment de 25 kDa n'était peut-être pas celui par lequel la liaison à la cible membranaire était la plus forte. De nouvelles constructions de fragments de topo I, couvrant les régions situées de part et d'autre du fragment de 25 kDa, permettraient une définition plus exacte du domaine d'interaction. De plus, dans la perspective d'une identification prochaine de la cible, des études d'interaction directe entre les deux protéines pourraient nous en apprendre plus sur cette relation.

Implications physiologiques

La SSc est une maladie dont les symptômes se manifestent de façon généralisée. De nombreux organes sont, à divers degrés, touchés au cours de la maladie. Nous avons observé que la liaison aux fibroblastes de la topo I n'était pas spécifique à l'origine des fibroblastes. Ceci nous donne un indice suggérant un mécanisme pathogénique qui pourrait être étendu aux différents systèmes et tissus. Ainsi, autant les

fibroses dermiques que pulmonaires seraient éventuellement expliquées par l'implication des anti-topo I.

Il n'est pas encore établi si la liaison de la topo I aux fibroblastes induit des effets physiologiques. Il a déjà été observé que la liaison d'une protéine nucléaire puisse avoir des effets directement sur les cellules cible. En effet, la liaison des unités de nucléosome contenant de l'ADN et les histones H3, H2A, H2B et H4 aux cellules lymphocytaires pourrait avoir un effet sur la prolifération de celles-ci ainsi que sur leur synthèse d'immunoglobulines¹³¹.

Il serait intéressant de vérifier si cette seule liaison de l'aAg induit des changements phénotypiques aux fibroblastes. De nombreux effets seraient à tester. Si la topo I agit en tant que ligand d'un récepteur, elle pourrait déclencher une voie de signalisation menant, par exemple, à une régulation génique spécifique. Dans le cas de la SSc, il serait particulièrement pertinent de doser les niveaux de collagène sécrété par les fibroblastes. D'autres changements au niveau morphologique seraient vraisemblables, tels qu'une augmentation de la capacité à contracter une matrice composée de collagène. Des changements dans le destin des fibroblastes, telles que leur prolifération ou leur différenciation en myofibroblaste, seraient aussi plausibles dans le contexte de la SSc. Cette liaison pourrait induire la production de cytokines pro-inflammatoires ou profibrotiques, telles que respectivement l'IL-6 et le CTGF, par les fibroblastes eux-mêmes. Si cette liaison est généralisée sur tous les types de fibroblastes de l'organisme, nous ne pouvons exclure la possibilité que la topo I joue un rôle beaucoup plus large. Par exemple, la topo I pourrait être le ligand d'une voie de signalisation propre aux fibroblastes et inexistante dans les autres types cellulaires.

Il est, par contre, aussi possible que l'effet de la topo I nécessite la présence des anti-topo I. Dans le cas des AFA, il a été observé que la seule présence des anticorps à la surface induisait des modifications aux fibroblastes^{113,114}. Les anticorps pouvaient avoir accès au cytoplasme par

internalisation via la calvéoline¹¹³. De plus, ils provoquaient une plus forte expression de *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) et ils augmentaient l'adhésion des lymphocytes aux fibroblastes¹¹⁴. Les AFA modulaient à la hausse la production de l'ARNm de l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-6¹¹⁴. Nous pouvons donc nous interroger sur l'effet de la liaison de l'anti-topo I à la topo I présente à la membrane cellulaire et qui pourrait provoquer l'endocytose du complexe. De plus, la production et la sécrétion de cytokines ou de molécules d'adhésion seraient à étudier dans ces conditions.

Provenance de la topo I

Une des grandes questions soulevée par cette étude est la provenance de la topo I *in vivo*. Deux possibilités existent : un processus actif de la part de la cellule ou la présence de la topo I dans le milieu où baignent ces cellules. Il avait déjà été proposé que la topo I soit acheminée à la surface par exocytose, à l'intérieur de vésicules⁹⁶. Sous certaines conditions, des mécanismes semblables d'exportation à la membrane ont déjà été observés pour des protéines nucléaires, comme la nucléoline¹²² et la *high mobility group box chromosomal protein 1* (HMGB1)¹³². Cette dernière peut alors agir comme chemokine¹³³. Dans notre modèle (Figure 20), nous proposons plutôt que la topo I provienne des cellules endothéliales apoptotiques, dont le contenu serait libéré dans l'environnement immédiat.

Établissement du modèle pathogénique

Notre modèle fait intervenir 3 grands types cellulaires reconnus pour leur dysfonctionnement dans la SSc : les cellules endothéliales, les cellules du système immunitaire ainsi que les fibroblastes.

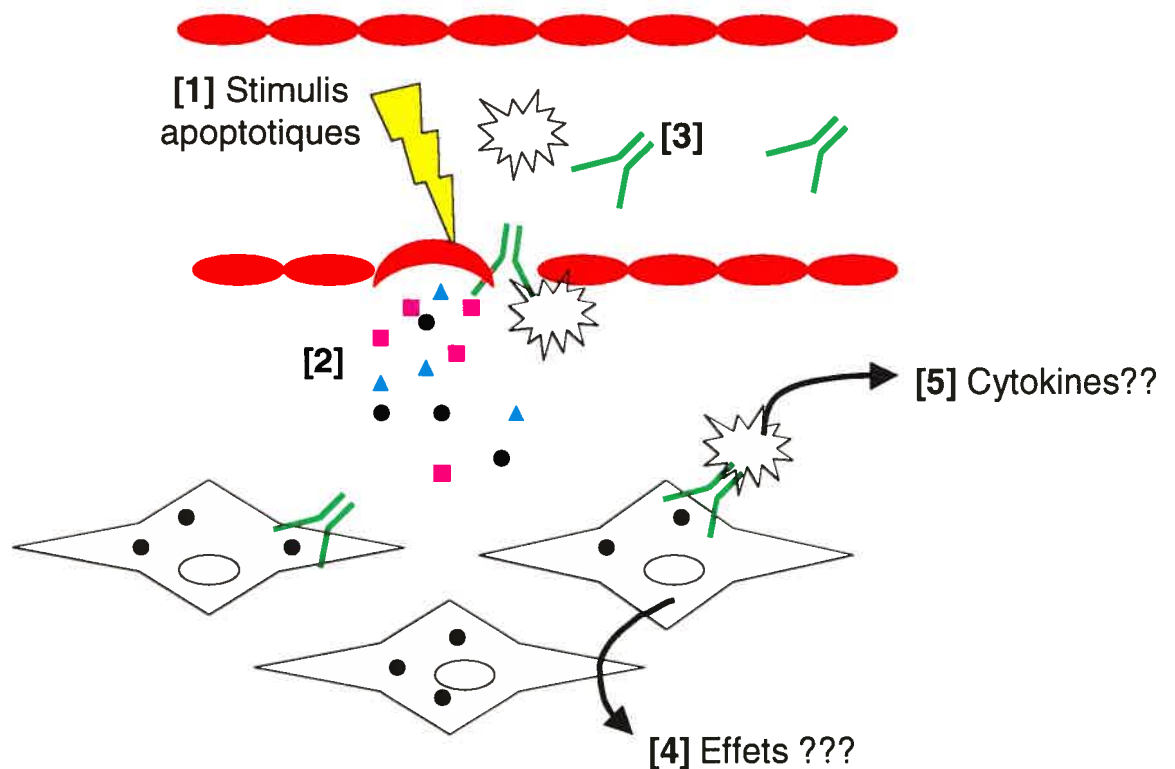


Figure 20. Modèle proposé de la pathogénicité des aAc anti-topo I

[1] Suite aux stimuli apoptotiques provoquant la mort des cellules endothéliales (en rouge), il y a relâchement du contenu cellulaire dans le milieu. [2] La topo I (●) ainsi libérée, se lie aux fibroblastes des tissus environnants où elle est reconnue par [3] les anti-topo I (en vert) provenant de la circulation sanguine. [4] Cette liaison induit des effets dans la production ou la sécrétion de cytokines ou dans le destin des fibroblastes. D'autre part, ces fibroblastes opsonisés servent de cible aux macrophages (⊛) qui ont traversé l'endothélium ou qui résident dans les tissus. [5] Ces cellules immunitaires s'activent et secrètent diverses composantes pro-inflammatoires et profibrotiques, pouvant influencer les fibroblastes, même s'ils n'ont pas lié des molécules de topo I.

Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont soumises à de nombreux stimuli pro- et anti-apoptotiques¹³⁴. Le lit des vaisseaux sanguins est constamment alimenté par de nombreux facteurs de croissance ou de mort, tels que respectivement le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ou le TNF- α , dont l'équilibre définit le sort des cellules endothéliales. Les vaisseaux subissent les forces hémodynamiques du flot sanguin qui assaillent les cellules. Ces dernières sont aussi sensibles aux différents radicaux libres ainsi qu'aux AECA pouvant induire leur apoptose. De plus, on observe des lésions des cellules endothéliales dans la SSc et ces cellules seraient peut-être même les premières cibles du processus pathogénique de la SSc. Ces cellules endothéliales apoptotiques seraient donc une source de topo I qui, par diffusion, pourrait rejoindre les fibroblastes des tissus sous-jacents.

Suite aux dommages endothéliaux, les vaisseaux se dilatent, permettant l'extravasation des leucocytes au travers des cellules endothéliales en direction des tissus. Cet endothélium endommagé laisse aussi passer les fluides normalement contenus à l'intérieur des vaisseaux sanguins, permettant ainsi l'accès des aAc aux tissus. Dans notre modèle, ce scénario mènerait à la libération d'abord de topo I, qui se lierait aux fibroblastes, ce qui serait suivi de la liaison des anti-topo I provenant de la circulation sanguine.

Cellules du système immunitaire

Le principal stimulus pour l'activation des macrophages est la phagocytose d'antigènes¹. Les anti-topo I, en liant la topo I, agissent comme opsonines, ce qui favorise énormément la phagocytose. Les macrophages présentent à leur surface des récepteurs Fc qui lient la région constante des IgG. Cette liaison établit une adhésion plus forte des macrophages aux cellules opsonisées. Le nombre de contacts et l'avidité

de l'anticorps pour la topo I sont des facteurs qui conditionnent l'agrégation des macrophages à la surface des fibroblastes. Il s'ensuit une série de réactions activant les macrophages dans le but d'ingérer l'antigène. De nombreux facteurs sont sécrétés par les macrophages, dont certaines cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF- α ayant des effets pro-inflammatoires. De plus, ces cytokines attirent et activent d'autres cellules lymphocytaires. Les tissus baignent alors dans un environnement inflammatoire composé de cytokines, d'enzymes hydrolytiques, d'espèces réactives (anion superoxyde, NO) et de nombreuses cellules lymphocytaires. Cette situation chronique, en absence de véritable pathogène à éliminer, contribue aux dommages ou à la mort des cellules saines, présentes dans ce tissu.

Les macrophages, tout comme les cellules *natural killer* (NK), les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles peuvent médier la mort des cellules via les anticorps par ADCC. Par leur liaison non-spécifique aux récepteurs Fc, ces cellules s'activent et produisent des enzymes lytiques, des granules contenant de la perforine ou des cytokines ayant des effets cytotoxiques. Il pourrait en résulter de graves dommages aux fibroblastes et même entraîner leur mort.

L'aide du système du complément favorise la réponse immunitaire en l'amplifiant¹. Dans la voie classique d'activation, les IgM et les IgG servent de cible pour la protéine C1 du complément. Cette liaison déclenche une cascade d'activation par les clivages enzymatiques des protéines du complément par des convertases. Un des effets principaux de l'activation du complément est la lyse cellulaire, suite à la formation du complexe d'attaque membranaire. Quoique peu effective sur les cellules nucléées, une stimulation prolongée pourrait éventuellement mener à la mort des fibroblastes. Par contre, les effets inflammatoires sont nombreux. La relâche d'anaphylotaxines (C4a et C5a) induit la libération d'histamine et de d'autres médiateurs de la part des mastocytes et des basophiles. Ces facteurs induisent la contraction des cellules musculaires

lisses et augmentent la perméabilité vasculaire, ce qui favorise l'afflux des cellules sanguines. D'autres protéines du complément, dont C5a, induisent les cellules monocytaires et les neutrophiles à adhérer aux cellules endothéliales et à s'extravaser vers l'intérieur des tissus, amenant ainsi un plus grand nombre de cellules au site concerné. Le complément agit aussi comme opsonine, améliorant encore plus l'efficacité de la phagocytose par les APC. Parmi les autres effets du complément, il est aussi noté l'agrégation de plaquettes, la relâche d'enzymes lytiques et l'inhibition de la migration des monocytes et des macrophages. Ainsi, dans notre modèle, suite à l'opsonisation des fibroblastes, les cellules immunitaires induisent la production de cytokines ou de facteurs qui affectent les fibroblastes environnants.

Fibroblastes

Le TGF- β permet normalement par la suite une cicatrisation des tissus endommagés par le dépôt de nouvelle ECM. Le support de d'autres cytokines comme le CTGF, l'IL-6 ou le PDGF favorise la prolifération des fibroblastes et la sécrétion de collagène. Toutefois, les niveaux élevés de ces cytokines, dus à la chronicité de la stimulation des lymphocytes, conduisent à la fibrose des tissus. De plus, le TGF- β ⁷⁰ ainsi que les médiateurs relâchés par les mastocytes⁶⁹ favorisent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Ceux-ci sont très impliqués dans la pathogenèse de la SSc grâce à leur sécrétion accrue d'ECM et leurs activités contractiles. Les myofibroblastes entrent normalement en apoptose suite à la cicatrisation des tissus. Toutefois, dans la SSc, il a été remarqué qu'il existait des dérèglements possibles de ce processus. En effet, soit les myofibroblastes sont plus résistants à l'apoptose, soit il y a prolifération, par expansion clonale, de certains fibroblastes produisant beaucoup de collagène¹³⁵. Il serait donc intéressant de déterminer le rôle des anti-topo I et/ou de la topo I dans ce processus.

