

Université de Montréal

**Dissection moléculaire de l'interaction de la DNA
topoisomérase I avec la matrice extracellulaire et les
fibroblastes**

par

Karine Beauchemin

Programme de sciences biomédicales

Faculté de médecine

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

Juin, 2009

© Karine Beauchemin, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Dissection moléculaire de l'interaction de la DNA topoisomérase I avec la matrice
extracellulaire et les fibroblastes

présenté par :

Karine Beauchemin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Isabelle Royal, Ph. D., président-rapporteur

Yves Raymond, Ph. D., directeur de recherche

Jean-Luc Senécal, M.D., co-directeur

Luc Desgroseillers, Ph. D., membre du jury

Résumé

La sclérose systémique est une maladie auto-immune dont l'une des complications majeures est la fibrose. La DNA topoisomérase I (topo) est l'un des principaux autoantigènes associés à cette maladie. Toutefois, aucun lien n'a encore pu être établi entre la présence des anti-topo et le développement de la fibrose.

Les travaux antérieurs du laboratoire d'accueil ont montré une interaction directe de la topo avec la surface des fibroblastes et la matrice extracellulaire. Nous avons voulu caractériser ces interactions du point de vue moléculaire. La topo a donc été exprimée sous forme de 5 fragments, déterminés à partir de ses principaux domaines structuraux et de ses épitopes majeurs, chez *E. coli*. Les fragments purifiés ont été analysés pour leur interaction avec l'héparine, représentant les héparane sulfates de la surface des fibroblastes, et avec des protéines purifiées de la matrice extracellulaire.

Nous avons montré que le fragment topo-N est le principal responsable de l'interaction avec l'héparine, ce qui suggère donc l'implication potentielle de ce domaine dans l'interaction de la topo avec la surface des fibroblastes. Le fragment topo-DIDII est responsable de l'interaction avec la plupart des protéines de la matrice extracellulaire étudiées, alors que le fragment topo-H15 n'interagit qu'avec la vitronectine. Aucune interaction des fragments topo-DIII et topo-C n'a été décelée.

Ces résultats pourront maintenant servir à mieux comprendre le rôle potentiel de la topo et des autoanticorps circulants anti-topo dans la fibrose présente chez les personnes atteintes de sclérose systémique en contribuant à l'identification de la cible de la topo sur les fibroblastes.

Mots-clés : sclérose systémique, ADN topoisomérase I, fibroblaste, matrice extracellulaire, autoanticorps

Abstract

Systemic sclerosis is an autoimmune disease in which one of the major complications is fibrosis. DNA topoisomerase I (topo) is a major autoantigen associated with this disease. However, no link has yet been established between the presence of anti-topo and the development of fibrosis.

Previous work of the host laboratory showed a direct interaction of the topo with the surface of fibroblasts and extracellular matrix. We wanted to characterize these interactions at the molecular level. Topo was expressed in 5 fragments, determined from its main structural domains and its major epitopes, in *E. coli*. The purified fragments were analyzed for their interaction with heparin, representing heparan sulfates on the surface of fibroblasts, and with purified proteins of the extracellular matrix.

We have shown that the topo-N fragment is responsible for interaction with heparin, suggesting hence, potential involvement of this domain in the interaction of topo with the surface of fibroblasts. The topo-DIDII fragment is responsible for the interaction with most proteins of the extracellular matrix studied, whereas the topo-H15 fragment only binds to vitronectin. No interaction of fragments topo-DIII and topo-C was found.

These results can now be used to better understand the potential role of topo and circulating anti-topo autoantibodies in the fibrosis present in patients with systemic sclerosis in helping to identify the target of topo on fibroblasts.

Keywords : systemic sclerosis, DNA topoisomerase I, fibroblast, extracellular matrix, autoantibodies

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiii
Introduction.....	1
Le système immunitaire.....	2
La sclérose systémique.....	3
Épidémiologie.....	4
Les effets de la SSc.....	5
Au niveau de la peau.....	5
Au niveau des poumons.....	6
Autres effets.....	6
Diagnostic.....	7
Les autoanticorps.....	8
aAg nucléaires.....	8
Anticorps anticentromère (ACA).....	8
Anti ARN polymérase (anti-RNAP).....	10
Anti-Th/To.....	10
Anti-ADN topoisomérase I (anti-topo).....	10
La fibrose.....	12
La matrice extracellulaire.....	16
Collagène de type-1.....	17

Fibronectine	18
Thrombospondine	19
Laminine	19
Vitronectine.....	20
Les héparanes sulfates.....	21
Mécanisme de réparation de blessures.....	22
Les autoantigènes.....	24
La ADN-topoisomérase I.....	26
Structure	26
Rôle biologique intracellulaire.....	30
Épitopes de la topo.....	31
Problématique	32
Matériels et Méthodes.....	33
Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et transfert sur nitrocellulose	34
Immunobuvardage	35
Production des fragments de la topo.....	35
Fragment topo-DIII.....	35
Expression et purification	35
Concentration et dosage.....	37
Fragment topo-C	37
Amplification et dosage du vecteur.....	37
Polymerase chain reaction (PCR) et clonage.....	38
Criblage de clones positifs	39
Expression et purification	40
Concentration et dosage.....	41

Fragment topo-N	41
Expression et purification	41
Concentration et dosage	43
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	44
Liaison aux protéines de la matrice extracellulaire.....	44
Fibronectine plasmatique et cellulaire, laminine, thrombospondine et collagène	44
Vitronectine.....	45
Liaison aux protéines de la surface cellulaire	45
Héparine	45
Résultats	46
Production des fragments de la topo	47
Topo-DIII	51
Topo-C	53
Topo-N	58
Liaison des fragments de topo aux protéines de la matrice extracellulaire.....	62
Liaison des fragments de topo aux protéines de la surface des fibroblastes.....	73
Discussion	77
Les fragments de topo	78
Interactions des fragments de topo avec la matrice extracellulaire.....	79
Interaction topo-DIDII et matrice extracellulaire	79
Interaction topo-H15 et vitronectine	81
Interactions des fragments de topo avec la surface des fibroblastes.....	81
Les résultats d'une autre étude.....	83
L'authenticité des liaisons observées	83

Perspectives futures.....	86
Effets de la liaison de la topo aux fibroblastes.....	87
Provenance <i>in vivo</i> de la topo	88
Avenues thérapeutiques	89
Bibliographie.....	91
Annexe	I
Annexe I- Carte des vecteurs utilisés	II
(a) pIVEX2.4b/Nde.....	II
(b) pbluescript II SK(+)......	III
Annexe II- Analyse en spectrométrie de masse	IV
(a) Bande correspondant à la topo-N	IV
(B) Bande correspondant à la DnaK	V

Liste des tableaux

Tableau 1. Autoanticorps présents dans la SSc.....	9
Tableau 2. Résumé des interactions des fragments de la topo et des ligands de la matrice extracellulaire et de la surface des fibroblastes.....	76

Liste des figures

Figure 1. Modèle de la fibrose des tissus dans la SSc.....	15
Figure 2. Structure de la topo reconstituée, déduite grâce aux études cristallographiques.....	29
Figure 3. Représentation schématique de la structure de la topo I.....	48
Figure 4. Fragments purifiés de topo	50
Figure 5. Purification du fragment topo-DIII	52
Figure 6. Migration sur gel d'agarose du fragment d'ADN topo-C seul et dans le vecteur pIVEX2.4b/Nde.....	54
Figure 7. Expression du fragment recombinant topo-C.....	55
Figure 8. Purification du fragment topo-C.....	56
Figure 9. Purification du fragment topo-N.....	59
Figure 10. Contrôles de l'interaction de la fibronectine plasmatique et de la topo entière ainsi que du revêtement des puits en ELISA	63
Figure 11. Interaction des fragments et de la topo entière avec la fibronectine plasmatique en ELISA.....	65

Figure 12. Interaction des fragments et de la topo entière avec la fibronectine cellulaire en ELISA.....	66
Figure 13. Interaction des fragments et de la topo entière avec la laminine en ELISA	67
Figure 14. Interaction des fragments et de la topo entière avec la thrombospondine en ELISA.....	68
Figure 15. Interaction des fragments et de la topo entière avec la vitronectine en ELISA.....	69
Figure 16. Interaction des fragments et de la topo entière avec le collagène type I en ELISA.....	71
Figure 17. Comparaison de l'interaction de la topo entière et des protéines de la matrice extracellulaire en présence de différentes concentrations de NaCl.....	72
Figure 18. Interaction des fragments et de la topo entière avec de l'héparine en ELISA	74
Figure 19. Représentation schématique de la structure de la topo I et de l'interaction des différents fragments avec les protéines de la matrice extracellulaire et de la surface des fibroblastes.....	85

Liste des abréviations

a.a. :	acides aminés
aAc :	autoanticorps
aAg :	autoantigène
ACA :	anticorps anti-centromère
BSA :	albumine de sérum bovin
CENP-B :	protéine centromérique B
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	cellule présentatrice d'antigènes
FAK :	kinases d'adhésion focale
HMGB1:	<i>high mobility group box chromosomal protein 1</i>
HRP :	peroxydase de raifort
HS :	héparanes sulfates
HSPG :	protéoglycanes héparanes sulfates
MEC :	matrice extracellulaire
MMP :	métalloprotéinases
PBS :	solution saline de tampon phosphate
ROS :	espèce de radicaux oxygénés
SLE :	lupus érythémateux systémique
SSc :	sclérose systémique
TCR :	récepteur des lymphocytes T
topo :	topoisomérase I

Remerciements

Je voudrais remercier toute l'équipe du laboratoire, Isabelle, Julie, Geneviève et Marie-Soleil de m'avoir guidée durant ces deux années, mais aussi de leur accueil chaleureux. Merci à vous toutes pour les conseils académiques et pour les discussions pas toujours académiques, mais toujours intéressantes! J'ai beaucoup apprécié ces deux années avec vous.

Merci également à mes deux directeurs de recherche, Dr. Raymond et Dr. Sénécal, pour leur accueil et leur aide très précieuse.

Je tiens aussi à remercier Sclérodemie-Québec pour la bourse qu'ils m'ont offerte.

Enfin, je voudrais remercier mes parents ainsi que Stéphanie qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ces deux années. Merci aussi à Andréanne et Maxime, qui ont bien voulu prendre du temps pour corriger mes fautes de français.

Introduction

Le système immunitaire

Le système immunitaire tient un rôle majeur dans notre protection contre les bactéries, virus et autres pathogènes. L'un de ces systèmes, l'immunité innée, représente une première ligne de défense qui n'est toutefois pas spécifique, mais très rapide. L'immunité adaptative, quant à elle, est un mécanisme de protection spécifique, mais lent qui met en place la production de cellules effectrices permettant une défense plus ciblée.

Les lymphocytes T et B sont parmi les principaux intervenants du système immunitaire. Les lymphocytes T se développent dans le thymus, où a lieu la maturation de leurs récepteurs (TCR). Suite à la sélection positive, les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ peuvent reconnaître un peptide lorsqu'il est présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi. Toutefois, lors de la sélection négative, si un thymocyte reconnaît trop fortement un peptide du soi, il sera éliminé par apoptose grâce aux macrophages et aux cellules dendritiques. Ces deux processus servent à apporter aux TCR la restriction au CMH du soi ainsi que la tolérance au soi (Janeway *et al.*, 2003). C'est durant cette sélection que les antigènes du soi sont exposés de façon à construire un répertoire de cellules T. En plus, des protéines ubiquitaires, des protéines périphériques sont exprimées dans le thymus (Derbinski *et al.*, 2001). Le facteur de transcription *autoimmune regulator* induit l'expression de gènes ectopiques dans les cellules épithéliales médullaires du thymus (Anderson *et al.*, 2002). Il est possible que ces dernières jouent un rôle majeur dans l'établissement de la tolérance au soi en éliminant les cellules T autoréactives ou encore en créant des cellules T immunorégulées (Yano *et al.*, 2008).

Ce mécanisme de tolérance centrale est complété par divers autres mécanismes permettant de maintenir la tolérance au soi. De nombreux antigènes ne sont pas suffisamment exprimés pour être reconnus par les cellules T et coexistent ainsi sans que ces dernières soient affectées, il s'agit de l'ignorance immunologique. Un autre mécanisme consiste en l'absence de signaux de costimulation des cellules présentatrices d'antigènes

(CPA), les cellules T deviennent alors anergiques et ne peuvent plus induire de réponses immunitaires. Il existe aussi des cellules T régulatrices qui permettent la suppression des cellules T autoréactives. Finalement, les CPA de même que les cellules dendritiques sont aussi impliquées dans les mécanismes de tolérance au soi puisqu'elles peuvent présenter des épitopes processés en absence de molécules de costimulation menant à la délétion ou à l'anergie (Janeway *et al.*, 2003).

Les mêmes mécanismes de tolérance au soi sont présents dans la moelle osseuse lors de la maturation des lymphocytes B, responsables de l'immunité humorale en produisant des anticorps.

Il arrive cependant que l'état de tolérance soit rompu. Il peut alors se développer des maladies autoimmunes. Les cellules T autoréactives ou les autoanticorps (aAc) s'attaquent ainsi à l'organisme. Les maladies autoimmunes peuvent être spécifiques à un organe comme c'est le cas du diabète de type I, ou systémique, lorsque l'antigène est ubiquitaire (Janeway *et al.*, 2003). La sclérose systémique (SSc) ou sclérodermie fait partie de cette deuxième catégorie.

La sclérose systémique

La SSc est une maladie autoimmune généralisée. Elle est caractérisée par un épaississement et un attachement du tissu conjonctif de la peau et des organes internes de façon pathologique. Les principaux organes atteints sont la peau, les poumons, les reins, le tractus gastro-intestinal et le cœur. La cause de la SSc est toujours inconnue à ce jour. Toutefois, il semble s'agir d'une maladie multifactorielle. En effet, des altérations du système immunitaire ainsi que des facteurs génétiques et environnementaux pourraient être à l'origine de la maladie, mais cela demeure incertain (Chifflet *et al.*, 2008). Cependant, il est clair que les cellules du système immunitaire, de même que les fibroblastes, sont

impliqués dans la maladie. Les cytokines relâchées par les cellules inflammatoires recrutées dans les tissus conjonctifs activent les fibroblastes et provoquent un dépôt excessif de matrice extracellulaire (MEC) et de la fibrose dans les organes cibles (Hénault *et al.*, 2004).

Épidémiologie

Il semble que la SSc touche en majorité les femmes, tout comme beaucoup d'autres maladies rhumatoïdes autoimmunes. En effet, le ratio femme : homme varie de 3 : 1 à 14 : 1 (Chiffhot *et al.*, 2008). Au Québec ce ratio est de 6 : 1 (Scussel-Lonzetti *et al.*, 2002). La SSc se déclare habituellement entre 30 et 50 ans, mais il existe quelques cas où la maladie se déclare durant l'enfance ((Hochberg *et al.*, 2008).

Selon des études épidémiologiques, l'incidence de la SSc au niveau international varie de 3.7 à 22.8 nouveaux cas par million d'individus par année (Clements & Furst, 2004). La prévalence de la SSc varie aussi selon les populations qui sont étudiées. Au Japon, au Royaume-Uni et en Islande la prévalence est respectivement de 38, 31 et 71 cas par million d'individus (Silman *et al.*, 1988 ; Tamaki *et al.*, 1991 ; Geirsson *et al.*, 1994). En Australie la prévalence générale est de 86 cas par million d'individus, toutefois dans le sud du pays elle augmente jusqu'à 233 cas par million d'individus (Englert *et al.*, 1999 ; Roberts-Thomson *et al.*, 2001). Un phénomène semblable a lieu également aux États-Unis. La prévalence y varie selon la région de 138 à 286 cas par million d'individus jusqu'à atteindre 660 chez les Indiens Choctaw résidant en Oklahoma (Michet *et al.*, 1985 ; Maricq *et al.*, 1989 ; Arnett *et al.*, 1996 ; Mayes *et al.*, 1996).

Il semble que certains groupes raciaux soient plus atteints que d'autres. En plus des Indiens Choctaw, les Afro-Américains sont atteints plus jeunes et plus souvent de la forme sévère de la maladie que les Caucasiens (Hochberg *et al.*, 2008).

La grande variation de symptômes et la confusion de la classification de la SSc compliquent le diagnostic de la maladie. Il est par conséquent difficile d'étudier les paramètres épidémiologiques de cette maladie et de comparer les différentes études (Chiffлот *et al.*, 2008). Il semble toutefois qu'il y ait augmentation de l'incidence de la SSc (Allcock *et al.*, 2004).

Des études ont également analysé la mortalité et la survie des patients. Les décès sont plus fréquents chez les personnes diagnostiquées comme atteintes de la SSc que chez les individus sains (Scussel-Lonzetti *et al.*, 2002). La survie, à 9 ans suivant le diagnostic, varie de 39 % à 72 % selon le degré de sévérité de la maladie (Hochberg *et al.*, 2008).

Les effets de la SSc

Au niveau de la peau

La peau est un organe particulièrement touché dans la SSc. Il y a trois phases pathogéniques dans l'évolution de la maladie au niveau de la peau des individus atteints de SSc. Lors de la phase oedémateuse, les doigts enflent, puis à la phase indurative on observe un épaissement et un durcissement de la peau. Lorsque la peau devient tellement épaisse qu'il est impossible de plier les jointures, on parle de sclérodactylie. Cette deuxième phase est lente chez les patients atteints de la forme limitée, elle peut ne se présenter qu'après seulement 15 à 20 ans. Par contre, elle peut se produire en quelques mois chez les personnes atteintes de la forme diffuse. Avec le temps, l'épaississement de la peau fige l'expression faciale. La phase atrophique est caractérisée par un retour à une épaisseur normale de la peau. Toutefois, dans cette dernière phase la peau adhère au gras sous-cutané. L'échelle de Rodnan permet d'évaluer l'atteinte de la peau. Une ulcération de la peau des doigts causée par une ischémie peut aussi être observée. Chez certains patients, il arrive même que cela dégénère en nécrose. Le bout des doigts devenant douloureux, la qualité de

vie de ces gens diminue. Des dépôts de calcium (calcinose) sont aussi observés chez les patients souffrant de la forme limitée de SSc (Clements & Frust, 2004).

Au niveau des poumons

Plusieurs complications majeures au niveau des poumons sont observées chez les patients atteints de SSc. L'hypertension pulmonaire artérielle est une de ces complications. Elle aggrave généralement les cas de SSc limitée. Elle est causée par un épaissement des artères pulmonaires, entraînant une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) et de la capacité vitale forcée (FVC) qui correspond à l'expiration forcée.

La fibrose pulmonaire est une complication commune de la SSc (25 à 90 % des patients en souffrent). Elle s'avère souvent grave et peut entraîner le décès. La fibrose pulmonaire peut être retrouvée dans les deux formes de la maladie, mais elle est beaucoup plus fréquente chez les patients avec la forme diffuse. Une perte importante du volume des poumons est observée chez les personnes souffrant de fibrose pulmonaire. Des macrophages et des lymphocytes peuvent être retrouvés dans l'espace inter-alvéolaire. On observe également une inflammation des alvéoles pulmonaires. La fibrose pulmonaire se détecte par radiographie du thorax, par tomодensitométrie ou à l'aide de test fonctionnel de la capacité pulmonaire (Clements & Frust, 2004).

Autres effets

En plus de la peau et des poumons, d'autres organes sont affectés par la SSc. Parmi ceux-ci, les principaux sont le cœur, les reins et le tractus gastro-intestinal.

Les vaisseaux cardiaques peuvent être sclérosés et, ainsi, mener à la dyspnée, à des palpitations et à de l'arythmie. Les artères et artérioles rénales peuvent être atteintes et provoquer une ischémie locale. La fibrose peut aussi être observée dans le tractus gastro-

intestinal menant à une diminution du péristaltisme ne permettant plus le transit des aliments vers l'estomac et les intestins (Clements & Frust, 2004 ; Hochberg *et al.*, 2008).

Le phénomène de Raynaud accompagne souvent la SSc. Il est causé par une vasoconstriction des artéioles suite à une exposition au froid laissant les extrémités blanches et froides (Clements & Frust, 2004)

Diagnostic

Le *American College of Rheumatology* (ACR) a défini, en 1980, les critères de classification de la SSc. Afin qu'un patient soit diagnostiqué SSc, il doit présenter le critère majeur ainsi que deux ou plus des critères mineurs définis. Le critère majeur consiste en un épaissement de la peau à proximité des articulations métacarpophalangiennes. Parmi les critères mineurs, on retrouve la sclérodactylie, les ulcères ischémiques des doigts et la fibrose pulmonaire bilatérale (Clements & Furst, 2004).

La SSc peut être subdivisée en quatre catégories. La forme limitée, qui implique une atteinte dermique restreinte aux mains ainsi que les symptômes du CREST (calcinose, Raynaud, désordre mobile de l'œsophage, sclérodactylie et télangiectasie). La forme intermédiaire implique une atteinte des membres à proximité des articulations métacarpophalangiennes à l'exception du tronc, tandis que la forme diffuse inclut l'atteinte du tronc. La dernière forme, nommée peau normale, implique la présence du phénomène de Raynaud, d'une manifestation vasculaire périphérique et/ou d'une atteinte viscérale. Toutefois, la peau de ces patients n'est pas atteinte (Scussel-Lonzetti *et al.*, 2002).

De plus, le ACR a reconnu l'utilisation de deux autoanticorps (aAc) sériques pour la classification de la SSc. Les anticorps anticentromères et les anticorps antitopoisomérase I. Le premier est associé à une forme limitée, tandis que le second est associé à une forme diffuse de la SSc (Clements & Furst, 2004).

Les autoanticorps

Chaque maladie autoimmune systémique est caractérisée par un groupe d'aAc. Ces derniers peuvent aider au diagnostic et au pronostic par leurs présences ou leurs absences. Ils possèdent un trait commun, tous les aAc sont dirigés contre des antigènes nucléaires (Harris & Rosen, 2003). Plusieurs aAc sont spécifiques à la SSc (Tableau 1).

aAg nucléaires

Ce groupe d'aAc est le plus important pour le diagnostic des patients. On les détecte généralement par immunofluorescence indirecte. Les substrats cellulaires les plus utilisés en raison de leurs sensibilités accrues pour la détection des antigènes nucléaires sont les cellules épithéliales HEp-2. Chaque type d'aAc présente un patron de liaison unique. On retrouve les aAg nucléaires dans 75 % à 95 % des sérums de patients atteints de la SSc (Ho & Reveille, 2003). Les divers types d'aAg nucléaires ne se retrouvent simultanément chez un patient que très rarement (Dick *et al.*, 2002).

Anticorps anticentromère (ACA)

Les ACA sont des anticorps dirigés contre les protéines centromériques (CENP), principalement la CENP-B. On les retrouve chez 20 à 30 % des patients atteints de SSc, selon leur ethnicité. Ils sont très rarement retrouvés chez les individus sains. Leur présence est souvent associée à la forme limitée de la SSc, donc à un meilleur pronostic (Ho & Reveille, 2003).

Tableau 1. Autoanticorps présents dans la SSc

Autoantibodies in systemic sclerosis		
Autoantibody	Prevalence in SSc	Clinical and serologic associations
Anti-centromere	20–30%	CREST lcSSc ↓Pulmonary fibrosis Pulmonary hypertension
Anti-Scl-70	~15–20%	Mutually exclusive with ACA dcSSc Pulmonary fibrosis and secondary cor pulmonale
Anti-PM-Scl	~3% (Rare in Japanese)	lcSSc PM/SSc overlap
Anti-Th/To	~2–5% (More common in Japanese)	Mutually exclusive with ACA lcSSc ↓Joint involvement ↑puffy fingers, small bowel involvement, hypothyroidism
AFA	~4%	Mutually exclusive with ACA, anti-Scl-70, anti-RNAP
Anti-RNAP	16–22% in patients of African descent 4% in Caucasians	dcSSc Myositis, pulmonary hypertension, renal disease
Anti-Ku	~20%	dcSSc Anti-RNAP II with ↓Jung function Cor pulmonale unrelated to pulmonary fibrosis
Anti-Ro	Infrequent	Overlap syndrome with scleroderma features
Anti-Sm	Infrequent	Seen in one-third to one-half of SSc patients with sicca complex
Anti-Sm	Rare Lupus nephritis, renal crisis Pulmonary hypertension	SLE overlap

Tableau modifié de Ho & Reveille, 2003

Anti-ARN polymérase (anti-RNAP)

Les anti-RNAP sont des anticorps dirigés contre les ARN polymérases I à III. On les retrouve chez 20 % des patients atteints de SSc. Leur présence est associée à la forme diffuse de la SSc et à une diminution de la capacité pulmonaire (Ho & Reveille, 2003).

Anti-Th/To

Les anti-Th/To sont des anticorps dirigés contre les composants des complexes ribonucléases MRP et P. On les retrouve chez 2 à 5 % des patients atteints de SSc. Ils ne sont pas retrouvés chez les individus sains. Leur présence est spécifiquement associée à la forme limitée de la SSc (Ho & Reveille, 2003).

Anti-ADN topoisomérase I (anti-topo)

Les anti-topo sont dirigés contre l'ADN topoisomérase I. Précédemment, les anti-topo étaient détectés par diverses méthodes, la double immunodiffusion et l'immunobuvardage (Walker & Fritzler, 2007). Cependant, les diagnostics cliniques sont maintenant réalisés par ELISA. Cette technique est en effet beaucoup plus sensible et spécifique que les deux autres (Hildebrandt *et al.*, 1990). Il est toutefois important de corroborer le résultat à l'aide d'un test fait par immunofluorescence indirecte. Les anti-topo sont détectables selon un patron moucheté qui leur est propre (Ho & Reveille, 2003).

On retrouve les anti-topo chez 15 à 20 % des patients atteints de SSc (Ho & Reveille, 2003). Les anti-topo sont exclusifs des autres aAg nucléaires. En effet, moins de 5 % des patients possèdent à la fois les anti-topo et les ACA (Dick *et al.*, 2002). Dans de très rares cas, des anti-topo ont été retrouvés chez des patients souffrant de lupus érythémateux systémique (SLE) (Ho & Reveille, 2003).

Environ 40 % des patients possédant des anti-topo souffrent de la forme diffuse de la maladie. Il semble que la présence des anti-topo soit associée à la fibrose pulmonaire, de même qu'à une mortalité accrue (Ho & Reveille, 2003 ; Senécal *et al.*, 2005).

En effet, il existe une corrélation des titres d'IgG anti-topo et de la sévérité de la maladie. Pour évaluer la sévérité de la maladie, on utilise le score Rodnan qui mesure l'atteinte de la peau (Hu *et al.*, 2003 ; Walker & Fritzler, 2007). De plus, les personnes initialement positives aux anti-topo tendent à le demeurer dans le temps (Ho & Reveille, 2003). Il existe cependant quelques cas où la présence d'anti-topo est devenue négative, ce qui s'accompagne d'une fibrose pulmonaire moins progressive, d'une atteinte cutanée plus légère et d'un meilleur taux de survie (Kuwana *et al.*, 2000a ; Hu *et al.*, 2003).

Une étude de Vazquez-Abad *et al.* en 1997 a permis de constater que toutes les sous-classes d'IgG sont présentes parmi les anticorps anti-topo. Ceci suggère que les lymphocytes B soient activés par une voie impliquant les lymphocytes T (Kuwana *et al.*, 1995). Une étude subséquente de Kuwana *et al.* publiée en 2000 dans *The Journal of Immunology* a démontré que la production des anti-topo nécessite l'expression de cytokines, soit les interleukines (IL) 2 et 6. Il semble que les lymphocytes Th1 et Th2, qui sont une source d'IL-2 et d'IL-6, agissent de façon synergique dans l'activation des lymphocytes B.

Les cellules T autoréactives retrouvées chez les individus atteints de SSc sont également retrouvées chez des individus sains. Toutefois, il semble que les lymphocytes T autoréactifs, spécifiques à la topo, faisant partie du répertoire normal des lymphocytes T, sont dirigés contre des épitopes différents (Kuwana *et al.*, 1997 ; Veeraraghavan *et al.*, 2004). Ceci suggère que les anticorps anti-topo ne sont pas dus à une anomalie intrinsèque aux cellules T ou à une défaillance dans le mécanisme de tolérance au soi (Kuwana *et al.*, 1997).

Il semble que les portions de la topo reconnues par les anti-topo varient selon les différents contextes ethniques (Kuwana *et al.*, 1999a). Ceci suggère que les aAc anti-topo sont hétérogènes et polyclonaux. Les principaux épitopes reconnus se situent dans la partie C-terminale de la topo. Un épitope immunodominant reconnu par les aAc anti-topo se situe entre les a.a. 489 et 573 de la topo (Kuwana *et al.*, 1999b).