Perspectives

Le modèle que nous proposons est semblable à celui de la pathogenèse du bloc auriculo-ventriculaire congénital dans le lupus néonatal¹³⁶. Cette maladie auto-immune fait intervenir des aAc anti-SSA/Ro et anti-SSB/La provenant de la mère et est caractérisée par une fibrose irréversible du tissu de conduction cardiaque fœtal. Les cardiocytes de fœtus atteints ont un taux d'apoptose exagéré¹³⁶. L'aAg Ro y est transloqué à la surface cellulaire¹³⁷. Les anti-Ro maternels traversant la barrière placentaire peuvent alors lier les cardiomyocytes fœtaux apoptotiques¹³⁸. Ce dépôt d'anticorps dans les tissus cardiaques provoque le recrutement de macrophages et de cellules géantes, venues y phagocyter les débris apoptotiques¹³⁶. Ces cellules immunitaires ont été localisées dans des zones comportant de nombreux myofibroblastes et où la fibrose est déjà installée¹³⁶. Elles y deviennent activées et secrètent dans le milieu plusieurs cytokines pro-inflammatoires et profibrotiques, dont le TGF- β ¹³⁹. Ces facteurs favorisent la prolifération et la transdifférenciation des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes, dont le phénotype de cicatrisation est largement caractérisé¹³⁹. Cette stimulation continue dégénère ainsi rapidement en fibrose.

Notre modèle, qui postule de nombreuses interactions cellulaires, pourrait être éventuellement testé *in vitro* dans le but de simuler les conditions *in vivo*. En provoquant la mort apoptotique de cellules endothéliales, nous pourrions récupérer les facteurs libérés lors de l'apoptose et vérifier leur contenu en topo I par cELISA sur des fibroblastes. En utilisant des cocultures de fibroblastes et de macrophages, nous pourrions déterminer si l'adhésion de ceux-ci est plus forte aux cellules opsonisées par les anti-topo I. Les niveaux des différentes cytokines produites dans ce cas-là seraient aussi mesurés.

La confirmation *in vivo* de ce mécanisme pourrait se faire dans le modèle animal de la SSc, le poulet UCD-200. Il a été démontré que ces oiseaux subissaient une apoptose précoce de leurs cellules endothéliales⁴³, générant ainsi une source de topo I. Suite à l'injection de doses physiologiques d'anti-topo I, nous pourrions déterminer s'il y a un recrutement de macrophages aux sites lésionnels ainsi qu'une modification de la matrice entourant les fibroblastes. Les niveaux de cytokines pourraient aussi être dosés dans les tissus.

Un nouveau mécanisme pathogénique en auto-immunité

Son initiation

Cette étude est la première à rapporter la liaison d'un aAg majeur de la SSc à la surface de fibroblastes. Cette découverte nous amène à proposer un mécanisme pathogénique par lequel ce sont les aAc qui jouent le rôle le plus important dans l'apparition d'une pathologie spécifique. La liaison de la topo I a été observée sur des fibroblastes originant de plusieurs sites anatomiques (derme et poumon). Par extension, ce phénomène serait donc aussi présent chez les sujets normaux. Par contre, seuls les patients SSc développent, pour une raison encore inconnue, des aAc anti-topo I. Malgré que les effets pathologiques de ceux-ci restent à être démontrés, leur présence ou leur absence serait critique pour la suite des événements. Il serait intéressant d'étudier si cette participation décisive des aAc, en se liant à leur aAg à la surface cellulaire, s'applique à d'autres maladies auto-immunes. Des données nous suggèrent que d'autres couples aAg/aAc puissent jouer ce même rôle (Robitaille G., communication personnelle, non-publié)

Son maintien

Suite à la phagocytose d'un antigène par les macrophages, il est dégradé en peptides afin d'être présenté par les APC, comme les macrophages. La reconnaissance de la topo I, dans un contexte CMH II, se ferait par les cellules T. De tels lymphocytes Th autoréactifs, spécifiques pour la topo I, font partie du répertoire naturel des cellules T⁸³. À l'aide d'un signal de costimulation du récepteur B7 de la part des macrophages activés, les cellules T pourraient proliférer. Par cette réponse *antigen-driven*, les lymphocytes T activés entreraient en phase d'expansion clonale et se différencieraient en cellules effectrices et mémoire. La persistance de la SSc pourrait donc être due à l'afflux continu d'aAg qui maintiendrait constamment le système immunitaire en état d'activation.

Avenues thérapeutiques

À ce jour, la SSc est une maladie incurable. Les traitements actuellement utilisés sont non-spécifiques, comme l'emploi de médicaments de la classe des immunosuppresseurs.

Afin de cibler plus spécifiquement le système immunitaire, les solutions thérapeutiques doivent être adaptées au mécanisme pathogénique en cause. Ainsi, la cascade du complément pouvant enclencher une inflammation nuisible pourrait être arrêtée par un anti-C5a, un médicament présentement en phase clinique chez les patients souffrant de SLE et d'AR¹⁴⁰.

Par nos travaux, nous croyons avoir mis en lumière un rôle pathogénique potentiel pour les anti-topo I. Les aAc étant produits par les cellules B, plusieurs thérapies intéressantes présentement en développement ciblent ces lymphocytes¹⁴¹. L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de surface CD20 permet la déplétion

des cellules B lors de ses étapes de maturation. Ce médicament, Rituximab[®], a donné de bons résultats pour certaines maladies auto-immunes, comme le SLE ou l'AR. Le blocage du récepteur envoyant des signaux de survie aux cellules B, le BLys/*B-cell-activating factor* (BAFF), entraîne aussi la déplétion lymphocytaire. Les molécules de stimulation CD40/CD40L, permettant la différenciation en cellules plasmiques, sont aussi ciblées. Les corécepteurs CD19, CD21 et CD22 modulent l'activation des cellules B par leur interaction avec le récepteur des cellules B (BCR). Le blocage de leur fonction permet une amélioration des malades. Toutefois, par ces déplétions de lymphocytes B, le système immunitaire est énormément affaibli, créant ainsi un grand risque d'infection par des virus, des bactéries et des pathogènes opportunistes.

Dans plusieurs études il a plutôt été tenté d'induire la tolérance immunitaire par l'injection d'aAg¹⁴². Par leur interaction avec les cellules T, sans costimulation, il provoque leur délétion ou leur anergie. De plus, il y aurait génération de cellules T régulatrices. Toutefois, l'utilisation de plus courts fragments antigéniques favoriserait la réponse immunitaire, ces peptides étant plus facilement présentés par les APC aux cellules immunitaires. En plus, ce fragment pourrait séquestrer les anti-topo I sériques, les empêchant ainsi d'aller engager les événements pathogéniques dans les tissus. La diminution de la longueur de l'épitope injecté a pour second avantage de défavoriser le développement de réponses secondaires indésirées. Le phénomène d'*epitope spreading* pourrait amplifier la maladie auto-immune en créant d'autres aAc ou d'autres cellules autoréactives.

Dans le SLE, les aAc anti-ADN ont des activités pathogéniques¹⁴³. Un composé, le LJP 394, agit comme inducteur de la tolérance des lymphocytes B¹⁴⁴. Cette molécule, un conjugué pharmacologique de quatre séquences nucléotidiques formant des épitopes de l'ADN, se lie aux lymphocytes B et, sans signal de costimulation, induit leur anergie. Il

a été observé que ce produit provoquait une diminution des anti-ADN et une amélioration des résultats cliniques¹⁴⁵.

Ainsi, la connaissance des épitopes de la topo I et de son rôle devra être approfondie, dans le but de développer un traitement ciblé et spécifique permettant l'arrêt de la progression et la régression de la maladie chez les patients atteints de la SSc. Une telle approche pourrait même être envisagée dans un but de prévention de la SSc chez les sujets porteurs d'anti-topo I et atteints d'un phénomène de Raynaud isolé, puisque ces sujets sont à très haut risque de développer une SSc¹⁴⁶.

RÉFÉRENCES

1. Janeway C. (1999) *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 4th edn. Garland Pub. New York.
2. Derbinski J., Schulte A., Kyewski B. & Klein L. (2001) Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* **2**:1032-9.
3. Anderson M.S., Venanzi E.S., Klein L., Chen Z., Berzins S.P., *et al.* (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**:1395-401.
4. Clements P.J. & Furst D.E. (2004) *Systemic sclerosis*. 2nd edn. Lipincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
5. Scussel-Lonzetti L., Joyal F., Raynauld J.P., Roussin A., Rich E., *et al.* (2002) Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore)*. **81**:154-67.
6. Sule S.D. & Wigley F.M. (2003) Treatment of scleroderma: an update. *Expert Opin. Investig. Drugs* **12**:471-82.
7. Geirsson A.J., Wollheim F.A. & Akesson A. (2001) Disease severity of 100 patients with systemic sclerosis over a period of 14 years: using a modified Medsger scale. *Ann. Rheum. Dis.* **60**:1117-22.
8. Tamaki T., Mori S. & Takehara K. (1991) Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo. *Arch. Dermatol. Res.* **283**:366-71.
9. Foeldvari I. (2002) Scleroderma in children. *Curr. Opin. Rheumatol.* **14**:699-703.

10. Allcock R.J., Forrest I., Corris P.A., Crook P.R. & Griffiths I.D. (2004) A study of the prevalence of systemic sclerosis in northeast England. *Rheumatology (Oxford)*. **43**:596-602.
11. Silman A., Jannini S., Symmons D. & Bacon P. (1988) An epidemiological study of scleroderma in the West Midlands. *Br. J. Rheumatol.* **27**:286-90.
12. Geirsson A.J., Steinsson K., Guthmundsson S. & Sigurthsson V. (1994) Systemic sclerosis in Iceland. A nationwide epidemiological study. *Ann. Rheum. Dis.* **53**:502-5.
13. Englert H., Small-McMahon J., Davis K., O'Connor H., Chambers P., *et al.* (1999) Systemic sclerosis prevalence and mortality in Sydney 1974-88. *Aust. NZJ. Med.* **29**:42-50.
14. Mayes M.D., Lacey J.V., Jr., Beebe-Dimmer J., Gillespie B.W., Cooper B., *et al.* (2003) Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* **48**:2246-55.
15. Roberts-Thomson P.J., Jones M., Hakendorf P., Kencana Dharmapatni A.A., Walker J.G., *et al.* (2001) Scleroderma in South Australia: epidemiological observations of possible pathogenic significance. *Intern. Med. J.* **31**:220-9.
16. Arnett F.C., Howard R.F., Tan F., Moulds J.M., Bias W.B., *et al.* (1996) Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum.* **39**:1362-70.
17. Reveille J.D., Fischbach M., McNearney T., Friedman A.W., Aguilar M.B., *et al.* (2001) Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants. *Semin. Arthritis Rheum.* **30**:332-46.
18. Ferri C., Valentini G., Cozzi F., Sebastiani M., Michelassi C., *et al.* (2002) Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)*. **81**:139-53.

19. Nishioka K., Katayama I., Kondo H., Shinkai H., Ueki H., *et al.* (1996) Epidemiological analysis of prognosis of 496 Japanese patients with progressive systemic sclerosis (SSc). Scleroderma Research Committee Japan. *J. Dermatol.* **23**:677-82.
20. Arnett F.C., Cho M., Chatterjee S., Aguilar M.B., Reveille J.D., *et al.* (2001) Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum.* **44**:1359-62.
21. Tan F.K., Stivers D.N., Foster M.W., Chakraborty R., Howard R.F., *et al.* (1998) Association of microsatellite markers near the fibrillin 1 gene on human chromosome 15q with scleroderma in a Native American population. *Arthritis Rheum.* **41**:1729-37.
22. Feghali-Bostwick C., Medsger T.A., Jr. & Wright T.M. (2003) Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* **48**:1956-63.
23. Fanning G.C., Welsh K.I., Bunn C., Du Bois R. & Black C.M. (1998) HLA associations in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients. *Br. J. Rheumatol.* **37**:201-7.
24. Sato H., Lagan A.L., Alexopoulou C., Vassilakis D.A., Ahmad T., *et al.* (2004) The TNF-863A allele strongly associates with anticentromere antibody positivity in scleroderma. *Arthritis Rheum.* **50**:558-64.
25. Crilly A., Hamilton J., Clark C.J., Jardine A. & Madhok R. (2002) Analysis of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **61**:678-81.
26. Fatini C., Gensini F., Sticchi E., Battaglini B., Angotti C., *et al.* (2002) High prevalence of polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) in patients with systemic sclerosis. *Am. J. Med.* **112**:540-4.

27. Kawaguchi Y., Tochimoto A., Ichikawa N., Harigai M., Hara M., *et al.* (2003) Association of IL1A gene polymorphisms with susceptibility to and severity of systemic sclerosis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.* **48**:186-92.
28. Zhou X., Tan F.K., Reveille J.D., Wallis D., Milewicz D.M., *et al.* (2002) Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. *Arthritis Rheum.* **46**:2990-9.
29. Lambert N.C., Erickson T.D., Yan Z., Pang J.M., Guthrie K.A., *et al.* (2004) Quantification of maternal microchimerism by HLA-specific real-time polymerase chain reaction: studies of healthy women and women with scleroderma. *Arthritis Rheum.* **50**:906-14.
30. Adams K.M. & Nelson J.L. (2004) Microchimerism: an investigative frontier in autoimmunity and transplantation. *JAMA* **291**:1127-31.
31. Selva-O'Callaghan A., Mijares-Boeckh-Behrens T., Prades E.B., Solans-Laue R., Simeon-Aznar C.P., *et al.* (2003) Lack of evidence of foetal microchimerism in female Spanish patients with systemic sclerosis. *Lupus* **12**:15-20.
32. Khosrotehrani K., Johnson K.L., Lau J., Dupuy A., Cha D.H., *et al.* (2003) The influence of fetal loss on the presence of fetal cell microchimerism: a systematic review. *Arthritis Rheum.* **48**:3237-41.
33. Garabrant D.H., Lacey J.V., Jr., Laing T.J., Gillespie B.W., Mayes M.D., *et al.* (2003) Scleroderma and solvent exposure among women. *Am. J. Epidemiol.* **157**:493-500.
34. Povey A., Guppy M.J., Wood M., Knight C., Black C.M., *et al.* (2001) Cytochrome P2 polymorphisms and susceptibility to scleroderma following exposure to organic solvents. *Arthritis Rheum.* **44**:662-5.
35. Tew M.B., Reveille J.D., Arnett F.C., Friedman A.W., McNearney T., *et al.* (2001) Glutathione S-transferase genotypes in systemic sclerosis and their association with clinical manifestations in early disease. *Genes Immun.* **2**:236-8.