Il a été démontré que la topo relâchée par les cellules endothéliales en apoptose peut se lier directement à la surface cellulaire des fibroblastes, suivie des aAc anti-topo (Hénault *et al.*, 2004 ; Hénault *et al.*, 2006). Ceci pourrait expliquer comment un aAc dirigé contre une protéine intranucléaire peut causer des dommages cellulaires. Il est donc possible que des aAc anti-topo puissent induire l'activation des fibroblastes. Ainsi, les fibroblastes anormalement activés dans le contexte d'une SSc contribueraient à la fibrose en produisant une quantité excessive de collagène (Walker & Fritzler, 2007).

La fibrose

Une des complications majeures qui accompagnent la sclérose systémique est la fibrose (Hesselstrand *et al.*, 1998 ; Derk & Jimenez, 2003). Elle constitue une accumulation et une contraction anormale de la MEC (Scheja *et al.*, 1993 ; Chen *et al.*, 2008). Des recherches ont permis de constater que les fibroblastes de patients atteints de SSc présentent des caractéristiques différentes des fibroblastes d'individus normaux (Clements & Furst, 2004).

Il est connu que les fibroblastes normaux sécrètent du collagène, un composant principal de la MEC (Clements & Furst, 2004). Toutefois, il semble que les fibroblastes provenant de patients atteints de SSc synthétisent une plus grande quantité de collagène que les fibroblastes d'individus sains (LeRoy, 1972). Leurs incapacités à réguler la production de MEC suggèrent qu'un autre mécanisme entre en jeu (Varga & Bashey, 1995). D'ailleurs,

la production de MEC est considérée comme une fonction des fibroblastes activés, aussi appelés myofibroblastes (LeRoy, 1972). Le mécanisme d'activation des fibroblastes n'est pas encore complètement compris à ce jour, mais certaines cytokines profibrotiques telles que le TGF- β jouent un rôle dans la fibrose chez les patients atteints de SSc (Skhirtladze *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que les fibroblastes de patients atteints de SSc présentent une surexpression du récepteur pour le TGF- β comparativement aux fibroblastes de patients sains (Kubo *et al.*, 2002). Skhirtladze et son équipe ont démontré que ces cytokines peuvent activer les kinases de la famille Src qui sont impliquées dans l'adhésion des fibroblastes. En effet, ces kinases régulent et activent la kinase d'adhésion focale (FAK) qui transmet le signal des intégrines permettant l'adhésion des fibroblastes à la MEC. FAK est aussi associée à la fibrose, car elle induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.

Le TGF- β contribue aussi à la fibrose en empêchant l'expression du gène des métalloprotéinases de type 1 de la matrice (MMP-1) dans les fibroblastes. Les MMP-1 étant responsables de la dégradation et du remodelage de la MEC, cela favorise l'accumulation de celle-ci (Yuan & Varga, 2001 ; Schultz & Wsocki, 2009). Le TGF- β stimule aussi la production d'inhibiteur de protéase tel que l'inhibiteur de MMP-1 (Hasegawa *et al.*, 2005). Il provoque donc un déséquilibre entre la production et la destruction de MEC, contribuant à la fibrose des tissus. Le TGF- β peut également induire le facteur de croissance de tissus conjonctifs, une autre cytokine, qui peut induire l'expression de protéines de la MEC et moduler la croissance des fibroblastes (Ihn, 2002). Le TGF- β peut donc être considéré comme un acteur clé de la fibrose dans la SSc.

D'autres types cellulaires, en plus des fibroblastes, sont impliqués dans la fibrose chez les patients SSc, tels que les cellules endothéliales, les monocytes et les lymphocytes. En effet, ces types cellulaires produisent des cytokines qui induisent la fibrose (Tamby *et al.*, 2003). Les lymphocytes Th1 et Th2 sécrètent différentes cytokines. Les Th1 sécrètent des cytokines favorisant l'immunité cellulaire et empêchent la production de collagène par

les fibroblastes. Les Th2 quant a elles, secrètent des cytokines favorisant l'immunité humorale et la production d'aAc par les lymphocytes B. Les cytokines sécrétées par les Th2 stimulent aussi la synthèse du collagène par les fibroblastes (Hasegawa *et al.*, 2005). Chez les individus atteints de SSc, l'équilibre entre les Th1 et les Th2 est rompu avec une prépondérance des Th2 favorisant ainsi la production de collagène menant à la fibrose (Wynn, 2004). De plus, les lymphocytes B activés produisent des cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-10 favorisant aussi la différenciation des lymphocytes T en Th2 (Hsieh *et al.*, 1992 ; Rincon *et al.*, 1997). L'IL-6 peut également induire directement la fibrose (Hasegawa *et al.*, 2005). La figure 1 présente le modèle expliquant la fibrose chez les personnes atteintes de SSc.

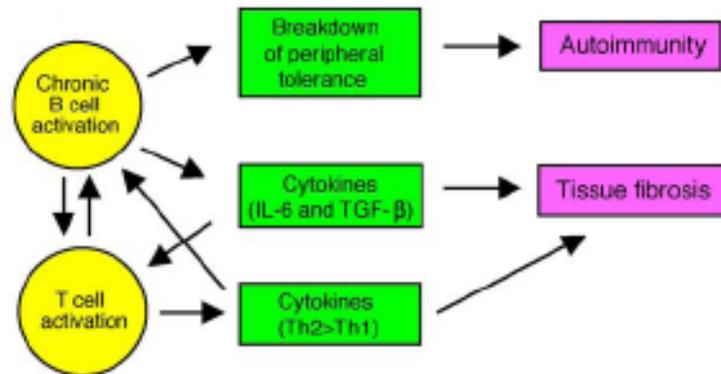


Figure 1. Modèle de la fibrose des tissus dans la SSc.

Les lymphocytes B activés produisent des cytokines qui activent, à leur tour, les lymphocytes T. Les lymphocytes T produisent alors majoritairement des cytokines Th2 qui activent aussi les lymphocytes B. Les lymphocytes B et T interagissent également pour s'activer mutuellement. Les cytokines produites par ces cellules amènent ensuite la fibrose des tissus. Figure modifiée de Hasegawa *et al.*, 2005.

La matrice extracellulaire

Dans un organe donné, les cellules occupent un certain volume, mais le reste est comblé par un réseau de macromolécules que l'on nomme MEC (Lin & Bissell, 1993). Il s'agit d'un arrangement organisé et dynamique qui procure un soutien structurel aux cellules et aux tissus (Clements & Furst, 2004). Elle procure également un cadre pour l'adhésion cellulaire. De plus, la MEC permet la communication avec la surface cellulaire (Tanzer, 2006).

La MEC est composée d'une grande variété de molécules pouvant être regroupées en quatre classes : les protéines structurales, les glycoprotéines adhésives, les glycosaminoglycanes et les protéines matricellulaires. Ces molécules sont sécrétées par les cellules (Schultz & Wisocki, 2009). Toutefois, le composant principal de la MEC est le collagène (Clements & Furst, 2004). La MEC possède plusieurs caractéristiques importantes. Elle est, entre autre, inextensible et résistante grâce à la présence de macromolécules fibreuses telles que les collagènes. Les tissus nécessitant de l'élasticité comportent des fibres élastiques formées d'élastine (Tanzer, 2006). Les glycoprotéines, telles que la fibronectine, la vitronectine et la laminine permettent l'adhérence des cellules à la MEC (Lin & Bissell, 1993 ; Adams, 2001). Parmi les glycosaminoglycanes, on retrouve les héparanes sulfates. Finalement, parmi les protéines matricellulaires on retrouve la thrombospondine 1 (Schultz & Wisocki, 2009).

Les macromolécules de la MEC sont multifonctionnelles (Hohenester & Engel, 2002). Elles sont reconnues par les intégrines et les autres récepteurs cellulaires, elles peuvent s'oligomériser, elles sont reconnues par les MMP et elles peuvent former diverses interactions intramatrices (Tanzer, 2006). Il est suggéré que les interactions des molécules de la matrice avec elles-mêmes et avec la surface cellulaire soient impliquées dans la régulation de la différenciation fonctionnelle des cellules (Lin & Bissell, 1993).

Collagène de type-1

Les collagènes sont des composants majeurs de la MEC (Erat *et al.*, 2009). Ils sont formés de trois chaînes polypeptidiques organisées en une triple hélice, caractérisées par la présence de séquences Gly-X-Y répétées. L'association des chaînes polypeptidiques permet de former vingt-huit types de collagènes différents (Leitinger & Hohenester, 2007). Parmi ceux-ci, les collagènes fibrillaires, soit les collagènes de type I, II et III, représentent 70 % du collagène contenu dans les tissus. D'ailleurs, le collagène de type-1 est omniprésent dans les tissus du corps (Clements & Furst, 2004). Les collagènes fibrillaires, de même que les autres collagènes, possèdent un domaine de liaison aux cellules, il s'agit de la répétition d'une séquence connue de trois a.a., Arg-Gly-Asp (R-G-D) (Kornblihtt & Gutman, 1988). Par contre, il semble que l'utilisation de peptides R-G-D ne puisse pas inhiber la liaison des cellules au collagène comme c'est le cas pour d'autres protéines comportant cette séquence. Ceci suggère que soit cette séquence n'est pas importante pour les fonctions d'adhésion du collagène aux cellules, soit la conformation de cette séquence dans le collagène est différente (Ruoslahti, *et al.*, 1985). En effet, le collagène est formé d'hélices alors que ce n'est pas le cas d'autres molécules de la MEC telles que la fibronectine.

Les MEC riches en collagène sont importantes pour les propriétés biomécaniques des tissus, mais aussi pour la migration durant la croissance, la différenciation, la morphogenèse et la réparation de blessures (Leitinger & Hohenester, 2007). Toutefois, le rôle principal du collagène dans la MEC demeure structurel (Kornblihtt & Gutman, 1988 ; Schultz & Wisocki, 2009).

Fibronectine

Un autre composant majeur de la MEC est la fibronectine (Erat *et al.*, 2009). La fibronectine est une glycoprotéine adhésive généralement composée de dimères presque identiques reliés en C-terminus par une paire de ponts disulfures (Brown *et al.*, 1993 ; Pankov & Yamada, 2002). Deux formes de fibronectines existent : la fibronectine plasmatique et la fibronectine cellulaire (Brown *et al.*, 1993). Ces deux formes proviennent d'un épissage alternatif différent. La fibronectine cellulaire possède trois régions supplémentaires à la fibronectine plasmatique. Il s'agit des *extra domains* A et B et de la région variable V. La fibronectine plasmatique est considérée comme non active, tandis que la majorité des activités de la fibronectine sont attribuées à la forme cellulaire (Pankov & Yamada, 2002).

La fibronectine possède, elle aussi, un domaine de liaison aux cellules, soit la séquence R-G-D mais, contrairement au collagène, l'utilisation de peptides R-G-D inhibe la liaison des cellules à la fibronectine (Ruoslahti, *et al.*, 1985 ; Kornblihtt & Gutman, 1988). Un domaine de liaison à l'héparine est aussi présent sur la fibronectine, ce qui n'est pas le cas pour le collagène (Kornblihtt & Gutman, 1988).

La fibronectine peut agir comme ligand pour les intégrines qui relient la MEC au cytosquelette des cellules (Pankov & Yamada, 2002). Elle joue aussi un rôle important dans l'embryogenèse, la thrombose et la réparation de blessures (Erat *et al.*, 2009).

Thrombospondine

Un autre composant de la MEC est la thrombospondine, une protéine matricellulaire multimérique. Il existe plusieurs formes de thrombospondine. La thrombospondine-1 est, quant à elle, formée de trois monomères (Adams, 2001). Les thrombospondines possèdent, elles aussi, un domaine de liaison aux cellules et un domaine de liaison à l'héparine. Le domaine de liaison aux cellules est composé de la séquence R-G-D (Kornblihtt & Gutman, 1988).

Les thrombospondines ont un rôle de régulation cellulaire durant la genèse et la réparation de blessures (Tan *et al.*, 2006). Elles jouent aussi un rôle dans la motilité, la régulation du cytosquelette, la prolifération, l'apoptose et l'adhésion cellulaire (Adams, 2001).

Laminine

La membrane basale est une mince section spécialisée de la MEC dont la laminine est le composant principal (Miner, 2008). La membrane basale joue un rôle structurel et informationnel (Har-El & Tanzer, 1993).

La laminine est une glycoprotéine adhésive hétéromérique composée de trois chaînes. Il y a trois types de laminine : cruciforme, en forme d'Y et en forme de tige (Miner, 2008). La laminine possède des domaines de liaison aux cellules et à l'héparine. Par contre, elle possède deux types de domaines de liaison aux cellules, soit la séquence R-G-D, mais aussi une autre séquence, soit Y-I-G-S-R (Kornblihtt & Gutman, 1988 ; Buzza *et al.*, 2005).

Plusieurs récepteurs à la surface cellulaire ont été identifiés pour la laminine, parmi ceux-ci, des intégrines et des héparanes sulfates (HS) (Miner, 2008). La laminine joue un rôle important dans plusieurs processus biologiques tels que l'adhésion cellulaire, la

migration, la mitogenèse, la croissance et la différenciation (Har-El & Tanzer, 1993). Elle est aussi impliquée dans les processus de réparation de blessures (Kornblihtt & Gutman, 1988).

Vitronectine

La vitronectine est également une glycoprotéine adhésive qui fait partie de la MEC. Elle est composée de deux chaînes polypeptidiques (Kornblihtt & Gutman, 1988). La vitronectine se retrouve dans le plasma et dans la MEC, comme la fibronectine. Elle possède un domaine de liaison aux cellules, soit la séquence R-G-D (Cherny *et al.*, 1993). Comme pour la fibronectine, l'utilisation de peptides R-G-D inhibe la liaison des cellules à la vitronectine (Ruoslahti, *et al.*, 1985). La vitronectine possède aussi un domaine de liaison à l'héparine (Kornblihtt & Gutman, 1988).

La vitronectine interagit avec les intégrines présentes à la surface des cellules. (Cherny *et al.*, 1993). Elle joue aussi un rôle dans les mécanismes de défense humorale et dans l'invasion cellulaire (Preissner, 1991). Un rôle dans la réparation de blessures a aussi été suggéré (Kornblihtt & Gutman, 1988).