36. Hamamdžić D., Kasman L.M. & LeRoy E.C. (2002) The role of infectious agents in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **14**:694-8.
37. Magro C.M., Nuovo G., Ferri C., Crowson A.N., Giuggioli D., *et al.* (2004) Parvoviral infection of endothelial cells and stromal fibroblasts: a possible pathogenetic role in scleroderma. *J. Cutan. Pathol.* **31**:43-50.
38. Maul G.G., Jimenez S.A., Riggs E. & Ziemnicka-Kotula D. (1989) 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. USA* **86**:8492-6.
39. Jun J.B., Kuechle M., Harlan J.M. & Elkon K.B. (2003) Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15**:756-60.
40. Jimenez S.A. & Derk C.T. (2004) Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann. Intern. Med.* **140**:37-50.
41. Kawaguchi Y., Suzuki K., Hara M., Hidaka T., Ishizuka T., *et al.* (1994) Increased endothelin-1 production in fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **53**:506-10.
42. Mayes M.D. (2003) Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* **48**:1190-9.
43. Nguyen V.A., Sgonc R., Dietrich H. & Wick G. (2000) 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.* **14**:143-9.
44. Kahaleh B., Meyer O. & Scorza R. (2003) Assessment of vascular involvement. *Clin. Exp. Rheumatol.* **21**:S9-14.
45. Cerinic M.M., Valentini G., Sorano G.G., D'Angelo S., Cuomo G., *et al.* (2003) Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Semin. Arthritis Rheum.* **32**:285-95.

46. Stummvoll G.H., Aringer M., Grisar J., Steiner C.W., Smolen J.S., *et al.* (2004) Increased transendothelial migration of scleroderma lymphocytes. *Ann. Rheum. Dis.* **63**:569-74.
47. Giacomelli R., Matucci-Cerinic M., Cipriani P., Ghersetich I., Lattanzio R., *et al.* (1998) Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* **41**:327-34.
48. Sakkas L.I., Xu B., Artlett C.M., Lu S., Jimenez S.A., *et al.* (2002) Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J. Immunol.* **168**:3649-59.
49. Distler O., Pap T., Kowal-Bielecka O., Meyringer R., Guiducci S., *et al.* (2001) Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis. *Arthritis Rheum.* **44**:2665-78.
50. Sato S., Fujimoto M., Hasegawa M. & Takehara K. (2004) Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* **50**:1918-27.
51. Luzina I.G., Atamas S.P., Wise R., Wigley F.M., Choi J., *et al.* (2003) Occurrence of an activated, profibrotic pattern of gene expression in lung CD8+ T cells from scleroderma patients. *Arthritis Rheum.* **48**:2262-74.
52. Sato S., Hasegawa M. & Takehara K. (2001) Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J. Dermatol. Sci.* **27**:140-6.
53. Ghosh A.K. (2002) Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **227**:301-14.
54. Ihn H. & Tamaki K. (2000) Increased phosphorylation of transcription factor Sp1 in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of the type I collagen gene. *Arthritis Rheum.* **43**:2240-7.

55. Hasegawa M., Fujimoto M., Kikuchi K. & Takehara K. (1997) Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **24**:328-32.
56. Tamby M.C., Chanseaud Y., Guillevin L. & Mouthon L. (2003) New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **2**:152-7.
57. Ihn H., Yamane K., Kubo M. & Tamaki K. (2001) Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum.* **44**:474-80.
58. Pannu J., Gore-Hyer E., Yamanaka M., Smith E.A., Rubinchik S., *et al.* (2004) An increased transforming growth factor beta receptor type I:type II ratio contributes to elevated collagen protein synthesis that is resistant to inhibition via a kinase-deficient transforming growth factor beta receptor type II in scleroderma. *Arthritis Rheum.* **50**:1566-77.
59. Yamane K., Ihn H., Kubo M. & Tamaki K. (2002) Increased transcriptional activities of transforming growth factor beta receptors in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **46**:2421-8.
60. Dong C., Zhu S., Wang T., Yoon W., Li Z., *et al.* (2002) Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:3908-13.
61. Asano Y., Ihn H., Yamane K., Jinnin M., Mimura Y., *et al.* (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in alpha2(I) collagen gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *J. Immunol.* **172**:7123-35.
62. Yamane K., Ihn H. & Tamaki K. (2003) Epidermal growth factor up-regulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in human dermal fibroblasts by phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway: Resistance to epidermal growth factor stimulation in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **48**:1652-66.

63. Gore-Hyer E., Pannu J., Smith E.A., Grotendorst G. & Trojanowska M. (2003) Selective stimulation of collagen synthesis in the presence of costimulatory insulin signaling by connective tissue growth factor in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **48**:798-806.
64. Ghosh A.K., Bhattacharyya S., Lakos G., Chen S.J., Mori Y., *et al.* (2004) Disruption of transforming growth factor beta signaling and profibrotic responses in normal skin fibroblasts by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum.* **50**:1305-18.
65. Asano Y., Ihn H., Yamane K., Kubo M. & Tamaki K. (2004) Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **113**:253-64.
66. Ihn H. (2002) Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr. Opin. Rheumatol.* **14**:681-5.
67. Kissin E. & Korn J.H. (2002) Apoptosis and myofibroblasts in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **4**:129-35.
68. Bogatkevich G.S., Tourkina E., Silver R.M. & Ludwicka-Bradley A. (2001) Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **276**:45184-92.
69. Gailit J., Marchese M.J., Kew R.R. & Gruber B.L. (2001) The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators. *J. Invest. Dermatol.* **117**:1113-9.
70. Jelaska A. & Korn J.H. (2000) Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **43**:2230-9.
71. Kawaguchi Y., Hara M. & Wright T.M. (1999) Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J. Clin. Invest.* **103**:1253-60.

72. Sakkas L.I. & Platsoucas C.D. (2004) Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum.* **50**:1721-33.
73. Ho K.T. & Reveille J.D. (2003) The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res. Ther.* **5**:80-93.
74. Shero J.H., Bordwell B., Rothfield N.F. & Earnshaw W.C. (1986) High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* **231**:737-40.
75. Hildebrandt S., Weiner E.S., Senecal J.L., Noell G.S., Earnshaw W.C., *et al.* (1990) Autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70): analysis by gel diffusion, immunoblot, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **57**:399-410.
76. Dick T., Mierau R., Bartz-Bazzanella P., Alavi M., Stoyanova-Scholz M., *et al.* (2002) Coexistence of antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **61**:121-7.
77. Hu P.Q., Fertig N., Medsger T.A., Jr. & Wright T.M. (2003) Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **48**:1363-73.
78. Kuwana M., Kaburaki J., Mimori T., Kawakami Y. & Tojo T. (2000) Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **43**:1074-84.
79. Verheijen R., Van den Hoogen F., Beijer R., Richter A., Penner E., *et al.* (1990) A recombinant topoisomerase I used for autoantibody detection in sera from patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* **80**:38-43.
80. Vazquez-Abad D., Monteon V., Senecal J.L., Walsh S. & Rothfield N. (1997) Analysis of IgG subclasses of human antitopoisomerase I autoantibodies suggests chronic B cell stimulation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **84**:65-72.

81. Kuwana M., Medsger T.A., Jr. & Wright T.M. (1995) T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J. Immunol.* **155**:2703-14.
82. Kuwana M., Medsger T.A., Jr. & Wright T.M. (2000) Analysis of soluble and cell surface factors regulating anti-DNA topoisomerase I autoantibody production demonstrates synergy between Th1 and Th2 autoreactive T cells. *J. Immunol.* **164**:6138-46.
83. Kuwana M., Medsger T.A., Jr. & Wright T.M. (1997) Highly restricted TCR-alpha beta usage by autoreactive human T cell clones specific for DNA topoisomerase I: recognition of an immunodominant epitope. *J. Immunol.* **158**:485-91.
84. Veeraraghavan S., Renzoni E.A., Jeal H., Jones M., Hammer J., *et al.* (2004) Mapping of the immunodominant T cell epitopes of the protein topoisomerase I. *Ann. Rheum. Dis.* **63**:982-7.
85. Kuwana M., Kaburaki J., Arnett F.C., Howard R.F., Medsger T.A., Jr., *et al.* (1999) Influence of ethnic background on clinical and serologic features in patients with systemic sclerosis and anti-DNA topoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum.* **42**:465-74.
86. Kuwana M., Kaburaki J., Medsger T.A., Jr. & Wright T.M. (1999) An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum.* **42**:1179-88.
87. Hu P.Q., Fertig N., Medsger T.A., Jr. & Wright T.M. (2004) Molecular Recognition Patterns of Serum Anti-DNA Topoisomerase I Antibody in Systemic Sclerosis. *J. Immunol.* **173**:2834-41.
88. Rizou C., Ioannidis J.P., Panou-Pomonis E., Sakarellos-Daitsiotis M., Sakarellos C., *et al.* (2000) B-Cell epitope mapping of DNA topoisomerase I defines epitopes strongly associated with pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**:344-51.

89. Kato T., Yamamoto K., Takeuchi H., Okubo M., Hara E., *et al.* (1993) Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum.* **36**:1580-7.
90. Cram D.S., Fiscaro N., McNeilage L.J., Coppel R.L. & Harrison L.C. (1993) Antibody specificities of Thai and Australian scleroderma sera with topoisomerase I recombinant fusion proteins. *J. Immunol.* **151**:6872-81.
91. Kuwana M., Kaburaki J., Mimori T., Tojo T. & Homma M. (1993) Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I. Clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **36**:1406-13.
92. Meesters T.M., Hoet M., van den Hoogen F.H., Verheijen R., Habets W.J., *et al.* (1992) Analysis of an immunodominant epitope of topoisomerase I in patients with systemic sclerosis. *Mol. Biol. Rep.* **16**:117-23.
93. Piccinini G., Cardellini E., Reimer G., Arnett F.C. & Durban E. (1991) An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol. Immunol.* **28**:333-9.
94. D'Arpa P., White-Cooper H., Cleveland D.W., Rothfield N.F. & Earnshaw W.C. (1990) Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Sci-70) recognized by sera of scleroderma patients. *Arthritis Rheum.* **33**:1501-11.
95. Mahler M., Mierau R., Genth E. & Bluthner M. (2002) Development of a CENP-A/CENP-B-specific immune response in a patient with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **46**:1866-72.
96. Hsu T.C., Lee T.L. & Tsay G.J. (1997) Autoantigen components recognizable by scleroderma sera are exported via ectocytosis of fibroblasts. *Br. J. Rheumatol.* **36**:1038-44.
97. Navratil J.S., Sabatine J.M. & Ahearn J.M. (2004) Apoptosis and immune responses to self. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **30**:193-212.

98. Casciola-Rosen L., Wigley F. & Rosen A. (1997) Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J. Exp. Med.* **185**:71-9.
99. Champoux J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:369-413.
100. Madden K.R., Stewart L. & Champoux J.J. (1995) Preferential binding of human topoisomerase I to superhelical DNA. *EMBO J.* **14**:5399-409.
101. Stewart L., Redinbo M.R., Qiu X., Hol W.G. & Champoux J.J. (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science* **279**:1534-41.
102. Stewart L., Ireton G.C. & Champoux J.J. (1996) The domain organization of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **271**:7602-8.
103. Redinbo M.R., Stewart L., Kuhn P., Champoux J.J. & Hol W.G. (1998) Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* **279**:1504-13.
104. Samejima K., Svingen P.A., Basi G.S., Kottke T., Mesner P.W., Jr. *et al.* (1999) Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**:4335-40.
105. Casciola-Rosen L., Andrade F., Ulanet D., Wong W.B. & Rosen A. (1999) Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J. Exp. Med.* **190**:815-26.
106. Stewart L., Ireton G.C., Parker L.H., Madden K.R. & Champoux J.J. (1996) Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **271**:7593-601.
107. Douvas A.S., Achten M. & Tan E.M. (1979) Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J. Biol. Chem.* **254**:10514-22.
108. Scofield R.H. (2004) Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet* **363**:1544-6.

109. Harris M.L. & Rosen A. (2003) Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15**:778-84.
110. Bordron A., Dueymes M., Levy Y., Jamin C., Leroy J.P., *et al.* (1998) The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J. Clin. Invest.* **101**:2029-35.
111. Sgonc R., Gruschwitz M.S., Boeck G., Sepp N., Gruber J., *et al.* (2000) Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum.* **43**:2550-62.
112. Goldblatt F., Gordon T.P. & Waterman S.A. (2002) Antibody-mediated gastrointestinal dysmotility in scleroderma. *Gastroenterology* **123**:1144-50.
113. Ronda N., Gatti R., Giacosa R., Raschi E., Testoni C., *et al.* (2002) Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum.* **46**:1595-601.
114. Chizzolini C., Raschi E., Rezzonico R., Testoni C., Mallone R., *et al.* (2002) Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **46**:1602-13.
115. Hill M.B., Phipps J.L., Cartwright R.J., Milford Ward A., Greaves M., *et al.* (1996) Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Clin. Exp. Immunol.* **106**:491-7.
116. Brentnall T.J., Kenneally D., Barnett A.J., de Aizpurua H.J., Lolait S.J., *et al.* (1982) Autoantibodies to fibroblasts in scleroderma. *J. Clin. Lab. Immunol.* **8**:9-12.
117. Henault J., Tremblay M., Clement I., Raymond Y. & Senecal J.L. (2004) Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **50**:3265-74.
118. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.

119. Wong C., Sridhara S., Bardwell J.C. & Jakob U. (2000) Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *BioTechniques* **28**:426-8, 430, 432.
120. D'Arpa P., Machlin P.S., Ratrie H., 3rd, Rothfield N.F., Cleveland D.W., *et al.* (1988) cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2543-7.
121. Christian S., Pilch J., Akerman M.E., Porkka K., Laakkonen P., *et al.* (2003) Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J. Cell Biol.* **163**:871-8.
122. Hovanessian A.G., Puvion-Dutilleul F., Nisole S., Svab J., Perret E., *et al.* (2000) The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **261**:312-28.
123. Dumler I., Stepanova V., Jerke U., Mayboroda O.A., Vogel F., *et al.* (1999) Urokinase-induced mitogenesis is mediated by casein kinase 2 and nucleolin. *Curr. Biol.* **9**:1468-76.
124. Legrand D., Vigie K., Said E.A., Ellass E., Masson M., *et al.* (2004) Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur. J. Biochem.* **271**:303-17.
125. Hirata D., Iwamoto M., Yoshio T., Okazaki H., Masuyama J., *et al.* (2000) Nucleolin as the earliest target molecule of autoantibodies produced in MRL/lpr lupus-prone mice. *Clin. Immunol.* **97**:50-8.
126. Rekvig O.P., Muller S., Briand J.P., Skogen B. & Van Regenmortel M.H. (1987) Human antinuclear autoantibodies crossreacting with the plasma membrane and the N-terminal region of histone H2B. *Immunol. Invest.* **16**:535-47.
127. Watson K., Gooderham N.J., Davies D.S. & Edwards R.J. (1999) Nucleosomes bind to cell surface proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **274**:21707-13.
128. Mecheri S., Dannecker G., Dennig D., Poncet P. & Hoffmann M.K. (1993) Anti-histone autoantibodies react specifically with the B cell surface. *Mol. Immunol.* **30**:549-57.

129. Monestier M., Decker P., Briand J.P., Gabriel J.L. & Muller S. (2000) Molecular and structural properties of three autoimmune IgG monoclonal antibodies to histone H2B. *J. Biol. Chem.* **275**:13558-63.
130. Morozkin E.S., Laktionov P.P., Rykova E.Y. & Vlassov V.V. (2004) Extracellular nucleic acids in cultures of long-term cultivated eukaryotic cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1022**:244-9.
131. Bell D.A., Morrison B. & VandenBygaart P. (1990) Immunogenic DNA-related factors. Nucleosomes spontaneously released from normal murine lymphoid cells stimulate proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **85**:1487-96.
132. Gardella S., Andrei C., Ferrera D., Lotti L.V., Torrisi M.R., *et al.* (2002) The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* **3**:995-1001.
133. Degryse B. & de Virgilio M. (2003) The nuclear protein HMGB1, a new kind of chemokine? *FEBS Lett.* **553**:11-7.
134. Duval H., Harris M., Li J., Johnson N. & Print C. (2003) New insights into the function and regulation of endothelial cell apoptosis. *Angiogenesis* **6**:171-83.
135. Kissin E.Y. & Korn J.H. (2003) Fibrosis in scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **29**:351-69.
136. Clancy R.M., Kapur R.P., Molad Y., Askanase A.D. & Buyon J.P. (2004) Immunohistologic evidence supports apoptosis, IgG deposition, and novel macrophage/fibroblast crosstalk in the pathologic cascade leading to congenital heart block. *Arthritis Rheum.* **50**:173-82.
137. Tran H.B., Ohlsson M., Beroukas D., Hiscock J., Bradley J., *et al.* (2002) Subcellular redistribution of Ia/SSB autoantigen during physiologic apoptosis in the fetal mouse heart and conduction system: a clue to the pathogenesis of congenital heart block. *Arthritis Rheum.* **46**:202-8.

138. Tran H.B., Macardle P.J., Hiscock J., Cavill D., Bradley J., *et al.* (2002) Anti-La/SSB antibodies transported across the placenta bind apoptotic cells in fetal organs targeted in neonatal lupus. *Arthritis Rheum.* **46**:1572-9.
139. Clancy R.M., Askanase A.D., Kapur R.P., Chiopelas E., Azar N., *et al.* (2002) Transdifferentiation of cardiac fibroblasts, a fetal factor in anti-SSA/Ro-SSB/La antibody-mediated congenital heart block. *J. Immunol.* **169**:2156-63.
140. Martin F. & Chan A.C. (2004) Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* **20**:517-27.
141. Tuscano J.M., Harris G.S. & Tedder T.F. (2003) B lymphocytes contribute to autoimmune disease pathogenesis: current trends and clinical implications. *Autoimmun. Rev.* **2**:101-8.
142. Harrison L.C. & Hafler D.A. (2000) Antigen-specific therapy for autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:704-11.
143. Blatt N.B. & Glick G.D. (1999) Anti-DNA autoantibodies and systemic lupus erythematosus. *Pharmacol. Ther.* **83**:125-39.
144. Wallace D.J. & Tumlin J.A. (2004) LJP 394 (abetimus sodium, Riquent) in the management of systemic lupus erythematosus. *Lupus* **13**:323-7.
145. Alarcon-Segovia D., Tumlin J.A., Furie R.A., McKay J.D., Cardiel M.H., *et al.* (2003) LJP 394 for the prevention of renal flare in patients with systemic lupus erythematosus: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum.* **48**:442-54.
146. Tramposch H.D., Smith C.D., Senecal J.L. & Rothfield N. (1984) A long-term longitudinal study of anticentromere antibodies. *Arthritis Rheum.* **27**:121-4.

ANNEXE

Annexe I - Article

This is an article published in *Arthritis & Rheumatism* © 2004 (copyright owner as specified in the Journal)

Référence :

Henault J., Tremblay M., Clement I., Raymond Y. & Senecal J.L. (2004)
Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **50**:3265-74.

**DIRECT BINDING OF ANTI-DNA TOPO ISOMERASE I
AUTOANTIBODIES TO THE CELL SURFACE OF FIBROBLASTS IN
PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS**

**Jill Hénault, Mélanie Tremblay, Isabelle Clément, Yves Raymond and
Jean-Luc Senécal**

Jill Hénault, MSc, PhD candidate, Mélanie Tremblay, BSc, MSc candidate,
Isabelle Clément, MSc, Yves Raymond, PhD, Professor of Medicine, Jean-Luc
Senécal, MD, FRCPC, FACP, Professor of Medicine
Autoimmunity Research Laboratory, Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de
l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.


Supported by grant MOP-43852 (JLS, YR) from the Canadian Institutes of
Health Research, and by studentships (JH, MT) from Sclérodémie-Québec.

Ms Hénault, Tremblay and Clément contributed equally to this work. Yves
Raymond and Jean-Luc Senécal are both senior authors of this work.

Running head : Anti-fibroblast autoantibodies in SSc.

Address correspondence and reprint requests to :

Jean-Luc Senécal, MD
Autoimmunity Research Laboratory
Notre-Dame Hospital CHUM
1560 Sherbrooke East
Montreal QC H2L 4M1
Canada
Phone : 514-890-8000 ext. 27131
Fax : 514-412-7672



ABSTRACT

Objective. Fibroblasts play a crucial role in the development of systemic sclerosis (SSc), and antifibroblast antibodies (AFAs) capable of inducing a proinflammatory phenotype in fibroblasts have been detected in the sera of SSc patients. In this study, we examined the prevalence of AFAs in SSc and other diseases and the possible correlation between AFAs and known antinuclear antibody specificities in SSc patients.

Methods. Sera from 99 patients with SSc, 123 patients with other autoimmune and non autoimmune diseases, and 30 age- and sex-matched healthy controls were examined. AFA prevalence was assessed by flow cytometry and further characterized by indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. Anti-topo Isomerase I (anti-topo I) from SSc sera were purified by affinity chromatography on topo I.

Results. AFAs were more common in SSc patients (26.3%) than in any other disease groups studied. The presence of AFA was significantly associated with pulmonary involvement and death. AFA-positive sera from SSc patients bound to all human and rodent fibroblasts tested but not to human primary endothelial cells or smooth muscle cells. All SSc AFAs strongly reacted with topo I by ELISA and immunoblotting. The binding intensity of SSc AFAs correlated strongly with reactivity against topo I on immunoblots of fibroblast extracts, and with the immunofluorescent pattern typical of anti-topo I on permeabilized cells. Total IgG and affinity-purified anti-topo I from AFA-positive SSc sera were found to react with the surface of unpermeabilized fibroblasts by flow cytometry, as well as by immunofluorescence and confocal microscopy.

Conclusion. This is the first report establishing that AFAs in SSc are strongly correlated with anti-topo I and, furthermore, that anti-topo I themselves display AFA activity by reacting with determinants at the fibroblast surface.

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by excessive extracellular matrix deposition, fibrosis and vascular obliteration in connective tissues of the skin, lungs, gastrointestinal tract, heart, and kidneys (1). Following a still undefined initial event, mononuclear cells such as lymphocytes and monocytes are recruited into the connective tissues. The subsequent release of inflammatory cytokines leads to fibroblast activation, collagen accumulation and tissue hypoxia (2). Disease manifestations are variable, ranging from limited cutaneous SSc with slow visceral progression to diffuse cutaneous SSc with rapid visceral involvement (3).

One of the hallmarks of SSc is the presence in serum of autoantibodies against a variety of nuclear proteins, that is, antinuclear autoantibodies (ANAs). The best known ANAs associated with SSc include anti-DNA topoisomerase I (anti-topo I), anticentromere, and anti-RNA polymerase III antibodies. These ANAs have been associated with different clinical manifestations and various degrees of severity of SSc. For example, anti-topo I and anti-RNA polymerase III antibodies are usually associated with diffuse SSc (4,5), whereas anticentromere antibodies are detected predominantly in patients with limited disease (3, 4-6). Anti-topo I antibodies are strongly associated with pulmonary fibrosis in SSc (3,7). However, the pathophysiologic explanation for the strong association between particular ANAs and specific SSc subsets has yet to be unraveled.

Besides these well-characterized ANAs, many other autoantibodies have been described in SSc, in particular those capable of recognizing cell surfaces. Antifibroblast antibodies (AFAs), anti-endothelial cell antibodies and antilymphocyte antibodies have all been reported in SSc (8-14). Recently, AFAs have been found to be closely associated with SSc (10) and evidence has been presented on their putative effects in promoting fibroblast activation into a proinflammatory state (9, 10).

In the present study, we examined the prevalence of AFAs in SSc and other diseases, and the possible correlation between AFAs and known ANA

specificities in SSc patients. Our results confirm the presence of AFAs in a subset of SSc patients. We found that AFA-positive sera did not bind primary endothelial cells or smooth muscle cells. Furthermore, there was a striking correlation between the fibroblast-binding activity of these AFAs and the presence of anti-topo I in SSc sera. In addition, this study is the first to demonstrate the direct binding of affinity-purified anti-topo I autoantibodies from SSc patients to the fibroblast surface.

PATIENTS AND METHODS

Patient population. Ninety nine SSc patients (83 women and 16 men; mean \pm SD age: 49.5 ± 12.7) were randomly selected from a French Canadian cohort of 309 patients with SSc diagnosed between April 1984 and September 1999 at the Connective Tissue Diseases and Vascular Medicine Clinics of Notre-Dame Hospital in Montreal (3). All patients were classified as having SSc according to the American College of Rheumatology criteria (15). Patients were also categorized into 1 of 4 SSc subsets using previously described definitions (3, 16) and based on the extent of sclerodermatous skin involvement: diffuse (must include trunk involvement, $n=14$); intermediate (must include upper extremities proximal to metacarpophalangeal joints without trunk involvement, $n=33$); limited (skin involvement restricted to sclerodactyly, plus Raynaud phenomenon, $n=44$); and normal skin ($n=8$). Frequencies of target organ involvement at diagnosis and mortality data were also determined as described in detail in our prospective cohort study of SSc (3).

Sera were obtained at the time of SSc diagnosis (i.e. prior to treatment), coded, and stored at -80°C . Control sera were collected as previously described (17) from 123 control patients and 30 healthy individuals. Sixty of the control patients had other autoimmune diseases (30 had systemic lupus erythematosus [SLE] and 30 had rheumatoid arthritis), and 63 of them had nonautoimmune conditions (23 had ankylosing spondylitis, 20 had psoriatic arthritis, and 20 had

osteoarthritis) The patient and healthy control groups were age- and sex-matched with the SSc patient group.

Cell cultures. Human foreskin hTERT-BJ1 fibroblasts (Clontech, Palo Alto, CA) were cultured in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) with 20% medium 199 (Sigma, Saint-Louis, MO), 10% fetal bovine serum (FBS)-TET and 100 µg/ml of gentamycin (Wisent, Saint-Bruno, Quebec, Canada). Mouse NIH 3T3 and rat RAT-2 embryonic fibroblasts (American Type Culture Collection [ATCC], Manassas,VA) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 100 µg/ml of gentamicin. Human embryonic lung WI-38 fibroblasts (ATCC) were grown in fibroblast basal medium (FBM) with 10% FBS and gentamycin. Normal human lung fibroblasts (NHLFs), normal human dermal fibroblasts from adult and neonate were cultured in FBM with 2% FBS, 5 µg/ml of bovine insulin, 1 ng/ml of human fibroblast growth factor-B (hFGF-B), gentamicin sulfate, amphotericin-B. Primary fibroblast cells were used between passages 4 and 6.

Human umbilical vein endothelial cells, human microvascular endothelial cells from the dermis and lung were grown in endothelial basal medium with EGM-2MV (5% FBS, 0.1% insulin-like growth factor-1, 0.1% ascorbic acid, 0.4% hFGF-B, 0.1% human epidermal growth factor [hEGF], 0.04% hydrocortisone, 0.1% human vascular endothelial growth factor and 0.1% gentamicin). Human pulmonary artery smooth muscle cells were grown in smooth muscle basal medium to which was added the SmGM-2 bullet kit (5% FBS, 0.1% hEGF, 0.1% insulin, 0.2% hFGF-B and 0.1% gentamicin). All endothelial cells, smooth muscle cells and their respective media were obtained from Cambrex (Walkersville, MD). Cells were grown at 37°C in air with 5% CO₂. Subculturing was achieved before confluency using trypsin and trypsin neutralizing solution (Cambrex).