Structurellement, une chose différencie le collagène des quatre autres protéines de la MEC présentées. Le collagène comporte des hélices dans sa structure, alors que ce n'est pas le cas pour les autres molécules. La fibronectine, la laminine, la thrombospondine et la vitronectine partagent aussi la présence de domaines de liaison à l'héparine, ce qui n'est pas le cas du collagène.

Les héparanes sulfates

Comme il a été mentionné, les composants de l'environnement extracellulaire, c'est-à-dire de la MEC, peuvent influencer certaines fonctions biologiques des cellules telles que la prolifération et le changement de forme. Ceci est possible grâce aux récepteurs à la surface cellulaire. Les HS sont souvent utilisées pour transmettre les signaux dans les cellules (Bernfield *et al.*, 1999). Ils sont structurellement hétérogènes et lient un grand répertoire de protéines (Bernfield *et al.*, 1999 ; Mahalingam *et al.*, 2007). Les HS sont retrouvés principalement sur deux familles de protéoglycanes liées à la membrane (Couchman, 2003). Il s'agit des syndécanes et des glypicanes (Bernfield *et al.*, 1999). Les protéoglycanes héparanes sulfates (HSPG) sont abondants à la surface des cellules adhérentes de mammifères (Subramanian *et al.*, 1997).

Les HSPG à la surface cellulaire peuvent catalyser la rencontre des ligands protéiques extracellulaires avec leurs récepteurs par la formation d'un complexe protéine-HS (Park *et al.*, 2000). En effet, les HS facilitent l'interaction des protéines de la MEC comme la fibronectine avec leurs récepteurs puisqu'ils permettent de concentrer les récepteurs de signalisation ensemble (Park *et al.*, 2000 ; Tkachenko *et al.*, 2005). L'interaction des HSPG et des protéines de la MEC est essentielle pour le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de la migration et de l'adhésion (Stringer & Gallagher, 1997). Les HSPG permettent aussi l'adhésion entre cellules et avec la MEC. Il semble que les HSPG se lient principalement à un site secondaire, plutôt qu'au récepteur principal sur les molécules d'adhésion cellulaire, augmentant ainsi la force et la stabilité des adhésions intercellulaires dues au récepteur principal. Toutefois, pour l'interaction avec la MEC, il semble que les HSPG agissent plutôt comme corécepteurs. Ils provoquent le réarrangement du cytosquelette et du phénotype d'adhésion (Bernfield *et al.*, 1999). Une autre fonction des HS est leur capacité à activer les facteurs de croissance. Ils favorisent leur oligomérisation à la surface cellulaire, mais induisent aussi un changement conformationnel leur permettant d'agir comme un ligand de haute affinité pour leurs

récepteurs situés sur la même cellule ou sur les cellules avoisinantes. (Stringer & Gallagher, 1997). Ils jouent aussi un rôle dans la réparation de blessures (Mahalingam *et al.*, 2007).

De façon générale, l'héparine, un analogue des HS, est utilisée au lieu de ceux-ci lors d'expériences (Bernfield *et al.*, 1999).

Mécanisme de réparation de blessures

Lorsqu'une blessure survient, il y a initiation et coordination de la réponse de réparation afin de prévenir les infections et de rétablir l'intégrité du tissu (Bucala *et al.*, 1994). Ce mécanisme comporte plusieurs phases et implique une régulation précise de celles-ci (Morgan *et al.*, 2007).

Il y a d'abord formation d'un caillot. Il s'agit de plaquettes intégrées dans un réseau de fibres de fibrine avec de petites quantités de fibronectine plasmatique, de vitronectine et de thrombospondine. Le caillot sert à protéger temporairement les tissus endommagés et contient des cytokines et des facteurs de croissance qui permettent de recruter des cellules inflammatoires au site de la blessure. La deuxième phase consiste en l'infiltration de cellules inflammatoires telles que les neutrophiles et les macrophages. Les neutrophiles arrivent au site en quelques minutes et détruisent les bactéries. Ils sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires qui permettront d'activer les fibroblastes et les kératinocytes qui sont à proximité. Les macrophages arrivent quelques jours plus tard, puis phagocytent les neutrophiles, les microorganismes pathogènes et les débris de MEC et de cellules. Les macrophages activés produisent ensuite des cytokines et des facteurs de croissance (Martin, 1997). Les fibroblastes et les cellules endothéliales sont ensuite recrutés au site de la blessure et commencent à proliférer afin de reformer le tissu conjonctif et de créer de nouveaux vaisseaux sanguins (Fears & Woods, 2006). Par la suite, il y a contraction du tissu conjonctif, rapprochant les bords de la blessure. Ceci facilite la dernière phase, la

réépithélisation. Il s'agit donc de recouvrir la blessure par une monocouche de kératinocytes qui s'attachent à la membrane basale et prolifèrent (Martin, 1997 ; O'Toole, 2001). La laminine contenue dans la membrane basale permet l'ancrage des kératinocytes et en régule aussi la prolifération (Jones *et al.*, 2000).

Il a aussi été démontré que d'autres composants de la MEC dont la fibronectine et la vitronectine permettent, quant à elles, la migration des kératinocytes jusqu'au site de la blessure (O'Toole, 2001). D'autre part, la fibronectine est également essentielle à la migration des fibroblastes lors du processus de réparation de blessures. Il semble que les fibroblastes se lient, entre autres, aux domaines de liaison cellulaire R-G-D et aux domaines de liaison à l'héparine présents sur la fibronectine afin de migrer (Clark *et al.*, 2003).

La migration et la prolifération des cellules sont donc assurées par des interactions avec la MEC. Ces interactions sont réalisées grâce à des récepteurs de surface cellulaire qui procurent aux cellules des informations quant à leur position et initient le signal de transmission intracellulaire (Elenius *et al.*, 1991). Les intégrines et les syndécans, des récepteurs de surface cellulaire, ont donc un rôle à jouer dans la régulation du processus de réparation de blessures (Morgan *et al.*, 2007). Après une blessure, l'expression de syndécane-1 et 4 est transitoirement diminuée dans les kératinocytes migrant vers la blessure, tandis qu'elle est augmentée dans ceux proliférant dans ou à proximité de la blessure (Bernfield *et al.*, 1999 ; Fears & et Woods, 2006). L'expression de syndécans-1 et 4 semble aussi augmentée chez les cellules du derme, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Alexopoulou *et al.*, 2006). Le syndécane-1 est principalement impliqué dans les fonctions de prolifération et de migration des kératinocytes, donc dans la réépithélisation, tandis que le syndécane-4 semble majoritairement associé à la migration des fibroblastes, à la contraction de la plaie et à l'angiogenèse (Morgan *et al.*, 2007).

Le TGF- β est aussi un agent régulateur du processus de réparation de blessure. Il est relâché par les plaquettes durant leur agrégation, puis les fibroblastes et les kératinocytes en produisent, de même que les macrophages. Le TGF- β peut stimuler l'expression d'intégrines par les fibroblastes et les kératinocytes. Ces derniers utilisent les intégrines dans leurs processus de locomotion (Gailit *et al.*, 1994). Les intégrines influencent aussi la prolifération et la différenciation des kératinocytes (Hertle *et al.*, 1995).

Normalement, suite à la restauration de la plaie, le processus de réparation de blessure cesse; toutefois, il arrive que le processus devienne hors de contrôle et provoque ainsi la fibrose des tissus impliqués, ce qui peut même mener à une perte de leurs fonctions (Wynn, 2007 ; Tager *et al.*, 2008). Une activation soutenue des voies de signalisation du TGF- β , un médiateur clé du processus de fibrose, pourrait expliquer le processus de réparation de blessure pathologique dans la SSc (Hoyles *et al.*, 2008). Les fibroblastes peuvent aussi jouer un rôle dans les pathologies associées à la fibrose telles que la SSc si leur activation est maintenue plus longtemps que nécessaire durant le processus de réparation de blessure (Bucala *et al.*, 1994).

Les autoantigènes

Le rôle primaire des autoantigènes (aAg) est d'alerter le système immunitaire des dommages survenus aux tissus afin de faciliter les réparations. Par contre, lors de bris de tolérance aux antigènes du soi il en résulte des maladies autoimmunes, telles que la SSc (Oppenheim *et al.*, 2005).

Deux hypothèses existent pour expliquer les bris de tolérance aux aAg. La première est le mimétisme moléculaire, qui joue un rôle dans les mécanismes normaux de reconnaissance des molécules du soi et du non-soi (Lim & Zouali, 2006). La seconde est l'*epitope spreading*.

Selon la première hypothèse, un agent infectieux immunologiquement similaire à un aAg déclencherait une réaction immunitaire et briserait donc la tolérance face à cet aAg (Albert & Inman, 1999). Selon la deuxième hypothèse, les bris de tolérance pourraient être provoqués par le glissement d'une réponse immunitaire dirigée contre un épitope vers un autre épitope du même antigène ou d'un autre antigène (Mahler *et al.*, 2002). Un exemple d'*epitope spreading* existe pour la SSc. En effet, l'homologie avec un épitope de l'histone H3 a privilégié l'apparition d'anticorps contre la CENP-A (Akbarali *et al.*, 2006).

Suite au bris de tolérance, une réponse *antigen-driven* serait alors initiée et maintenue par un afflux continu d'antigènes (Sakkas & Platsoucas, 2004). Les lymphocytes T, montrant une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation, retrouvés dans la peau et les poumons des personnes atteintes de SSc sont un signe de l'expansion de la réponse *antigen-driven* (Gu *et al.*, 2008). Mais une question demeure : comment ces aAg nucléaires peuvent-ils devenir accessibles pour les cellules du système immunitaire (Hsu *et al.*, 1997)? Trois mécanismes peuvent expliquer la disponibilité des aAg nucléaires pour le système immunitaire.

Premièrement, des vésicules contenant les aAg, dont la topo, peuvent être déchargées par bourgeonnement à l'extérieur des fibroblastes lors d'un relâchement de la tension dans la matrice de collagène (Hsu, *et al.*, 1997).

Deuxièmement, l'apoptose peut libérer des aAg nucléaires normalement inaccessibles tels que la topo. En effet, les aAg nucléaires deviennent disponibles à la surface des cellules lors de la mort cellulaire programmée (Navratil *et al.*, 2004). Ils sont redistribués et concentrés dans les *blebs* (Casciola-Rosen *et al.*, 1994). De plus, durant l'apoptose les protéines sont altérées biochimiquement. Le clivage par les caspases et la phosphorylation sont des exemples de modifications qui peuvent révéler des épitopes cryptiques et rendre les protéines plus immunogènes. Les cellules apoptotiques étant elles-

mêmes très immunogéniques, elles favorisent la phagocytose par les CPA qui présentent ensuite leur contenu aux cellules du système immunitaire (Navratil *et al.*, 2004).

Troisièmement, l'oxydation par les espèces de radicaux oxygénés (ROS) générées lors de la réduction de l'oxygène ou des réactions enzymatiques peut expliquer la disponibilité des aAg tels que la topo (Kurien & scofield, 2008). Des ROS sont aussi produits lors d'ischémie-reperfusion observée dans le phénomène de Raynaud accompagnant souvent la SSc. Des agents chélateurs métalliques tels que le fer et le cuivre sont utilisés pour supprimer les ROS. Cependant, ils sont dommageables pour les cellules, les protéines et l'ADN (Casciola-Rosen *et al.*, 1997). Ces ions métalliques fragmentent les aAg tels que la topo révélant parfois des épitopes cryptiques (Kurien & scofield, 2008). Malgré que ces épitopes représentent le soi, les lymphocytes B en maturation les reconnaissant n'ont pas été éliminés durant la sélection négative. Ils peuvent donc produire des aAc dirigés contre cet aAg. Plusieurs aAg sont disponibles dans le sérum, de façon exclusive, chez les individus atteints de sclérodémie. Parmi ceux-ci, les plus fréquents sont la CENP-B et la topo (Ho & Reveille, 2003).

La ADN-topoisomérase I

La topo est une enzyme ubiquitaire impliquée dans plusieurs processus cellulaires (Baker *et al.*, 2009). Elle fait partie de la sous-famille 1B et son numéro de classification est EC 5.99.1.2 (Maul *et al.*, 1989 ; Baker *et al.*, 2009). Le gène codant cette enzyme est situé sur le chromosome 20 en position q11.2-13.1.

Structure

La topo humaine est une protéine de 765 acides aminés (a.a.) dont la masse moléculaire théorique est de 91 kDa. Cependant, la migration sur un gel de polyacrylamide montre plutôt une masse apparente de 100 kDa. Cette enzyme peut être divisée en quatre domaines (Stewart *et al.*, 1996a).

Le domaine N-terminal (a.a. 1 à 214) n'est pas indispensable à l'activité enzymatique de la topo. Ce domaine comprend des signaux de localisation nucléaire et des sites pour l'interaction avec des protéines cellulaires telles que la nucléoline, la p53 et l'antigène T du virus simien 40 (Champoux, 2001).

Le second domaine correspond aux a.a. 215 à 635. Il s'agit d'une séquence de 421 a.a. hautement conservée parmi les topoisomérases (Champoux, 2001). Ce domaine se subdivise en trois sous-domaines. Les sous-domaines I et II (a.a. 215 à 433) forment le « couvercle » de l'enzyme (Redinbo *et al.*, 1998). Le sous-domaine III (a.a. 434 à 635), qui comprend tous les résidus du site actif de l'enzyme (Arg 488, Lys 532, Arg 590, His 632, sauf Tyr 723) est exposé à la surface de l'enzyme (Redinbo *et al.*, 1998 ; Baker *et al.*, 2009). Ce sous-domaine forme la « charnière » de l'enzyme s'ouvrant et se fermant autour de l'ADN pour le clivage. Le sous-domaine III interagit avec le sous-domaine I par deux « lèvres » qui rejoignent une grande hélice α (Redinbo *et al.*, 1998). Le second domaine constitue la cible de la majorité des aAc de patients atteints de SSc (Hu *et al.*, 2004).

Le troisième domaine correspond aux a.a. 636 à 712. Il s'agit d'une séquence peu conservée de 76 a.a. nommée interdomaine qui fait la liaison vers le quatrième domaine. L'interdomaine n'est pas indispensable à l'activité enzymatique de la topo (Champoux, 2001).