Antibody purification. Human total IgG was purified from sera by affinity chromatography using a NAb Protein G Spin Chromatography Kit

(Pierce, Rockford, IL) and following the manufacturer's instructions. The final IgG concentration was determined by Bradford dye-binding procedure (Bio-Rad, Hercules, CA) and varied from 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ to 11.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Human anti-topo I IgG was purified from sera by affinity chromatography on immobilized topo I using a Vivapure Epoxy Protein Coupling Kit (VivaScience, Hannover, Germany) and following the manufacturer's instructions. The final anti-topo I IgG concentration was determined using an Easy-Titer Human IgG Assay Kit (Pierce), and the concentration varied from 3.6 $\text{ng}/\mu\text{L}$ to 8.3 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Flow cytometry. Adherent cells were detached with phosphate buffered saline (PBS)-0.5% EDTA and washed with PBS. Cells were incubated first with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of goat IgG (Sigma) in PBS to block non-specific binding sites and then with human sera diluted 1:200 in PBS with 3% bovine serum albumin (BSA) or with mouse anti-CD51 IgG (Sigma) for 30 minutes. IgG binding was revealed with phycoerythrin-conjugated goat anti-human IgG γ -chain (1:50 dilution) or with phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG γ -chain (1:100 dilution) (both from Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Cell permeability was assessed by addition of 7-amino-actinomycin D (7-AAD; Sigma). Fluorescence was detected with a FACScan and analyzed by Cellquest software (BD Biosciences, San Jose, CA). The mean fluorescence intensity (MFI) of a reference from a positive serum pool was arbitrarily defined as a standard and assayed in each independent experiment. To adjust for interassay variability, the results of tested samples were normalized with respect to this positive reference value.

ELISA. Polystyrene 96-well plates (Immulon 2HB, ThermoLab Systems, Franklin, MA) were coated with 350 ng of affinity-purified topo I (Immunovision, Springdale, AR) diluted in 0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ buffer, pH 9.6, for 1 hour at 37°C. After washes with PBS/0.5% Tween-20, wells were blocked overnight at 37°C with PBS containing 2% FBS, 1% BSA and 0.5% Tween-20. Patient sera diluted 1:1,000 in blocking buffer were incubated

for 1 hour at 37°C. Binding of human IgG was revealed with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG γ -chain (Jackson) diluted 1:10000 in blocking buffer and o-phenylenediamine (Sigma) substrate diluted at 0.8 mg/ml in citrate buffer, pH 6, and 0.006% H₂O₂. The reaction was stopped by the addition of 2M H₂SO₄ and the optical density (OD) at 490 nm was read in a MRX revelation microplate-reader (Dynex, Chantilly, VA). ELISA samples were read in duplicate and subtracted from a control well without antigen. OD values were normalized to a reference positive pool of sera added to each plate.

Electrophoresis and immunoblotting. NHLFs were washed in PBS and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris pH 7.4, 1mM Na₃VO₄, 1% sodium dodecyl sulfate). Proteins from cell lysates were quantitated using the Micro BCA Protein Assay (Pierce), according to the manufacturer's instructions. Topo I and NHLF proteins were diluted in electrophoresis sample buffer (25 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol, 1% sodium dodecyl sulfate, 2% β -mercaptoethanol, 0.25% bromophenol blue). Proteins were separated on 8% polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad).

Membranes were preincubated overnight at 4°C in blocking buffer (Tris buffered saline-0.5% Tween-20-5% powdered skim milk) and then for 1 hour at room temperature with purified serum IgG (10 μ g/mL). IgG binding was detected using a horseradish peroxidase-coupled goat anti-human IgG γ -chain (Jackson) and the Super Signal West Pico chemiluminescence kit (Pierce). Mouse monoclonal IgM anti-human DNA topo Isomerase I (BD) diluted 1:500 was used as a positive control.

Immunofluorescence and confocal microscopy. ANA fluorescent pattern detection was done as previously described (18). Briefly, WI-38 cells were grown to 70% confluence on glass coverslips. Cell monolayers were washed 3 times with cold PBS, fixed and permeabilized with methanol (5 minutes at -20°C), followed by acetone (2 minutes at -20°C). Fixed cells were first incubated for 10 minutes with PBS-3% BSA and then for 30 minutes with human

sera diluted 1:50. Antibody binding sites were revealed with a fluoresceinated goat anti-human IgG γ -chain (Jackson ImmunoResearch).

For surface staining with human IgG, WI-38 cells were detached with 0.125 mg/mL of trypsin/EDTA. Cells were incubated first with 1 μ g/ μ l of goat IgG and then with 200 μ g/ml SSc total IgG or 20 μ g/ml affinity-purified SSc anti-topo I IgG. Mouse anti-CD51 IgG (Sigma) was used as a membrane marker. IgG binding was revealed with fluoresceinated goat anti-human IgG γ -chain and Cy3-labeled goat anti-mouse IgG γ -chain (both from Jackson ImmunoResearch). Cells were cytospun (1,200g for 5 minutes) onto glass slides and fixed with PBS/2% paraformaldehyde. Cells were then examined with a Zeiss 510 confocal laser microscope (Zeiss, Thornwood, NY), as previously described (19).

For competition studies with topo I, 25 μ g of purified topo I (Immunovision) was immobilized on Vivapure Epoxy Protein Coupling columns (VivaScience). Anti-topo I that have been affinity-purified from 2 different AFA-positive sera was incubated with the immobilized topo I according to the manufacturer's instruction. Anti-topo I depletion was confirmed by immunoblotting on NHLF lysates. The anti-topo I-depleted solution was then assayed for fibroblast surface binding by immunofluorescence as described above.

Statistical analysis. Comparison of the mean IgG levels between SSc patients and controls was performed using the Kruskal-Wallis nonparametric analysis of variance and Dunn's multiple comparison test (20). Frequency comparison of AFA was done by Chi-square test. Correlation between the optical density and the mean fluorescence intensity values was validated by Pearson's correlation test. Statistical tests were performed with GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Restriction of AFAs to a subset of SSc and SLE patients. In a previous study, AFAs were found to be present in sera from SSc patients but not in sera from sarcoidosis and healthy controls (10), suggesting that AFAs could be restricted to SSc. We wanted to assess the frequency of AFA-positive sera in our cohort of patients and healthy controls. Sera were screened for AFAs by flow cytometry using unfixed WI-38 human lung fibroblasts. Permeable cells stained positive with the nuclear marker 7-AAD and were gated out, thereby eliminating intracellularly-stained cells. Figure 1 shows the representative results obtained with 2 SSc sera, one positive and the other negative for AFA activity, and with 1 serum from a normal control subject. An anti-human CD51 antibody was used as positive control (results not shown).

Serum samples from patients the 99 patients with SSc, 123 control patients with autoimmune and non autoimmune disease, and 30 healthy controls were screened as mentioned above. Figure 2 shows the distribution and titers of IgG AFAs. High titers of AFAs were present in sera from 26 of 99 SSc patients (26.3%), using the set threshold of 10 SD above the mean value of age- and sex-matched normal controls. High titers of AFAs were also found in 5 SLE sera (16.7%). None of the other control sera had AFAs (Figure 2).

Comparison of the mean serum levels of IgG AFA across the groups revealed a highly significant difference ($P < 0.0001$). Specifically, the mean IgG AFA level was higher in the SSc group than in any control group ($P < 0.05$) except SLE. The frequency of high titers of IgG AFA was also greater in SSc than in all control groups ($P < 0.01$) except SLE. Finally, the mean IgG AFA level in the SSc patients with high titers of AFAs ($n=26$) was greater than in the other SSc patients ($n=73$) as well as any control group ($P < 0.001$).

High titers of AFAs in patients with limited, intermediate, and diffuse SSc. A higher frequency of AFAs in diffuse SSc than in limited SSc was previously reported (10). We wanted to determine if that was the case for the SSc

patients in our study. High titers of IgG AFA were found with similar frequencies in limited, intermediate and diffuse SSc sera (27%, 30% and 38.5%, respectively, $P=0.8$). The mean AFA titers were not significantly different in these SSc subsets ($P>0.05$, by Kruskal-Wallis nonparametric analysis of variance) (data not shown).

Association of high titers of AFA with pulmonary involvement and death. To determine if AFA positivity was associated with specific features of SSc, the frequency of involvement of various target organs at diagnosis was compared between AFA-positive and AFA-negative sera. On pulmonary function tests, a restrictive syndrome was significantly more frequent in AFA-positive (8 of 23 [34.8%]) than in AFA-negative patients (6 of 61, [9.8%]) ($P<0.005$, odds ratio [OR] 5.8, 95% confidence interval [95% CI] 1.7-19). Similarly, a diffusion capacity for carbon monoxide (DLCO) value $<60\%$ of the normal predicted value was more frequent in AFA-positive (14 of 27 [51.8%]) than in AFA-negative patients (17 of 71 [23.9%]) ($P<0.02$, OR 3.4, 95% CI 1.35-8.7). The presence of pulmonary fibrosis (on radiogram or computerized scan of the chest) and/or a restrictive syndrome and/or a DLCO $<60\%$ was also significantly more common in AFA-positive (16 of 27 [59.3%]) than in AFA-negative patients (21 of 71 [29.6%]) ($P=0.01$, OR 3.5, 95% CI 1.4-8.7). Finally, a significantly greater mortality rate was observed during followup among patients who were AFA-positive at diagnosis (13 of 27 [48.1%]) compared with patients who were AFA-negative at diagnosis (15 of 71 [21.1%]) ($P<0.02$, OR 3.47, 95% CI 1.35-8.9).

Lack of binding of AFA-positive sera to primary endothelial cells and smooth muscle cells. To assess whether the binding activity of AFAs from SSc sera was influenced by fibroblast origin, we screened AFA-positive sera ($n=25$) on human primary fibroblasts from adult lung, adult and neonate dermis, and on the immortalized human fibroblast cell line hTERT-BJ1. Mouse NIH 3T3 and rat RAT-2 fibroblast cell lines were also tested. Results were compared with those obtained with the WI-38 cell line and were found to be qualitatively similar (data not shown). However, none of the AFA-positive SSc sera tested had significant

binding activity in the 3 primary endothelial cell populations tested (human umbilical vein endothelial cells, human microvascular endothelial cells from derm and lung) or in primary smooth muscle cells (data not shown). These results indicate a high specificity of AFAs for fibroblasts that is independent of their origin.

Strong association between anti-topo I activity and AFA positivity in SSc. To further characterize SSc AFAs, we examined whether AFA status correlated with any specific fluorescent ANA staining patterns. SSc sera (12 negative and 25 positive) were first screened for ANAs by indirect immunofluorescence on fixed WI-38 cells. Intriguingly, all AFA-positive sera had strong nucleolar and nuclear granular diffuse staining reminiscent of an anti-topo I staining pattern (data not shown). A mouse monoclonal anti-topo I antibody used as control gave a similar nuclear staining pattern (data not shown). These results suggested that AFAs were associated with anti-topo I. Therefore, the presence of anti-topo I IgGs in each SSc serum sample was assayed by ELISA-purified topo I. The mean anti-topo I reactivity was strikingly higher in AFA-positive sera compared to AFA-negative sera ($P < 0.0001$, by Kruskal-Wallis analysis) (data not shown).

To determine whether AFAs were contained in the IgG fraction of SSc sera, IgGs were purified from AFA-negative SSc sera ($n=12$), AFA-positive SSc sera ($n=25$), and normal human sera ($n=3$) and tested for binding to lung fibroblasts by flow cytometry. The results obtained were the same as with unfractionated sera (data not shown), confirming that AFAs are mainly of the IgG isotype.

The IgG purified from SSc sera were further tested for reactivity against topo I by immunoblotting. We found a complete correlation between IgG reactivity against denatured topo I protein and AFA status (Figure 3). IgG from all 25 AFA-positive sera (100%) reacted with topo I (Figure 3a). To verify whether this association was maintained with cellular topo I, SSc IgGs were reacted against NHLF lysates. As shown in Figure 3b, IgG preparations from all

25 AFA-positive sera (100%) reacted against a 95-100-kd protein, whereas 2 of the 12 AFA-negative sera (16.7%) showed this reactivity. The monoclonal antibody against topo I used as positive control also reacted against a 95-100-kd protein, confirming the presence of cellular topo I at this position. Again, these data demonstrated a strong association between the presence of anti-topo I IgG and AFAs in SSc sera. Two IgG preparations from AFA-negative sera recognized a 95-100-kd protein present in the fibroblast lysate but were negative for topo I recognition.

In contrast to the AFA-positive SSc sera, none of the 5 AFA-positive SLE sera tested by flow cytometry on WI-38 lung fibroblasts were positive for topo I recognition by immunoblotting or ELISA (data not shown). These results are consistent with previous studies demonstrating the rarity of anti-topo I antibodies in SLE patients except in those with overlap syndromes (6, 21).

Strong correlation between AFAs and anti-topo I reactivity. The strong association between AFA positivity and the presence of anti-topo I in SSc sera prompted us to determine whether there was also a direct quantitative correlation between AFA binding and anti-topo I reactivity by ELISA. As shown in Figure 4, there was a striking and highly significant correlation between the AFA binding intensity and anti-topo I reactivity ($r=0.65$, $P<0.0001$), suggesting that anti-topo I IgG may be directly responsible for fibroblast binding.

Cell surface localization of AFA binding sites on human lung fibroblasts. Since topo I is a nuclear protein that is not normally present on the cell surface, we wanted to confirm the cell surface localization of AFA binding. The cellular binding patterns of IgG preparations from 3 AFA-positive SSc sera, 3 AFA-negative SSc sera, and 2 normal sera were evaluated on living fibroblasts by double immunofluorescence and subsequently visualized by confocal laser microscopy. WI-38 fibroblasts were exposed to human IgG, prior to any fixation or permeabilization of the cells. IgG binding patterns were revealed by a fluoresceinated anti-human antibody. Mouse anti-human CD51 and Cy3-

conjugated anti-mouse antibodies were used as a cell surface marker. As shown in Figure 5a, fluorescence due to IgG from AFA-positive sera localized at the cell surface. The staining pattern of IgGs from AFA-positive sera was dotted, suggesting a nonuniform distribution of the surface antigenic target. Only limited staining was observed on the surface of cells exposed to AFA-negative IgG or normal human IgG (Figure 5c and d, respectively). These results confirm that AFAs bind to the surface of fibroblasts.