Le domaine C-terminal (a.a. 713 à 765) comprend le résidu du site actif Tyr 723 essentiel pour la catalyse (Champoux, 2001). Les autres résidus du site actif assurent la stabilité de l'intermédiaire topo et ADN durant le clivage (Redinbo *et al.*, 1998). L'enzyme brise un lien phosphodiester de l'ADN et forme ainsi un lien temporaire entre la topo et l'ADN via le résidu tyrosine 723 (Stewart *et al.*, 1998). Ce domaine constitue également une cible importante des aAc de patients atteints de SSc (Hu *et al.*, 2004).

Le pore central de la topo est composé principalement d'a.a. chargés positivement créant un potentiel électrostatique positif attirant l'ADN vers le pore. Les résidus du site actif sont contenus dans ce tunnel chargé positivement (Redinbo *et al.*, 1998).

Il est possible de retrouver une activité enzymatique similaire à celle de l'enzyme complète en mélangeant seulement les domaines portant des résidus actifs, c'est-à-dire, le second domaine et le domaine C-terminal. C'est cette structure reconstituée de la topo, en présence d'ADN, qui a servi pour la cristallographie de l'enzyme (figure 2) (Redinbo *et al.*, 1998). Une représentation linéaire de la topo est présentée à la figure 3.

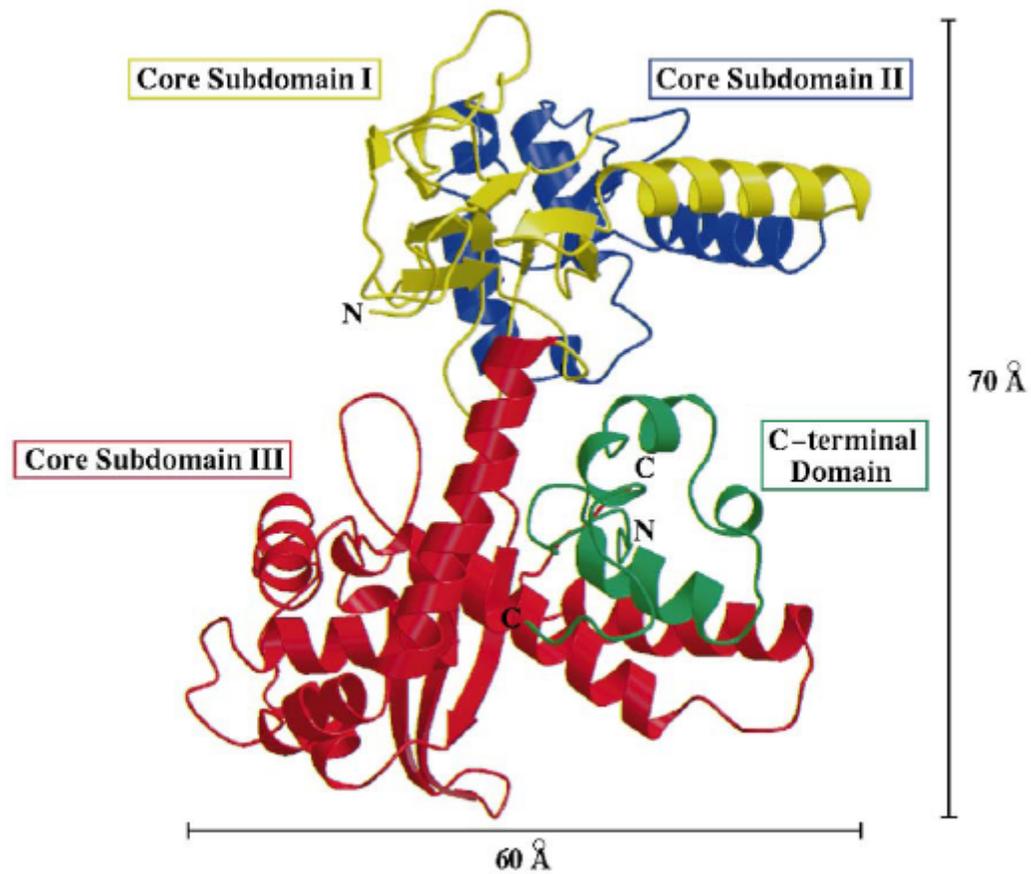


Figure 2. Structure de la topo reconstituée, déduite grâce aux études cristallographiques.

Il s'agit d'une vue perpendiculaire du pore de la topo. La partie centrale de la topo (a.a. 175 à 659), correspondant au second domaine, est divisé en trois sous-domaines I, II et III. Ils sont montrés respectivement en jaune, bleu et rouge. Le domaine C-terminal (a.a. 713 à 765) est représenté en vert. Le second domaine ainsi que le domaine C-terminal sont les principaux domaines ciblés par les aAc anti-topo. L'interdomaine et le domaine N-terminal ne sont pas représentés dans cette cristallographie. La figure est tirée de Redinbo *et al.*, 1998.

Rôle biologique intracellulaire

La topo est une enzyme essentielle impliquée dans plusieurs processus biologiques intracellulaires. Le substrat privilégié de cette enzyme est l'ADN superenroulé (Madden *et al.*, 1995). La liaison de la topo à l'ADN découle de plusieurs interactions protéines-ADN. Ces interactions sont principalement concentrées cinq bases avant le site actif de l'enzyme. La topo semble y avoir une préférence pour la séquence de quatre bases suivante : 5'-(A/T)(G/C)(A/T)(T)-3' (Leppard & Champoux, 2005).

La topo a la capacité de réduire la torsion de l'ADN permettant ainsi aux protéines de s'y lier afin de réaliser sa réplication, sa transcription, sa recombinaison et sa condensation (Wang, 2002). Pour ce faire, la topo catalyse la cassure temporaire d'un brin d'ADN et s'y lie avec un lien covalent en 3'. Ensuite, il y a rotation de l'ADN pour réduire la torsion, puis le lien phosphodiester est rétabli et la topo libérée (Madden *et al.*, 1995). La topo de la famille IB ne nécessite aucun ion Mg^{2+} , ni d'ATP, pour réaliser son activité catalytique. Toutefois, les ions Mg^{2+} stimulent l'activité de la topo et il est probable qu'ils contrôlent le taux de relâchement de l'ADN à la fin du cycle enzymatique (Sissi & Palumbo, 2009).

Puisque la topo est une enzyme essentielle pour plusieurs processus biologiques primordiaux et donc pour la survie des cellules, elle est la cible de plusieurs médicaments contre le cancer. En effet, la camptothécine se lie à l'hybride ADN-topo empêchant le relâchement de l'ADN. La topo ainsi complexée à l'ADN entrave alors sa réplication et sa transcription (Leppard & Champoux, 2005).

Épitopes de la topo

Plusieurs études ont été réalisées afin d'identifier les épitopes de la topo qui sont reconnus par les aAc de patients atteints de SSc. Il semble que la majorité des aAc reconnaissent le domaine C-terminal de la topo ainsi que le second domaine (Hu *et al.*, 2004). Il apparaît toutefois qu'une région plus spécifique du second domaine est la cible principale des aAc. En effet, les aAc reconnaissent un épitope immunodominant situé dans la région des a.a. 489 à 573 de la topo. Cet épitope serait conformationnel (Kuwana *et al.*, 1999b).

En 1990, Verheijen *et al.* ont observé qu'un épitope situé dans le domaine C-terminal (a.a. 657 à 765) était reconnu davantage chez les patients en phases avancées de la maladie contrairement aux épitopes situés dans le second domaine de la topo. Kuwana *et al.* ont, quant à eux, identifié un épitope qui serait fortement associé à la progression de la fibrose pulmonaire chez les patients souffrants de SSc. Il s'agit des a.a. 658 à 700 (Kuwana *et al.*, 1993). Rizou et son équipe ont aussi découvert quatre épitopes qui seraient plus fortement associés avec le développement de fibrose pulmonaire lorsqu'au moins trois d'entre eux sont reconnus. Ces quatre épitopes sont situés dans le second domaine de la topo (a.a. 205-224, 349-368, 397-416 et 517-536). De plus, il semble que le dernier des quatre épitopes soit contenu dans l'épitope immunodominant identifié par Kuwana *et al.* en 1999b (Rizou *et al.*, 2000).

Des études supplémentaires de la corrélation entre la réactivité des épitopes et les caractéristiques cliniques des patients dont les sérums reconnaissent ces épitopes pourraient fournir des informations importantes en ce qui concerne le diagnostic des patients (Cram *et al.*, 1993).

Problématique

L'origine de la SSc étant encore à ce jour inconnue, une meilleure compréhension de la maladie permettrait de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques augmentant la survie des personnes atteintes de SSc. Au fil des ans, de nouvelles données ont permis d'élaborer plusieurs hypothèses expliquant les phénomènes impliqués dans la maladie tels que la fibrose, une des complications majeures, qui survient chez les patients dont les sérums sont positifs pour les aAc anti-topo.

Une des caractéristiques de la maladie est la présence d'aAc, dont l'origine n'est pas encore bien comprise. Toutefois, il est maintenant connu que les aAc anti-topo peuvent se lier à la MEC ainsi qu'à la surface des fibroblastes. De plus, il semble que ces aAc peuvent induire le phénotype proadhésif et proinflammatoire observé chez les fibroblastes de patients atteints de SSc. Par contre, la cible des anti-topo à la surface des fibroblastes n'a toujours pas été identifiée, mais, selon notre hypothèse, il pourrait s'agir de la topo elle-même. En effet, bien que la topo soit un aAg nucléaires, plusieurs processus tels que l'apoptose des cellules endothéliales pourraient expliquer sa présence à la surface des cellules (Hénault *et al.*, 2004). De plus, il est d'ailleurs connu que la topo peut se lier lors d'une expérience *in vitro* à la surface des fibroblastes. En effet, il a été montré *in vitro* que la liaison de la topo aux fibroblastes recrute les anti-topo, qui induisent à leur tour l'adhésion et l'activation des monocytes. Toutefois, la protéine ou le complexe de protéines auquel se lie la topo sur la surface des fibroblastes n'a pas encore été identifié (Hénault *et al.*, 2006).

Cette étude vise donc à caractériser les interactions moléculaires de la topo avec les fibroblastes et la MEC. Ainsi, il sera possible d'identifier le ou les domaines de la topo impliqué(s) dans sa liaison aux fibroblastes et à la MEC. De plus, ces résultats pourront être utilisés dans la perspective d'une identification de la cible de la topo sur les fibroblastes.

Matériels et Méthodes

Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et transfert sur nitrocellulose

Les échantillons de lysats bactériens et de fractions de purification ont été dilués dans du tampon d'échantillon contenant du SDS (25 mM Tris pH 6.8, 10 % glycérol, 1 % SDS, 2% β -mercaptoéthanol, 0.25 % bleu bromophénol). Ils ont été dénaturés durant cinq minutes à 100 °C. Le protocole standard de Laemmli a été appliqué pour les électrophorèses en gel de polyacrylamide discontinu (Laemmli, 1970). Après électrophorèse, les gels de 12 % polyacrylamide ont été équilibrés dans une solution de transfert (31 mM Tris pH8.75, 240 mM glycine, 20 % méthanol). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) avec un appareil Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad (quarante-cinq minutes, 25 Volts). Préalablement à l'immunobuvardage, les membranes ont été colorées avec une solution de Ponceau S (3 % acide trichloroacétique, 3 % acide sulfosalicylique et 2 % Ponceau S) pour s'assurer que les protéines avaient bien été transférées.

Les gels de protéines ont été colorés au bleu de Coomassie (Wong *et al.*, 2000). La coloration a été faite pendant deux minutes au four à micro-onde dans une solution de coloration (0.25 % R-250 Coomassie[®] Brilliant Blue (Bio-Rad)), 25 % isopropanol et 10 % acide acétique suivi d'un rinçage à l'eau. Les gels ont été décolorés dans une solution de décoloration (10 % acide acétique) durant deux minutes au four à micro-onde, puis à la température pièce jusqu'à décoloration complète.

Immunobuvardage

Les sites libres des membranes de nitrocellulose ont été bloqués avec une solution saline de tampon Tris (TBS; 50 mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl) additionnée de 5 % de lait écrémé en poudre et de 0.5 % de Tween-20 durant deux heures à température pièce ou seize heures à 4 °C. L'anticorps anti-penta-histidine (1 : 2000) dilué dans la solution de blocage, a été incubé durant une heure à la température de la pièce. Cinq lavages au TBS 0.5 % Tween-20 ont été faits. Par la suite, les membranes ont été incubées pendant une heure avec le tampon de blocage contenant des IgG de chèvre spécifiques aux souris (1 : 75 000) conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (Jackson ImmunoResearch). Les cinq lavages ont été répétés. Les membranes ont été incubées durant cinq minutes avec le substrat SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent (Pierce) et exposées à des HyperFilm ECL (GE healthcare). Les films ont été développés avec un développeur de film de marque Kodak.

Production des fragments de la topo

Fragment topo-DIII

Expression et purification

Un clone de pIVEX2.4b/Nde topo-DIII contenant une queue hexa-histidine positionnée en N-terminus de l'insert dans les bactéries BL21-AI[™] One Shot[®] (Invitrogen) avait été réalisé antérieurement (Tremblay, 2004). Ces bactéries ont le génotype F- *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm araB ::T7RNAP-tetA*. Ces bactéries sont déficientes en protéases *lon* et *OmpT*, ce qui diminue la dégradation des protéines exprimées. L'insertion chromosomique du gène de l'ARN polymérase T7 dans le locus *araB* permet d'en contrôler la régulation grâce au promoteur *araBAD*. La régulation se fait par les sucres

(glucose comme répresseur et L-arabinose comme inducteur), ce qui permet une régulation plus stricte des gènes possiblement toxiques.

Le clone a été repiqué dans une culture de départ qui a été incubée seize heures à 25 °C. Cette culture a été diluée 1 : 25 dans 1 L de milieu *Luria-Bertani* autoclavé (LB; 10 g/L NaCl, 10 g/L tryptone et 5g/L d'extrait de levures, pH 7.0) additionné de carbénicilline (CB; Sigma) à une concentration finale de 100 µg/mL. La culture diluée a été incubée à 30 °C jusqu'à l'atteinte d'une D.O._{600nm} d'environ 0.5. Les bactéries ont été induites avec 0.2 % L-arabinose (Anachemia) durant trois heures à 30 °C. Les cultures bactériennes ont été centrifugées en culots de 250 mL pendant vingt minutes à 4100 X g pour la purification de la topo-DIII recombinante. Les culots ont été congelés à - 80 °C.