Binding of affinity-purified anti-topo I to the surface of fibroblasts.

Taken together, the results shown above strongly suggest that AFA activity in SSc sera is directly mediated by anti-topo I autoantibodies that are capable of recognizing a fibroblast surface antigen. As shown in Figure 6a, immunoblotting analyses confirmed that anti-topo I IgG affinity-purified from 2 different AFA-positive SSc sera reacted specifically against topo I. The antifibroblast-binding activity of these purified anti-topo I IgGs was then assessed by flow cytometry and immunofluorescence on WI-38 fibroblasts. Anti-topo I IgG preparations were found to bind to the fibroblast surface by both techniques (Figure 5d and Figure 6b, respectively). A mouse monoclonal anti-human topo I antibody also reacted against the WI-38 cell surface by flow cytometry (Figure 6b). Immunofluorescence experiments demonstrated that competition with topo I completely abrogated binding to the cell surface of purified anti-topo I (data not shown), thus confirming the specificity of the antifibroblast-binding activity of affinity-purified anti-topo I. These results clearly demonstrate that anti-topo I autoantibodies present in SSc sera are AFAs.

DISCUSSION

Until recently, autoantibodies associated with SSc were thought to play only a limited role in the pathogenesis of this disease and were studied mainly for their use as disease-specific markers. However, recent studies have shown that

AFAs present in the sera of SSc patients can induce a proadhesive and proinflammatory phenotype in fibroblasts and can also be specifically internalized by these cells (9,10). These findings suggest that the role of AFAs in SSc may be of a greater importance than previously thought. Hence, the aim of our study was to further characterize the binding activity of autoantibodies from SSc sera on fibroblasts and to explore the association of these AFAs with major ANAs.

Using sera obtained at the time of diagnosis, we confirmed the presence of AFAs in SSc sera, as previously reported (10). Moreover, we found that AFAs were more common in SSc patients than in any autoimmune or nonautoimmune patient control group studied, except for SLE. Results of AFA assays were identical whether we used unfractionated sera or purified IgG. Also, AFA activity was highly fibroblast-specific, since no AFA binding to primary endothelial cells or smooth muscle cells was observed. In contrast, AFA-positive sera bound to all 7 fibroblast populations tested.

A striking and unexpected finding in our study was the perfect association between the presence of AFAs and anti-topo I antibodies in SSc sera. Such an association was not present in AFA-positive SLE sera. All AFA-positive sera from SSc patients recognized topo I as determined by ELISA. AFA-positive sera also stained the nuclei of permeabilized WI-38 lung fibroblasts with an anti-topo I pattern as demonstrated by indirect immunofluorescence. Furthermore, all 25 IgG preparations from AFA-positive SSc sera reacted on immunoblotting against both purified topo I and the topo I (95-100 kd [22]) that was present in extracts from human lung fibroblasts. The 2 AFA-negative sera that were also negative for topo I recognition did react against a 95-100-kd protein present in cellular extracts. It is likely that this antigen was not topo I but a comigrating polypeptide, as previously reported (23).

AFA-positive SSc sera were not only associated qualitatively with the presence of anti-topo I antibodies but their association was also quantitative, as shown by their highly significant correlation with anti-topo I antibody levels (Figure 4). Furthermore, the strong association between AFA-positive and

pulmonary involvement as well as mortality in SSc was reminiscent of the associations reported by us and by other investigators for anti-topo I (3).

Because these results globally suggested that AFA activity in SSc sera might be directly due to anti-topo I autoantibodies, we affinity-purified anti-topo I IgG from AFA-positive SSc sera and tested them by flow cytometry and immunofluorescence. Our results showed that anti-topo I IgG from SSc sera as well as monoclonal anti-topo I antibodies can bind directly to the surface of WI-38 fibroblasts.

This is the first report establishing that AFAs in SSc are strongly correlated with anti-topo I and, furthermore, that anti-topo I themselves display AFA activity by reacting with determinants at the fibroblast surface. Because we did not affinity-purify anti-topo I from all 25 positive sera, and test them for binding to the fibroblast surface, we cannot exclude the possibility that, in some instances, the association between anti-topo I and AFA in SSc sera may be due to 2 distinct autoantibody populations. Further experiments are under way to examine this possibility.

Because topo I has a strict nuclear localization, and given that fibroblasts play a crucial role in the unregulated production of extracellular matrix components that leads to fibrosis in SSc (24,25), our findings raise two fundamental questions. First, what is the molecular identity of the cell surface antigen recognized by anti-topo I? One possible explanation would be the presence of topo I itself at the fibroblast surface. Although some studies have provided evidence that intracellular autoantigens are exported to the cell surface by ectocytosis or during apoptotic processes (26-29), the presence of topo I on the plasma membrane of normal human fibroblasts has, to our knowledge, never been reported. An alternative explanation would be that anti-topo I cross-react with an integral or a peripheral plasma membrane protein. Such a hypothesis is not without precedent since DeGiorgio et al (30) have shown that a subset of anti-DNA antibodies cross-react with the NR2 glutamate receptor from neurons of the central nervous system in SLE (30). That report shows that it is possible for an autoantibody to a strict intranuclear autoantigen to cross-react with an unrelated

cell surface antigen. Our results show that anti-topo I reactivity was specific for fibroblasts, since no reactivity against several endothelial cell and smooth muscle cell lines was observed. This specificity may indeed point to cross-reactivity with a fibroblast-specific protein on the cell surface. However, the molecular identity of the cell surface antigen recognized by anti-topo I remains to be determined.

The second question raised by our data is whether anti-topo I binding to the fibroblast surface perturbs their function and contributes to the pathogenesis of SSc. This question is relevant in light of growing evidence showing a strong relationship between anti-topo I levels and severity of skin and pulmonary involvement as well as global disease activity in SSc (3,7,31-33). Although the role of the recently discovered AFAs in the pathogenesis of SSc is still unclear, results appear to point at their influence on the cellular activation state via direct interaction with an undefined fibroblast surface target (9, 10). Whether anti-topo I could perturb fibroblast functions by other pathways remains to be determined.

In summary, we have shown that AFAs in SSc are strongly correlated with anti-topo I. Furthermore, anti-topo I themselves display AFA activity by reacting with determinants at the fibroblast surface. We have now undertaken studies to define the molecular identity of these determinants as well as to examine mechanistically whether anti-topo I antibodies perturb fibroblast functions in SSc.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mr. Fernand Locas, Mrs. Gisèle Sarrazin-Locas, and the Comité Fonds Sainte-Jeanne-d'Arc, Dollard-Cormier Foundation, Montreal, Quebec, Canada for generous donations in support of our laboratory.

REFERENCES

1. Le Roy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
2. Mouthon L, Garcia De La Pena-Lefebvre P, Chanseaud Y, Tamby MC, Boissier MC, Guillevin L. Pathogenesis of systemic scleroderma: immunological aspects. *Ann Med Interne (Paris)* 2002;153:167-78.
3. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR Raymond Y, Sénécal JL. Predicting mortality in systemic sclerosis. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:154-67.
4. Giordano M, Valentini G, Migliaresi S, Picillo U, Vatti M. Different antibody patterns and different prognoses in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis. *J Rheumatol* 1986;13:911-6.
5. Steen VD, Powell DL, Medsger TA Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988;31:196-203.
6. Weiner ES, Earnshaw WC, Sénécal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topo Isomerase I. A study of 355 patients. *Arthritis Rheum* 1988;31:378-85.
7. Diot E, Giraudeau B, Diot P, Degenne D, Ritz L, Guilmot JL et al. Is anti-topo Isomerase I a serum marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis? *Chest* 1999;116:715-20.
8. Brentnall TJ, Kenneally D, Barnett AJ, de Aizpurua HJ, Lolait SJ, Ashcroft R et al. Autoantibodies to fibroblasts in scleroderma. *J Clin Lab Immunol* 1982;8:9-12.
9. Ronda N, Gatti R, Giacosa R, Raschi E, Testoni C, Meroni PL. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum* 2002;46:1595-1601.
10. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1602-1613.
11. 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;106:491-7.
12. Salojin KV, Le Tonqueze M, Saraux A, Nasonov EL, Dueymes M, Piette JC, Youinou PY. Anti-endothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. *Am J Med* 1997;102:178-85.

13. Alderuccio F, Witherden D, Toh BH, Barnett A. Autoantibody to gp50, a glycoprotein shared in common between fibroblasts and lymphocytes, in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1989;78:26-30.
14. Herrmann K, Schaller J, Hausteil UF, Baldauf C, Kiessig S. Lymphocytotoxic autoantibodies in progressive systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1988;280:399-404.
15. 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.
16. Lonzetti LS, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Goulet JR, Rich E, Choquette D, Raymond Y, Sénécal JL. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2001;44:735-6.
17. Sénécal JL, Rauch J, Grodzicky T, Raynauld JP, Uthman I, Nava A, Guimond M, Raymond Y: Autoantibodies to human nuclear lamin B1 are strongly associated with lupus anticoagulant antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:1347-1353.
18. Sénécal JL, Fortin S, Joyal F, Roussin A. A novel autoantibody to microfilament anchorage sites recognizes novel focal contact proteins. *J Clin Invest* 1987;80:778-785.
19. Dieudé M, Sénécal JL, Rauch J, Hanly JG, Fortin P, Brassard N, Raymond Y. 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;46:2695-707.
20. Godfrey K. Comparing the means of several groups. In : Bailar JC III, Mosteller F, editors. *Medical uses of statistics*. Waltham (MA): NEJM Books; 1986.p.205-34.
21. Katsumi S, Kobayashi N, Yamamoto Y, Miyagawa S, Shirai T. Development of systemic sclerosis in a patient with systemic lupus erythematosus and topo Isomerase I antibody. *Br J Dermatol*. 2000;142:1030-3.
22. Guldner HH, Szostecki C, Vosberg HP, Lakomek HJ, Penner E, Bautz FA. Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein indentified as DNA topo Isomerase I. *Chromosoma* 1986;94:132-8.
23. Hildebrandt S, Weiner ES, Sénécal JL, Noell S, Earnshaw WC, Rothfield NF. Autoantibodies to topo Isomerase I (Scl-70): Analysis by gel diffusion, immunoblot and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;57:399-410.
24. Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995;12:187-99.
25. Le Roy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts "in vitro". *J Clin Invest* 1974;54:880-9.

26. Hsu TC, Lee TL, Tsay GJ. Autoantigen components recognizable by scleroderma sera are exported via ectocytosis of fibroblasts. *Br J Rheumatol* 1997;36:1038-44.
27. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2002;56:456-69.
28. Hansen MH, Nielsen HV, Ditzel HJ. Translocation of an intracellular antigen to the surface of medullary breast cancer cells early in apoptosis allows for an antigen-driven antibody response elicited by tumor-infiltrating B cells. *J Immunol* 2002;169:2701-11.
29. 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;169:2156-63.
30. DeGiorgio LA, Konstantinov K, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nature* 2001; 7:1189-1193.
31. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1074-1084.
32. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1363-73.
33. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatol Oxford* 2003;42:534-40.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Flow cytometry analysis of antifibroblast antibodies (AFAs) from human sera on WI-38 fibroblasts. Values are the number of positive intact cell counts versus phycoerythrin (PE)-labeled IgG fluorescence intensity. Permeable cells were gated out after vital staining with 7-aminoactinomycin D (see Patients and Methods). Representative results using an AFA-positive (thick solid line) and an AFA-negative (dotted line) serum are shown. Normal human serum (thin solid line) was used as control. The AFA-positive serum demonstrated strong binding to WI-38 lung fibroblasts, as shown by the shift to the right, whereas AFA-negative serum demonstrated no binding, similar to the normal control serum.

Figure 2. Distribution of IgG antifibroblast antibodies (AFAs) in systemic sclerosis (SSc) patients, rheumatologic disease controls and normal controls by flow cytometry on WI-38 human lung fibroblasts. The rheumatologic disease controls included patients with systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS), psoriatic arthritis (PA), and osteoarthritis (OA). Binding activity, determined as described in Figure 1, is expressed as the normalized mean fluorescence intensity (MFI) (see Patients and Methods). All 252 sera were screened 3 times, and similar results were obtained. Horizontal bars show the mean for each subset. Horizontal broken line defines a cut-off value, corresponding to 10 SD above the mean MFI of normal sera. AFAs were present in sera from 26 of 99 SSc patients (26.3%) and in 5 of 30 SLE patients (16.7%). No AFAs were present in any of the other patient controls or normal controls. The mean IgG AFA levels in the SSc subset with high titers of AFA ($n=26$) was significantly higher than that in the other SSc patients ($n=73$) or in any control group ($P<0.001$, by Kruskal-Wallis nonparametric analysis of variance).

Figure 3. Reactivity of systemic sclerosis (SSc) sera against topo Isomerase I (topo I) in purified form or in cell lysates, according to the patient's antifibroblast antibody (AFA) status. IgG preparations from AFA-negative and AFA-positive SSc sera, and from normal sera were exposed to immunoblots displaying **a**, affinity-purified topo I or **b**, normal human lung fibroblasts (NHLF) lysates. Shown are representative samples from each group. Results for anti-human and anti-mouse secondary antibodies alone, and for commercial human IgG and mouse IgM, which were used as negative controls, are also shown. A mouse IgM monoclonal antibody anti-topo I was used as a positive control. All 25 IgG preparations from AFA-positive sera (100%) recognized both purified topo I and topo I (95-100-kd) from NHLF lysates.

Figure 4. Strong correlation between antifibroblast antibody (AFA) binding intensity and anti-topo Isomerase I reactivity (topo I) in sera from patients with systemic sclerosis (SSc). Flow cytometry data for 32 SSc sera randomly chosen from the SSc cohort shown in Figure 2 are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). Data for reactivity of these 32 sera against topo I were derived from the anti-topo I enzyme-linked immunosorbent assay and are expressed as the optical density (OD) at 490 nm. The correlation was highly significant ($r=0.65$, $P<0.0001$).