Quatre culots bactériens de 250 mL ont été utilisés pour la purification. Les culots ont été suspendus dans le tampon de lyse (6 M guanidine-HCl, 20 mM NaPO₄ et 500 mM NaCl, pH 8.0). Après sonication (cinq cycles de dix secondes intercalés de dix secondes de pause dans un bain de glace), les lysats ont été centrifugés à 20 000 X g durant vingt minutes à 4 °C. Les surnageants ont ensuite été déposés (trente minutes, température pièce) sur une résine de nickel (Ni-NTA His•Bind[®]; Novagen) équilibrée dans un tampon de liaison dénaturant (8 M urée, 20 mM NaPO₄, 500 mM NaCl, 15 mM imidazole, pH 8.0). La queue hexa-histidine des protéines topo-DIII recombinantes s'est liée à cette résine. Deux lavages en conditions dénaturantes avec le tampon de liaison à pH 6.3 ont permis d'éliminer une partie des interactions non spécifiques. Quatre lavages en conditions natives à 20 mM d'imidazole (300 mM NaCl, 50 mM NaPO₄, 20 mM imidazole, pH 8.0), suivis de quatre autres à 40 mM imidazole ont été réalisés afin d'éliminer d'autres interactions non spécifiques et d'aider à la renaturation des protéines. Les fractions ont été récoltées par une élution avec un tampon de conditions natives (300 mM NaCl, 50 mM NaPO₄, pH8.0) contenant l'imidazole à 250 mM.

Pour l'étape de purification par interaction hydrophobe, les fractions d'élution des culots ont été mises en commun, puis leur concentration en NaCl ajustée à 2 M. L'addition de sel augmente l'interaction hydrophobe des protéines sur la matrice. Les échantillons ont été déposés sur une colonne HiTrap Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow de 1 mL (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon de départ (2 M NaCl, 50 mM NaPO₄, 250 mM imidazole, pH 8.0). Un lavage avec le tampon de départ a permis d'éliminer les interactions non spécifiques restantes. Les fractions ont été récoltées avec un tampon d'élution ne contenant pas de NaCl (50 mM NaPO₄, pH 7.0), augmentant ainsi l'effet chaotrope permettant de décrocher les protéines.

Concentration et dosage

Les fractions choisies (environ 10 mL) ont été centrifugées dans un concentrateur Vivaspin 4 (*molecular weight cut-off* de 10 kDa; Vivascience) à 4 °C. Trois lavages ont été faits avec une solution saline de tampon phosphate (PBS) afin de changer le tampon des protéines. Les protéines ont ensuite été centrifugées jusqu'à un volume de 500 µL. La concentration finale a été déterminée par un dosage Bradford (Bio-Rad) et la pureté a été évaluée par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

Fragment topo-C

Amplification et dosage du vecteur

Le vecteur pIVEX2.4b/Nde (Roche, annexe Ia) a été amplifié par des minipréparations à l'aide de la trousse *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) selon le protocole fourni. L'ADN a été dilué dans un tampon de chargement 6x (0.25 % bleu de bromophénol et 40 % sucrose) puis déposé sur un gel d'agarose 1 % dans du tampon Tris-Acetate-EDTA (TAE; 40 mM tris-acétate et 1 mM EDTA, pH8.0) avec du bromure d'éthidium à une concentration de 0.35 µg/mL. Le dosage des bandes d'intérêt est fait par densitométrie suite à une exposition aux ultraviolets (Alphalmager, Alpha Innotech) par

comparaison à un marqueur de poids moléculaire (1 kb DNA Ladder, New England BioLabs). Le vecteur (2 µg) a été digéré pendant trois heures à 37 °C avec 20 unités (U) d'enzyme NcoI (New England BioLabs) dans le tampon recommandé par le fabricant. La digestion a été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose, puis centrifugée avec un concentrateur de type Montage™ PCR (Millipore) selon les instructions fournies par le fabricant afin de changer le tampon de digestion. Une seconde digestion du vecteur a été faite avec 20 U de l'enzyme XmaI (New England BioLabs) durant trois heures à 37 °C dans le tampon recommandé par le fabricant. La digestion a été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose, puis l'enzyme XmaI a été inactivé par la chaleur à 65 °C durant vingt minutes. Le vecteur pIVEX2.4b/Nde digéré par XmaI et NcoI a été conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

Polymerase chain reaction (PCR) et clonage

Le fragment topo-C a été amplifié à partir du vecteur pBluescript II SK(+)/topo I (annexe Ib). Les amorces suivantes ont été utilisées pour amplifier le fragment topo-C comprenant les a.a. 636 à 765 :

Sens : 5' AAACATATGACCATGGCACCACCAAAAACTTTTGAG 3'

Anti-sens : 5' CTTACCGGATCCCGGGCTAAAACATAGTCTTC 3'

Les amorces ont été conçues de sorte que les amplicons soient en phase lors de leur insertion dans le vecteur d'expression pIVEX2.4b/Nde. Les nucléotides soulignés indiquent les sites de restriction XmaI en 5' et NcoI en 3' utilisés pour le clonage. Les amorces ont été synthétisées par AlphaDNA.

Le vecteur pBluescript/topoI (0.2 µg) a été mélangé avec le tampon ThermoPol Reaction Buffer (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM MgSO₄ et 0.1 % Triton X-100; New England BioLabs), 1.25 mM désoxyribonucléosides triphosphate (dNTP; Invitrogen), 50 µM de chaque amorce, 0.5 U de l'enzyme Vent® DNA

Polymerase (New England BioLabs) et complété avec de l'eau autoclavé à un volume de 50 µL. Le programme employé a été le suivant : dénaturation initiale (95 °C, 5 minutes), dénaturation (95 °C, 30 secondes), hybridation (58 °C, 30 secondes), élongation (72 °C, 1 minute) et élongation finale (72 °C, 5 minutes). L'amplification a été faite en trente cycles. La taille du produit du PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % par comparaison à une échelle de poids moléculaire (100bp DNA Ladder; Invitrogen).

Le traitement du PCR, le clonage et la transformation ont été réalisés à l'aide de la trousse In-Fusion™ 2.0 Dry-Down PCR Cloning Kit selon le protocole fourni par le fabricant (Clontech). Les bactéries fournies avec la trousse ont été utilisées pour la transformation (Fusion-Blue™ Competent Cell; *endA1*, *hsdR17* (r_{k12}^- , m_{k12}^+), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac F*'[proA^+B^+ , $\text{lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15}::\text{Tn } 10(\text{tet}^R)$]).

Criblage de clones positifs

Afin d'identifier des clones positifs, des minipréparations ont été faites à l'aide de la trousse *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) selon le protocole fourni. L'ADN a été linéarisé par digestion avec l'enzyme Hind III (New England BioLabs) en conditions optimales (tampon, température, et nombre d'unités d'enzymes) recommandées par le fabricant. L'ADN de ces digestions a été dilué dans un tampon de chargement 6x puis déposé sur un gel d'agarose 1 % dans du tampon TAE avec du bromure d'éthidium. Les clones montrant le bon patron de digestion enzymatique (une bande à 2668 pb et une autre à 1236 pb) ont été confirmés par séquençage (service de séquençage du CHUM) avec les amorces du promoteur et du terminateur T7.

Expression et purification

Le vecteur d'expression pIVEX2.4b/Nde contient une queue hexa-histidine positionnée en N-terminus de l'insert. Les bactéries BL21-AI (Invitrogen) ont été transformées avec 7.5 ng du vecteur pIVEX2.4b/Nde topo-C. Des clones ont été repiqués dans le but d'ensemencer une culture de départ qui a été incubée durant seize heures à 25 °C. Cette culture a été diluée 1 : 25 dans du LB-CB (12.5 mL pour le criblage d'expression et 1 L pour la purification), puis incubée à 30 °C jusqu'à l'atteinte d'une D.O._{600nm} d'environ 0.5. Les bactéries ont alors été induites avec 0.2 % (criblage et purification) ou 0.4 % (criblage) de L-arabinose (Anachemia) durant trois heures (criblage et purification) ou quatre heures (criblage) à 30 °C. La concentration d'inducteur et les temps d'induction ont été déterminés selon les informations fournies par le fabricant des bactéries (Invitrogen). Des échantillons de 1 mL de culture bactérienne ont été récoltés avant et après l'induction, puis solubilisés dans du SSB. Pour la purification de la topo-C, les bactéries ont été centrifugées en culots de 100 mL durant vingt minutes à 5000 X g. Les culots ont été congelés à - 80 °C.

Un culot bactérien de 100 mL a été utilisé pour la purification. Les bactéries ont été suspendues dans le tampon d'extractions en conditions natives Talon™ xTractor Buffer (Clontech). Selon les instructions du fabricant, de la Dnase I et du lysozyme ont été ajoutés au lysat bactérien ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free, Roche). Le lysat a été centrifugé à 16 000 X g durant vingt-cinq minutes à 4 °C. Le surnageant a été appliqué (une heure, 4 °C) sur une résine de nickel (Ni-NTA His•Bind®; Novagen) équilibré dans un tampon de liaison (300 mM NaCl, 50 mM NaPO₄, 10 mM imidazole, pH 8.0). Par la suite, des lavages en conditions natives avec le tampon de liaison à différentes concentrations d'imidazole (quatre fois à 10 mM, trois fois à 15 mM et trois fois à 25 mM) ont permis d'éliminer plusieurs interactions non spécifiques. L'élution a été faite en augmentant la concentration d'imidazole à 50 mM dans le tampon de liaison.

La concentration en NaCl des 8 mL d'élution de la colonne Ni-NTA a été ajustée à 2 M afin d'augmenter l'interaction hydrophobe des protéines pour procéder ainsi à la seconde purification. L'échantillon a été déposé sur une colonne HiTrap Phenyl FF (low sub) de 1 mL (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon de départ (2 M NaCl, 50 mM NaPO₄, 50 mM imidazole, pH 8.0). Un lavage avec le tampon de départ a permis d'éliminer les interactions non spécifiques restantes. Les fractions ont été récoltées avec un tampon d'élution ne contenant pas de NaCl (50 mM NaPO₄, pH 7.0).

Concentration et dosage

Les fractions choisies (environ 3.5 mL) ont été centrifugées dans un concentrateur Vivaspin 4 (molecular weight cut-off de 10 kDa; Vivascience) à 4 °C. Trois lavages ont été faits avec du PBS afin de changer le tampon des protéines. Les protéines ont ensuite été centrifugées jusqu'à un volume de 400 µL. La concentration finale a été déterminée par un dosage Bradford (Bio-Rad) et la pureté a été évaluée par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

Fragment topo-N

Expression et purification

Un clone de pIVEX2.4b/Nde topo-N contenant une queue hexa-histidines positionné en N-terminal de l'insert dans les bactéries BL21-AI™ One Shot® (Invitrogen) avait été réalisé antérieurement (Arcand, résultat non publié.). Le clone a été repiqué dans une culture de départ qui a été incubée seize heures à 25 °C. Cette culture a été diluée 1 : 25 dans 1 L de milieu LB-CB. La culture diluée a été incubée à 30 °C jusqu'à l'atteinte d'une D.O._{600nm} d'environ 0.5. Les bactéries ont été induites avec 0.2 % L-arabinose (Anachemia) durant trois heures à 30 °C. Les bactéries ont été centrifugées en culot de 250 mL pendant vingt minutes à 4100 X g pour la purification de la topo-N recombinante. Les culots ont été congelés à - 80 °C.

Quatre culots bactériens de 250 mL ont été utilisés pour la purification. Les bactéries ont été suspendues dans le tampon d'extraction en conditions natives Talon™ xTractor Buffer (Clontech). Selon les instructions du fabricant, de la Dnase I et du lysozyme ont été ajoutés au lysat bactérien ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free, Roche). Le lysat a ensuite été centrifugé à 20 000 X g durant vingt minutes à 4 °C. Le surnageant a été appliqué (une heure, 4 °C) sur une résine de nickel (Ni-NTA His•Bind®; Novagen) équilibré dans un tampon de liaison (300 mM NaCl, 50 mM NaPO₄, 10 mM imidazole, pH 8.0). Par la suite, un lavage en conditions natives avec le tampon de liaison à 25 mM d'imidazole a permis d'éliminer plusieurs interactions non spécifiques. L'élution a ensuite été faite en augmentant la concentration d'imidazole à 250 mM dans le tampon de liaison.

La concentration en NaCl des 16 mL d'élution des quatre colonnes Ni-NTA a ensuite été ajustée à 2 M afin d'augmenter l'interaction hydrophobe des protéines et de procéder ensuite à la seconde purification. Huit mL d'échantillon ont donc été déposés par colonne HiTrap Phenyl HP de 1 mL (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon de départ (2 M NaCl, 50 mM NaPO₄, 250 mM imidazole, pH 8.0). Un lavage avec le tampon de départ a permis d'éliminer d'autres interactions non spécifiques. Les fractions ont été récoltées avec un tampon d'élution ne contenant pas de NaCl (50 mM NaPO₄, pH 7.0).

La pureté des éluions de la purification par interaction hydrophobe a été évaluée par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Le contaminant (DnaK) et la topo-N ont été identifiés par analyse en spectrométrie de masse (plateforme de protéomique du centre de génomique du Québec, CR-CHUL). Les 8 mL d'élution (4 mL par colonne) ont donc été centrifugés dans un concentrateur Vivaspın 4 (molecular weight cut-off de 10 kDa; Vivascience) à 4 °C. Trois lavages ont été faits avec du tampon de liaison (10 mM NaPO₄, pH 7.0) afin de changer le tampon des protéines pour la prochaine purification. Les protéines ont ensuite été centrifugées jusqu'à un volume de 1 mL.

L'échantillon a été déposé sur une colonne HiTrap Heparin HP de 1 mL (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon de liaison. Un lavage avec un tampon contenant de l'ATP (50 mM Tris-HCl, 3 mM ATP, 10 mM MgCl₂, pH7.4) a permis d'éliminer la DnaK (Hellebust *et al.*, 1990). Ensuite, un lavage avec le tampon de liaison permet d'éliminer l'ATP. Les fractions sont récoltées par une élution avec le tampon de liaison additionné de 1 M NaCl augmentant la force ionique permettant de décrocher les protéines.

Concentration et dosage

Les fractions choisies (2 mL pour chaque colonne) ont été centrifugées dans un concentrateur Vivaspin 4 (molecular weight cut-off de 10 kDa; Vivascience) à 4 °C. Trois lavages ont été faits avec du PBS afin de changer le tampon des protéines. Les protéines ont été centrifugées jusqu'à un volume de 500 µL. La concentration finale a été déterminée par un dosage Bradford (Bio-Rad) et la pureté a été évaluée par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Liaison aux protéines de la matrice extracellulaire

Fibronectine plasmatique et cellulaire, laminine, thrombospondine et collagène

Des plaques de 96 puits (Immulon 2HB, ThermoFisher Scientific) ont été enduites avec 350 ng des fragments produits (N, DIDII, DIII, H15 et C) et de topo I (Immunovision) dans du tampon carbonate/bicarbonate (30 mM NaHCO₃ et 20 mM Na₂CO₃, pH 9.6) durant seize heures à 37 °C. Suite à quatre lavages de deux minutes avec du PBS contenant 0.5 % Tween-20, les plaques ont été incubées pendant deux heures à 37 °C dans du tampon de blocage, PBS additionné de 1 % albumine de sérum bovin (BSA). Les plaques ont été lavées, puis incubées une heure à 37 °C avec le ligand dilué dans le tampon de blocage (fibronectine plasmatique, 10 µg/mL (Millipore); fibronectine cellulaire, 10 µg/mL (Alpco Diagnostics); laminine, 5 µg/mL (Sigma); thrombospondine, 0.5 µg/mL (Calbiochem); collagène type I, 10 µg/mL (Sigma)). Les plaques ont de nouveau été lavées, puis incubées une heure à 37 °C avec un anticorps dirigé contre le ligand dilué dans le tampon de blocage (anti-fibronectine Humaine, 1 : 5000 (Sigma); anti-laminine, 1 : 2500 (Abcam); anti-thrombospondine, 1 : 10 000 (Calbiochem); anti-collagène I, 1 : 250 (Abcam)). Suite aux lavages, la liaison des protéines aux ligands a été révélée grâce à une incubation de quarante-cinq minutes à 37 °C avec un second anticorps dilué dans le tampon de blocage, l'IgG de chèvre spécifique aux anticorps de lapin (1 : 20 000) couplé à la HRP (Jackson ImmunoResearch). Suite aux lavages, la révélation de la liaison a été faite avec 0.8 mg/mL du substrat o-phénylènediamine (OPD; Sigma) dilué dans un tampon contenant 92 mM citrate de sodium, 8 mM acide citrique pH 6.0 et 0.006 % H₂O₂ pendant vingt à vingt-cinq minutes à la température de la pièce et à la noirceur. Après l'arrêt de la réaction avec une solution de 2 M H₂SO₄, la D.O._{490nm} a été prise avec un lecteur de plaques MRX revelation (Dynex).

Vitronectine

La même méthode que pour les autres protéines de la MEC a été employée. Cependant, l'incubation permettant d'enduire les fragments ou la topo I dans les plaques a été d'une heure et le blocage de seize heures. Le ligand utilisé a été la vitronectine à une concentration de 0.5 µg/mL (R&D Systems). L'anticorps dirigé contre le ligand a été l'anti-vitronectine à une concentration de 1 : 1000 (Abcam).

Liaison aux protéines de la surface cellulaire

Héparine

La même méthode que pour les protéines de la MECa été employée. Cependant, le ligand utilisé a été l'héparine couplée à la biotine à une concentration de 1 µg/mL (Calbiochem). La streptavidine couplée à la HRP à une concentration de 1 : 5000 (Amersham Biosciences) a été utilisée à la place d'un anticorps dirigé contre l'héparine.

Pour tous les ELISA, c'est l'anticorps anti-penta-histidine 1 : 500 (Qiagen) qui a été utilisé contre les fragments de topo, tandis que pour la topo I c'est l'anticorps anti-topoisomerase I 1 : 200 (clone Mab1 ; Sigma). Ces deux anticorps sont révélés à l'aide de l'anticorps IgG de chèvre spécifique aux anticorps de souris (1 : 75 000) conjugués à la HRP (Jackson ImmunoResearch).

Résultats

Production des fragments de la topo

Afin de caractériser les interactions moléculaires de la topo avec la matrice extracellulaire et la surface des cellules, nous avons d'abord procédé à la dissection moléculaire de la topo en fragments. La topo possède quatre domaines structuraux. Les domaines N et C terminaux, ainsi qu'un domaine noyau et un interdomaine (Stewart *et al.*, 1996b). Le domaine noyau est constitué de 3 sous-domaines. Il s'agit des sous-domaines I, II et III. Le sous-domaine III comprend presque tous les résidus actifs de l'enzyme sauf celui du site de liaison de l'ADN, le tyrosine 723. De plus, il s'agit de la portion qui se trouve à la surface de la molécule. Le résidu tyrosine 723 est plutôt compris dans le domaine C-terminus. Suite à l'étude de la structure en trois dimensions et des fonctions des différents domaines de la topo, cette dernière a été fragmentée en quatre portions (figure 3). La même fragmentation avait été utilisée dans l'étude de Hu *et al.*, 2004, qui visait à localiser les épitopes des anti-topo de patients sclérodermiques. Le premier fragment, topo-N, correspond au domaine N-terminal et possède une masse moléculaire de 26 kDa (214 a.a.; 1 à 214). Le second fragment, topo-DIDII, comprend les sous-domaines I et II du domaine noyau, il s'agit également d'un fragment de 26 kDa (218 a.a.; 215 à 433). Le troisième fragment, topo-DIII, correspond au sous-domaine III, sa masse moléculaire est de 25 kDa (201 a.a.; 434 à 635). Le quatrième fragment, topo-C, correspond au domaine C-terminal additionné de l'interdomaine, sa masse moléculaire est de 15 kDa (129 a.a.; 636 à 765). Un fragment supplémentaire a aussi été préparé suite à une étude réalisée par Kuwana *et al.* en 1999b. Il s'agit d'une portion du sous-domaine III portant l'épitope conformationnel majeur de la topo. Ce fragment de 15 kDa (84 a.a.; 489 à 573) a été nommé topo H15. La figure 3 décrit également les anticorps utilisés pour la détection des fragments lors de leur purification et de leur utilisation.

Trois des cinq fragments présentés avaient déjà été produits au laboratoire d'accueil (Tremblay, 2004). Il s'agit des fragments topo-DIDII, topo-DIII et topo-H15. Il a suffi de vérifier la pureté et l'état de conservation des protéines (figure 4). Ainsi, la protéine topo-DIDII correspondait à la masse moléculaire attendue, soit 26 kDa. La protéine topo-DIII migre un peu plus haut que la masse moléculaire attendue, environ à 30 kDa, alors que sa masse théorique est de 25 kDa. Toutefois, une analyse en spectrométrie de masse (non montré) a permis de s'assurer que la séquence était la bonne et qu'il s'agissait bien de la topo-DIII. La topo-H15 a migré à la masse moléculaire attendue, environ 15 kDa.

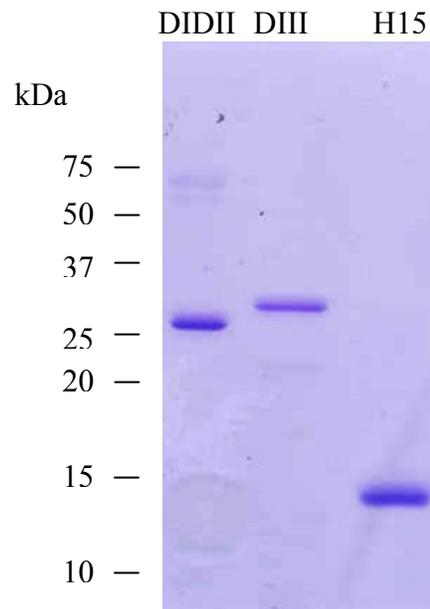


Figure 4. Fragments purifiés de topo

Coloration au bleu de Coomassie des fragments topo-DIDII, topo-DIII et topo-H15 recombinants, produits antérieurement. Les marqueurs de masse moléculaire (en kDa) sont indiqués à gauche.

Topo-DIII

Suite à un changement dans la disponibilité de la résine utilisée par Mélanie Tremblay pour purifier le fragment topo-DIII, nous avons dû développer une nouvelle méthode de purification utilisant une résine de même type, à base de Ni-NTA provenant d'un autre fabricant. Il s'agit aussi d'une résine de nickel permettant de purifier des protéines portant une queue d'histidine. L'extraction du lysat bactérien a été faite en conditions dénaturantes afin d'éviter la dégradation par les protéases, qui sont ainsi inactivées. La purification de la topo-DIII sur une colonne de résine Ni-NTA a été faite en condition hybride. C'est-à-dire que l'étape de liaison ainsi que les premiers lavages sont réalisés en condition dénaturante, tandis que les derniers lavages et l'élution sont réalisés en conditions natives. Cette étape seule ne permet cependant pas de complètement purifier la topo-DIII. Comme il est possible de le voir à la figure 5 (a), il y a plusieurs autres bandes que la bande majoritaire de la topo-DIII, migrant à environ 30 kDa, présentes sur le gel d'acrylamide après transfert sur nitrocellulose et coloration au rouge ponceau; il peut s'agir de protéines bactériennes ou encore de topo-DIII dégradé. L'immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine a toutefois permis de confirmer la présence de la topo-DIII. Une seconde étape de purification par interaction hydrophobe sur une résine portant un résidu butyle a permis de compléter la purification et d'obtenir la topo-DIII pure et exempte de contaminants (figure 5b). En effet, une seule bande correspondant à la masse moléculaire observée à la migration de la topo-DIII (figure 5) est visible sur le gel et reconnue par un anticorps anti-penta-histidine (figure 5b). Cette méthode, avant concentration, a permis de purifier environ 3 µg de fragment topo-DIII/L de culture bactérienne. Il est possible de voir avec la coloration au bleu de Coomassie le fragment topo-DIII purifié après concentration, il s'agit d'une seule bande située à environ 30 kDa (figure 5c).

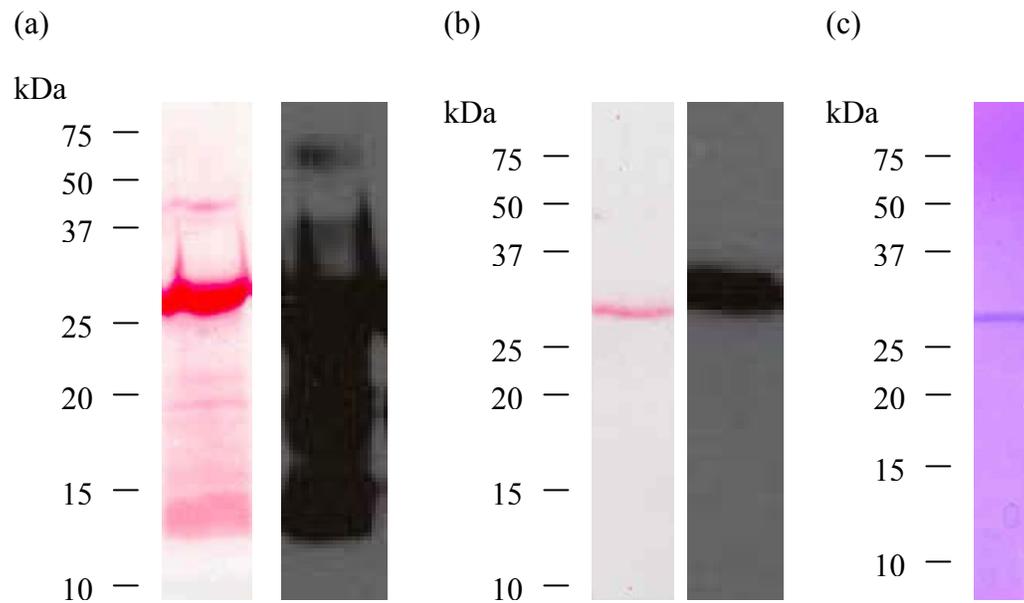


Figure 5. Purification du fragment topo-DIII

(a) À gauche, coloration au rouge ponceau et, à droite, immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine de la première étape de purification sur résine de nickel pour le fragment topo-DIII. (b) À gauche, coloration au rouge ponceau et, à droite, immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine de la deuxième étape de purification par interaction hydrophobe sur résine de butyle pour le fragment topo-DIII. (c) Coloration au bleu de Coomassie du fragment topo-DIII après concentration. Les marqueurs de masse moléculaire (en kDa) sont indiqués à gauche.

Topo-C

Le fragment C de 390 pb correspondant au fragment protéique souhaité a été amplifié par PCR à partir du vecteur pBluescript/topo I contenant l'ADNc complet de la topo (figure 6a). Les amorces utilisées pour l'amplification contenaient les sites de restriction XmaI et NcoI. Le clonage a été effectué à l'aide du kit In-Fusion PCR cloning dans le vecteur d'expression pIVEX2.4b/Nde, préalablement linéarisé à l'aide des enzymes XmaI et NcoI, contenant une queue d'hexa-histidines en N-terminal de la séquence insérée. Le produit de clonage de 1236 pb a ensuite été transformé dans les bactéries BL21-AI pour la production du fragment topo-C (figure 6b). Ce système d'expression bactérien utilise un promoteur de la T7 polymérase inductible à l'arabinose.

Après trois heures d'induction avec 0.2 et 0.4 % d'arabinose la protéine recombinante topo-C était surexprimée tandis qu'elle était absente du lysat bactérien non induit (figure 7a). Le fragment topo-C se trouvait à la masse moléculaire attendue, soit 15 kDa sur le gel de polyacrylamide. De plus, la bande correspondante à la topo-C a été reconnue par un anticorps anti-penta-histidine. Sur la figure 7 (b), il est possible de voir que cet anticorps reconnaît aussi une bande plus basse à environ 10 kDa, il pourrait s'agir de topo-C dégradé.