Figure 5. Cell surface localization of antifibroblast antibody (AFA) binding sites by double indirect immunofluorescence and confocal laser microscopy. Unfixed WI-38 lung fibroblasts were incubated with **a**, total IgG purified from an AFA-positive systemic sclerosis (SSc) serum, **b**, affinity-purified anti-topo I IgG from an AFA-positive SSc serum, **c**, total IgG purified from AFA-negative SSc serum, and **d**, total IgG purified from normal human serum. Human IgG binding was revealed with a fluoresceinated second antibody to human IgG γ -chain (green). A mouse anti-CD51 antibody and a Cy3-conjugated anti-mouse secondary antibody were used as cell surface markers (red). Two examples of typical results are presented in **a** and **b**. The images shown are a representative of 8 sera tested (3

AFA-positive SSc sera, 3 AFA-negative SSc sera, and 2 normal sera). Both total IgG and affinity-purified anti-topo I IgG from SSc AFA-positive sera showed a dotted staining pattern that was clearly localized at the cell surface. No staining was detected on cells incubated with AFA-negative SSc sera and normal human sera. Bars = 10 μ m.

Figure 6. Antifibroblast-binding activity of affinity-purified anti-topo Isomerase I (anti-topo I) IgG from antifibroblast antibody (AFA)-positive systemic sclerosis (SSc) sera. **a**, Immunoblot on normal human lung fibroblast (NHLF) lysates using representative affinity-purified anti-topo I IgG from 2 AFA-positive sera (#1 and #2). Only topo I (95 kd) was detected by affinity-purified anti-topo I IgG. A monoclonal mouse anti-human topo I was used as positive control and AFA-negative and normal sera were used as negative controls. This experiment was repeated 3 times, and the results were similar. **b**, Flow cytometry analysis of antifibroblast-binding activity of affinity-purified anti-topo I IgG on WI-38 fibroblasts and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Affinity-purified anti-topo I IgG from 2 AFA-positive sera were also positive for fibroblast surface binding. Monoclonal mouse anti-human topo I and anti-CD51 antibodies were used as positive controls, and mouse IgM was used as an isotype control. Values are representative of 2 experiments that yielded similar results.

Figure 1

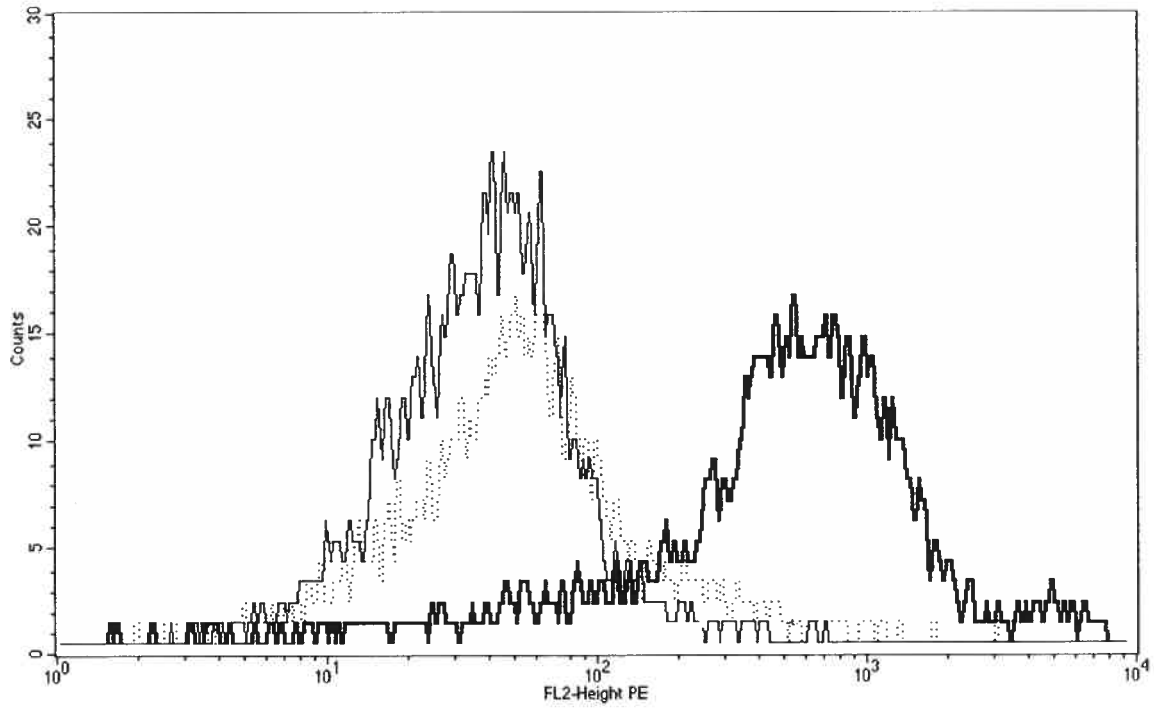


Figure 2

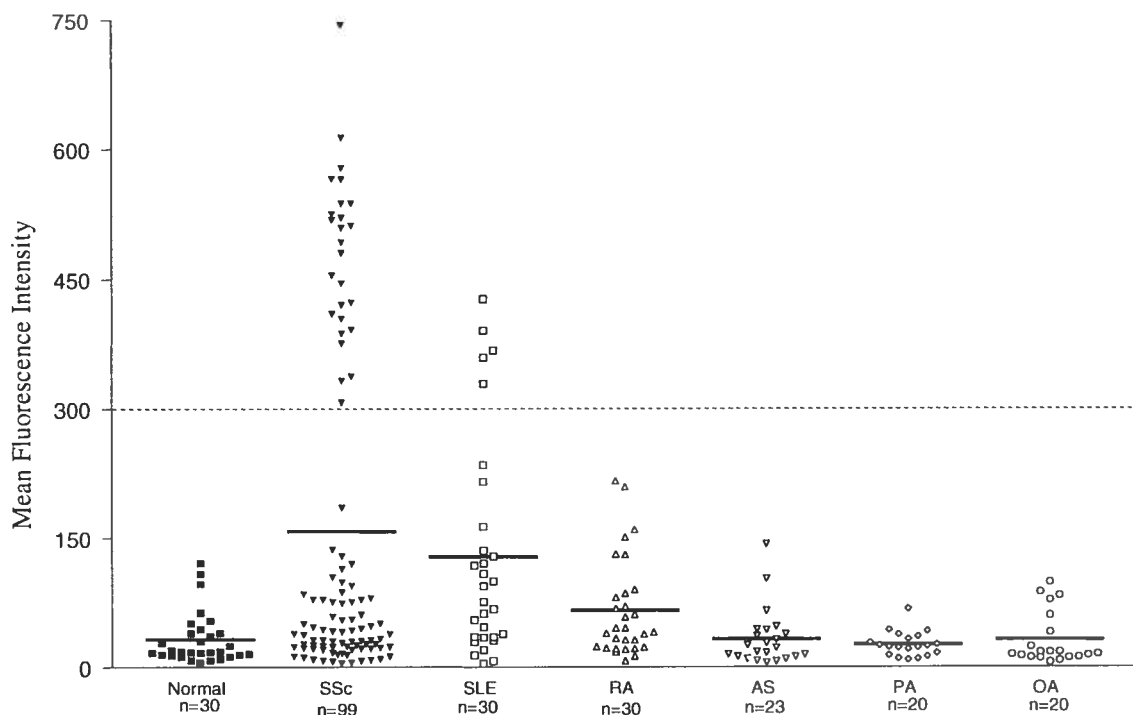


Figure 3

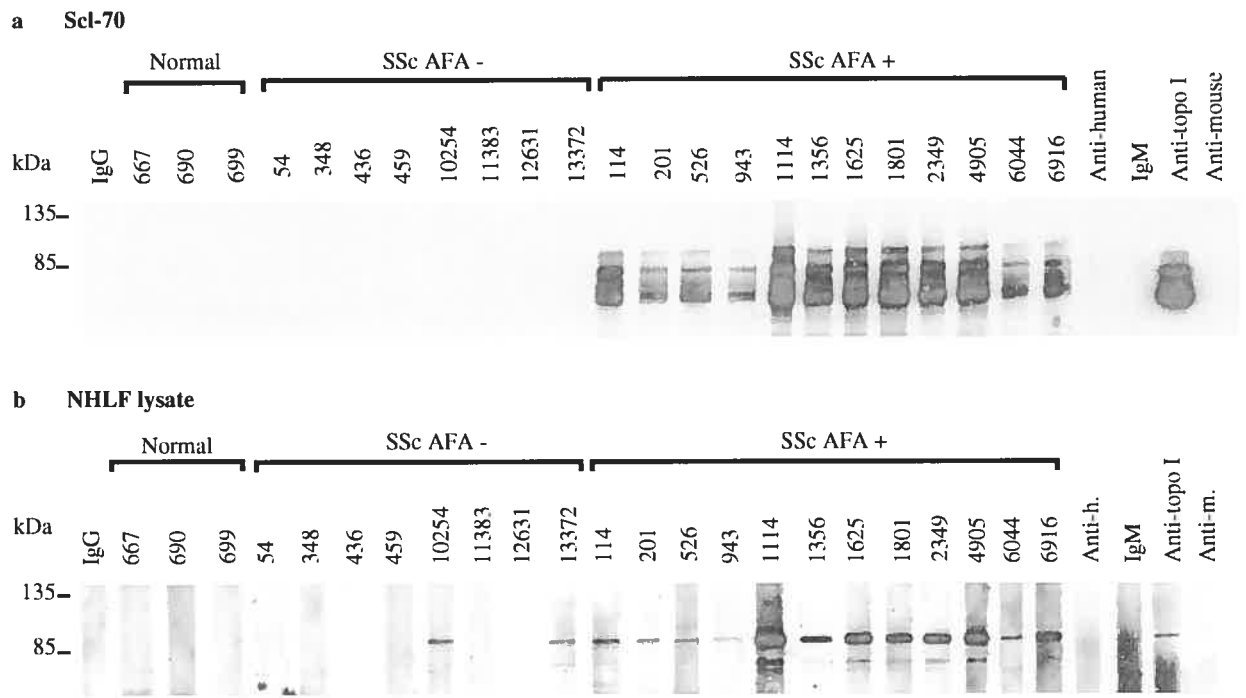


Figure 4

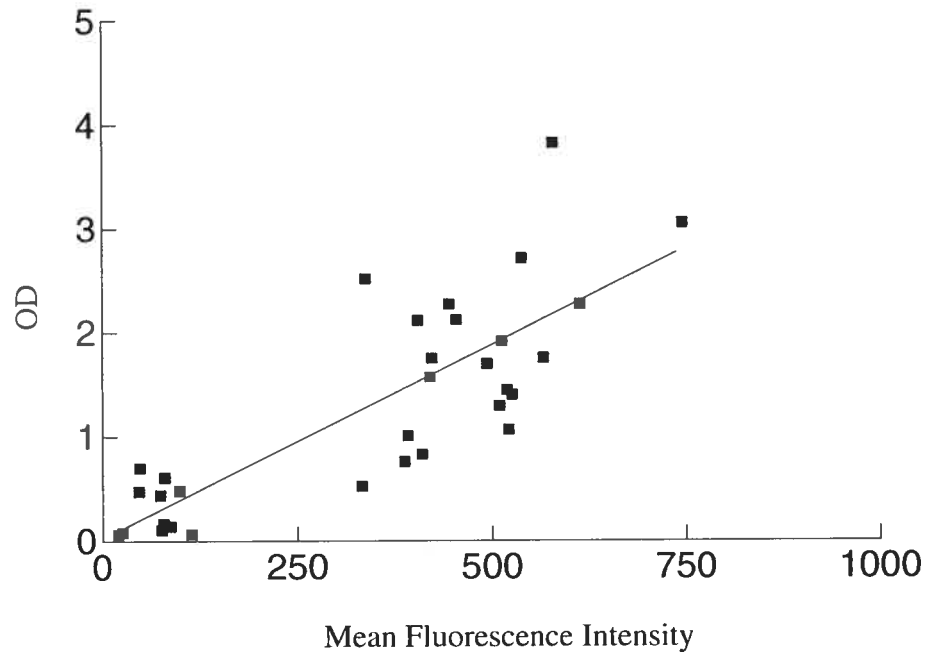


Figure 5

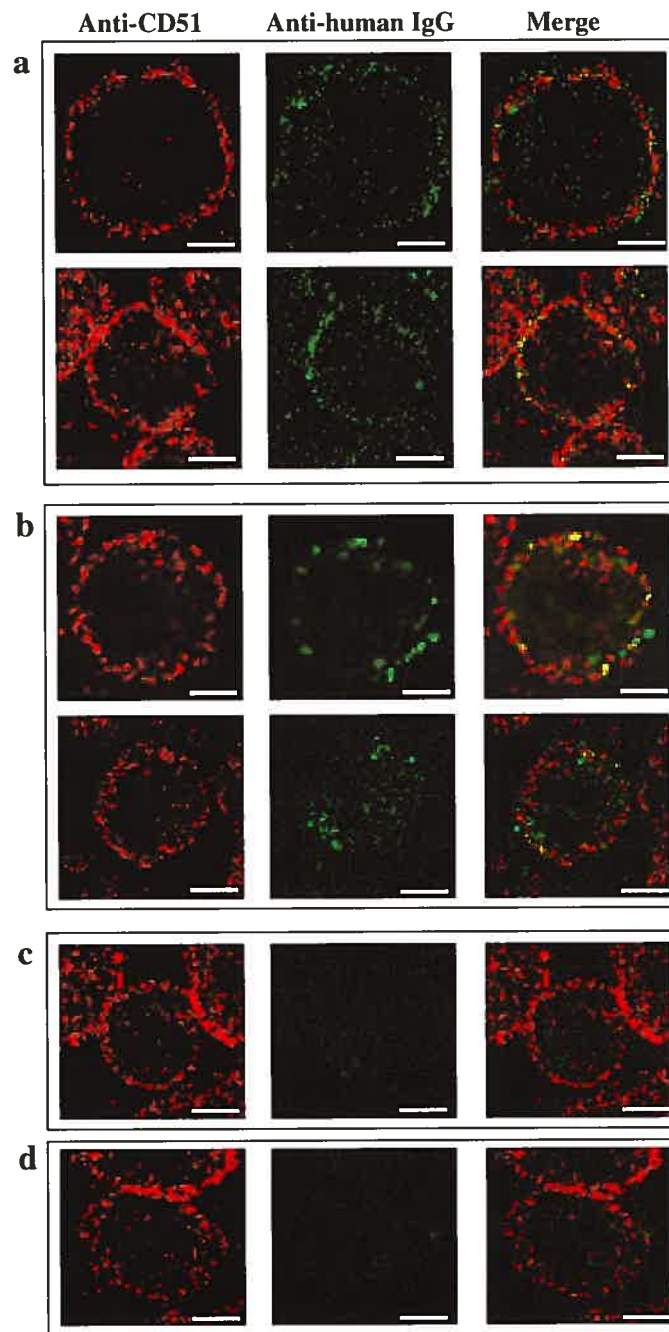
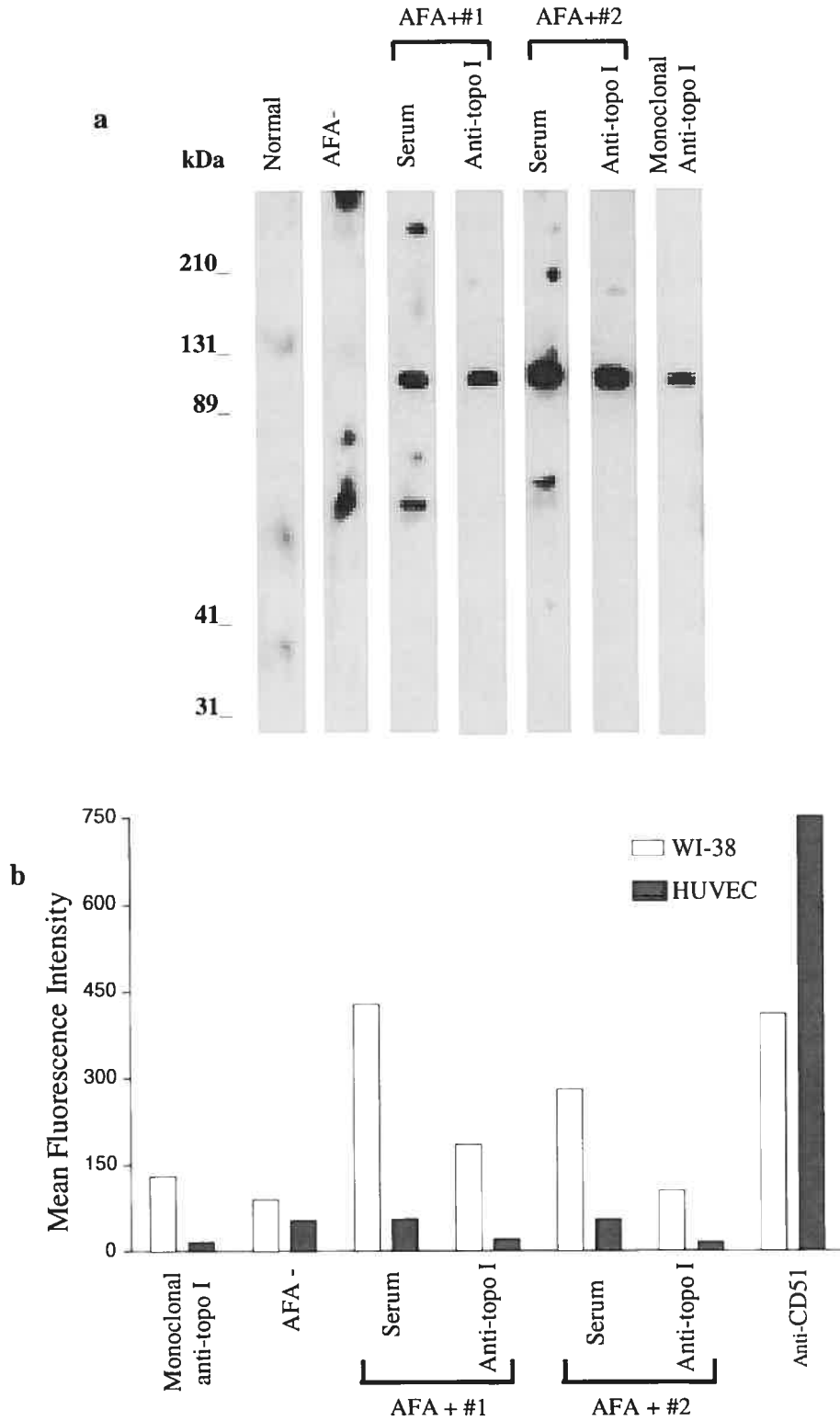
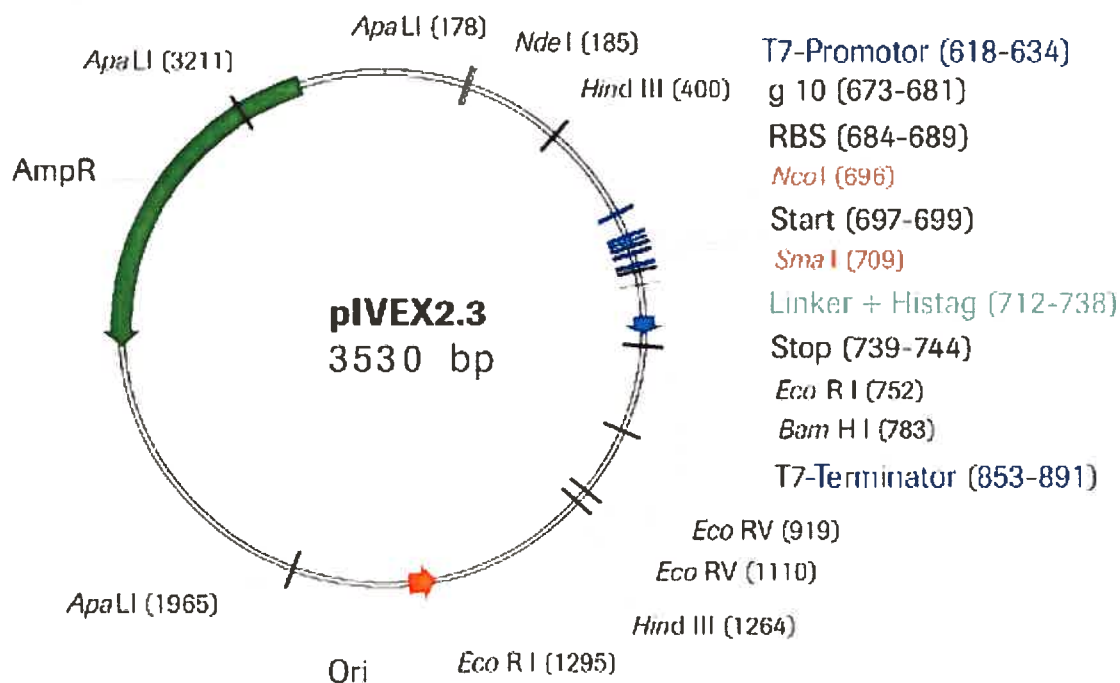


Figure 6

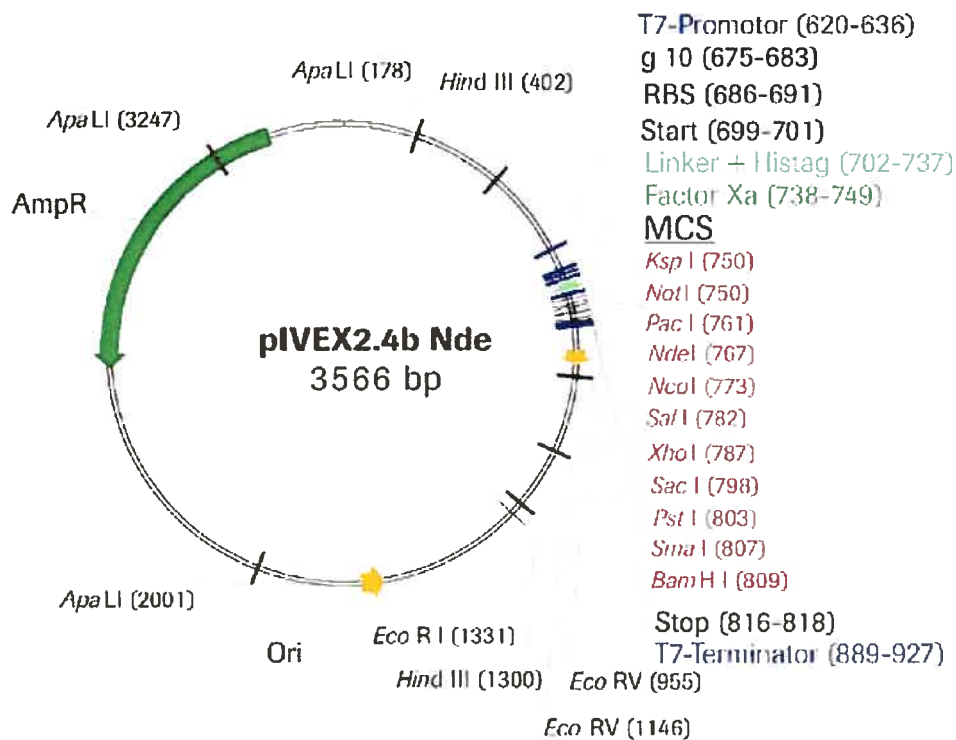


(b) pIVEX 2.3



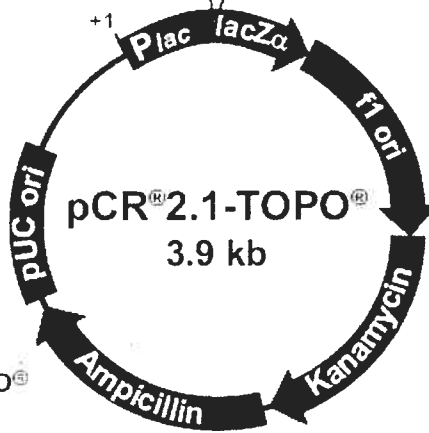
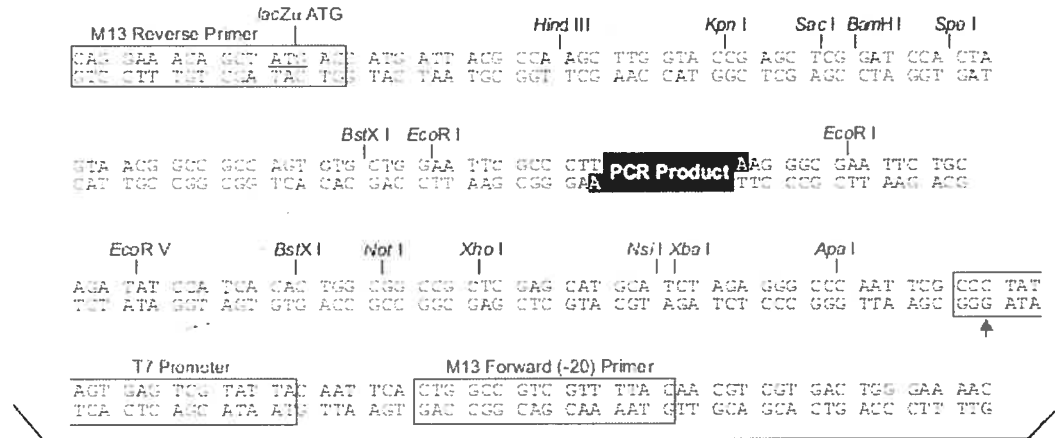
	T7-Promotor				
601	TCTCGATCCC	GCGAAATTAA	TACGACTCAC	TATAGGGAGA	CCACAACGGT
	AGAGCTAGGG	CGCTTAATT	ATGCTGAGTG	ATATCCCTCT	GGTGTTGCCA
			g10 ε	RBS	<i>Nco</i> I
651	TTCCCTCTAG	AAATAATTTT	GTTTAACTTT	AAGAAGGAGA	TATACC ATGG
	AAGGGAGATC	TTTATTAAAA	CAAATTGAAA	TTCTTCCTCT	ATATGGTACC
					Met
	<i>Sma</i> I	Linker	Histag		
701	TGTCCCCCGG	GGGGGGTTCT	CATCATCATC	ATCATCATTA	ATAAAAGGGC
	ACAGGGGGCC	CCCCCAAGA	GTAGTAGTAG	TAGTAGTAAT	TATTTTCCCG
		GlyGlySer	HisHisHisH	IsHisHis**	****

(c) pIVEX 2.4b Nde



	T7-Promotor				
601	TCTCGATCCC AGAGCTAGGG	GCGAAATTAA CGCTTTAATT	TACGACTCAC ATGCTGAGTG	TATAGGGAGA ATATCCCTCT	CCACAACGGT GGTGTGCCA
	g10			RBS	
691	TTCCCTCTAG AAGCGAGATC	AAATAATTTT TTTATTAAAA	GTTTAACTTT CAAATTGAAA	AAGAAGGAGA TTCTTCCTCT	TATACCATGT ATATGGTACA MetS
	Linker Histag		KspI NotI		
701	CTGGTCTCA GACCAAGAGT erGlySerHi	TCATCATCAT AGTAGTAGTA sHisHisHis	CATCATAGCA GTAGTATCGT HisHisSerS	GCGGCATCGA CGCCGTAGCT erGlyIleGI	AGGCCGCGGC TCCGGCGCCG uGlyArgGly
	PacI		NcoI		SmaI Ba
751	CGCTTAAATTA GCGAATTAAT ArgLeuIleL	AAACCATGGC TTTGGTACCG ysThrMetAl	AGTCGACTCG TCAGCTGAGC aValAspSer	AGCGAGCTCT TCGCTCGAGA SerGluLeuC	GCAGCCCGGG CGTCGGGCC ysSerProGI
	mIII				
801	ATCCGGCTGC TAGGCCGACG ySerGlyCys	TAACAAAGCC ATTGTTTCGG ***	CGAAAGGAAG GCTTTCCTTC	CTGAGTTGGC GACTCAACCG	TGCTGCCACC ACGACGGTGG

(d) pCR 2.1-TOPO



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