L'extraction du lysat bactérien et la purification de la topo-C sur une colonne de résine Ni-NTA ont été faites en conditions natives. Le fait de travailler en conditions natives permet de préserver les fonctions et la conformation de la protéine. Cette étape de purification seule ne permet pas de purifier la topo-C. Comme il est possible de le voir à la figure 8 (a) il y a plusieurs autres bandes que celle de la topo-C, à environ 15 kDa, présentes sur la nitrocellulose colorée au rouge ponceau : il peut s'agir de protéines bactériennes ou encore de topo-C dégradé. L'immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine a toutefois permis de confirmer la présence de la topo-C. Une seconde étape de purification par interaction hydrophobe sur une résine de phényle a permis de compléter

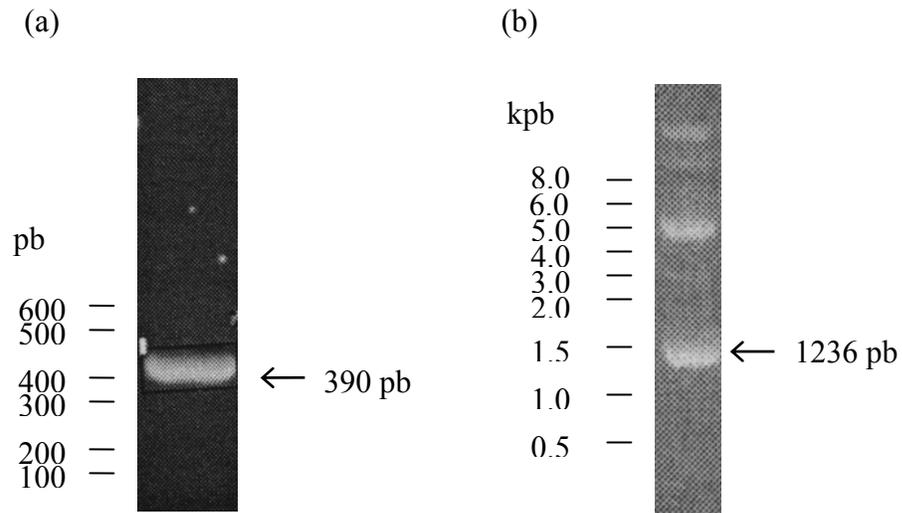


Figure 6. Migration sur gel d'agarose du fragment d'ADN topo-C seul et dans le vecteur pIVEX2.4b/Nde

(a) Fragment topo-C de 390 pb amplifié à partir de l'ADNc de la topo par PCR. (b) Vecteur pIVEX2.4b/Nde contenant la séquence ADN du fragment topo-C de 1236 pb, transformé dans les bactéries *E. coli* BL21-AI. Les marqueurs de masse moléculaire (pb) sont indiqués à gauche.

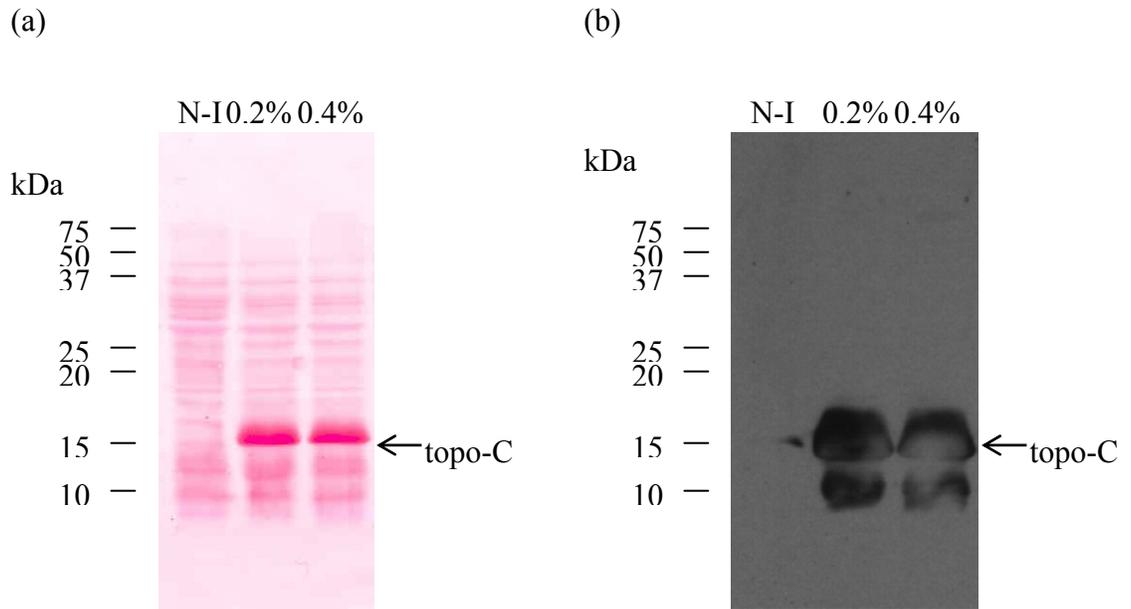


Figure 7. Expression du fragment recombinant topo-C

(a) Coloration au rouge ponceau du lysat bactérien d'un clone exprimant la protéine topo-C après 3 heures d'induction à diverses concentrations de L-arabinose (0.2 ou 0.4 %) en comparaison au lysat non induit (N-I). (b) Immunobuvardage des mêmes lysats avec un anticorps anti-penta-histidine. Les marqueurs de masse moléculaire sont indiqués à gauche.

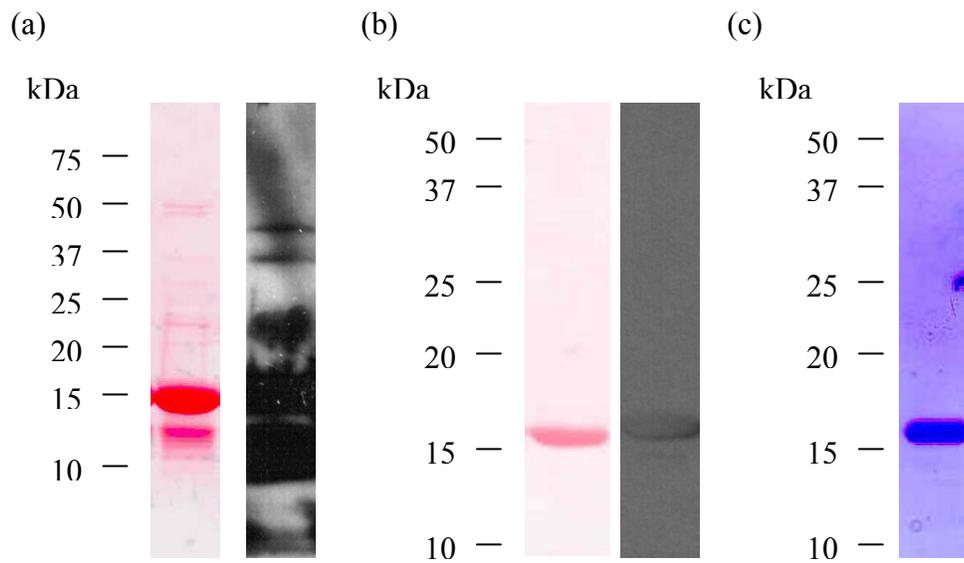


Figure 8. Purification du fragment topo-C

(a) Coloration au rouge ponceau à gauche et immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine, à droite, pour la première étape de purification sur résine de nickel du fragment topo-C. **(b)** Coloration au rouge ponceau à gauche et immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine, à droite, pour la deuxième étape de purification par interaction hydrophobe sur résine de phényl du fragment topo-C. **(c)** Coloration au bleu de Coomassie du fragment topo-C purifié, après concentration. Les marqueurs de masse moléculaire (en kDa) sont indiqués à gauche.

la purification afin d'obtenir de la topo-C pure et exempte de contaminants (figure 8b). En effet, une seule bande correspondant à la masse moléculaire de la topo-C, 15 kDa, est visible sur le gel et reconnue par un anticorps anti-penta-histidine. Il est possible de voir avec la coloration au bleu de Coomassie le fragment topo-C purifié après concentration, il s'agit d'une seule bande située à environ 15 kDa (figure 8c). Cette méthode a permis de purifier une quantité importante de topo-C, environ 30 mg de fragment topo-C/L de culture bactérienne.

Topo-N

Puisque le clonage de la topo-N dans le vecteur d'expression pIVEX2.4b/Nde avait été fait antérieurement, qu'un clone était disponible et que le protocole d'induction avait été mis au point par Julie Arcand (résultat non publié), j'ai procédé à la mise au point des conditions d'extraction et de purification du fragment topo-N. L'extraction du lysat bactérien et la purification de la topo-N ont été faites en conditions natives. Le fait de travailler en conditions natives permet de préserver les fonctions et la conformation de la protéine. La première étape de la purification de la topo-N a été faite sur une colonne de résine Ni-NTA. Cette étape de purification seule ne permet pas de purifier la topo-N. Comme il est possible de le voir à la figure 9 (a), plusieurs bandes autres que la topo-N sont présentes sur la membrane de nitrocellulose colorée au rouge ponceau. Il peut s'agir de protéines bactériennes ou encore de topo-N dégradée. L'immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine a toutefois permis de confirmer la présence de la topo-N. La topo-N qui a une masse moléculaire théorique de 26 kDa migre cependant à environ 35 kDa sur gel. L'immunobuvardage avec l'anticorps anti-topoisomérase de Sigma, reconnaissant la portion N-terminale de la protéine, a permis de s'assurer qu'il s'agissait effectivement de la topo-N. Une analyse en spectrométrie de masse a permis de confirmer que la bande à 35 kDa était de la topo-N (voir annexe IIa). La conformation de la protéine pourrait expliquer la différence entre la masse théorique et celle observée lors de la migration.

Une seconde étape de purification par interaction hydrophobe sur une résine de phényl a permis de se débarrasser de plusieurs contaminants. Cependant, quelques bandes de masse moléculaire plus faible et une bande à environ 75 kDa sont toujours présentes sur la membrane de nitrocellulose colorée au rouge ponceau (figure 9b). L'immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine a toutefois permis de confirmer la présence de la topo-N.

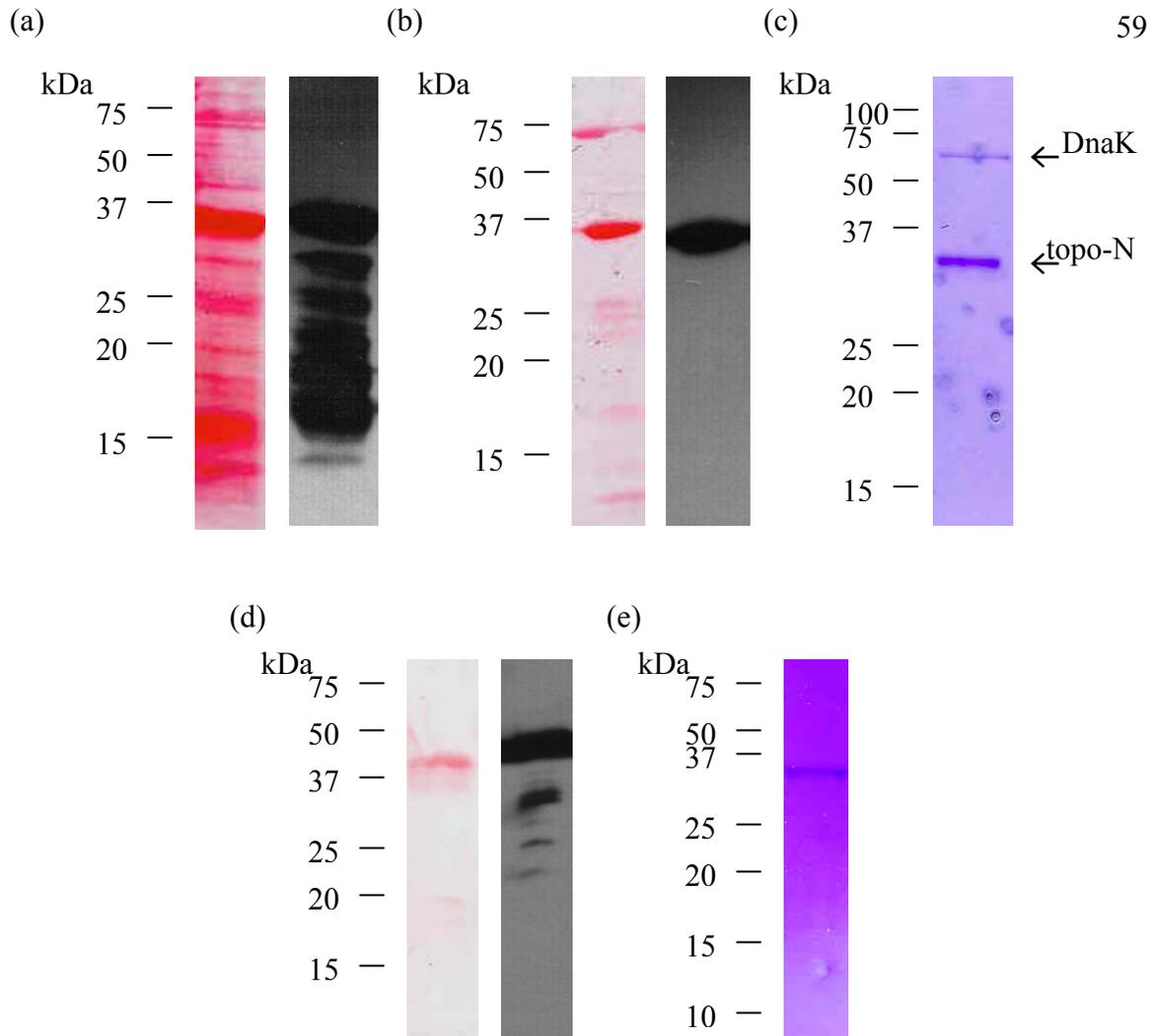


Figure 9. Purification du fragment topo-N

(a) Coloration au rouge ponceau à gauche et immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine, à droite, pour la première étape de purification sur résine de nickel du fragment topo-N. (b) Coloration au rouge ponceau à gauche et immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine, à droite, pour la deuxième étape de purification par interaction hydrophobe sur résine de phényl du fragment topo-N. (c) Coloration au bleu de Coomassie du fragment topo-N purifié, après concentration, où le contaminant DnaK de *E.coli* est indiqué. (d) Coloration au rouge ponceau à gauche et immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine, à droite, pour la troisième étape de purification sur une

colonne d'héparine pour le fragment topo-N. **(e)** Coloration au bleu de Coomassie du fragment topo-N purifié après concentration. Les marqueurs de masse moléculaire (en kDa) sont indiqués à gauche.

Suite à la concentration de la topo-N sur un dispositif Vivaspin, une seule bande contaminante demeure visible avec la coloration au bleu de Coomassie, il s'agit de la bande à 75 kDa (figure 9c). Une analyse en spectrométrie de masse nous a permis d'identifier cette bande. Il s'agit d'une protéine chaperonne bactérienne, la DnaK (voir annexe IIb). Ce contaminant provient donc de l'expression de la topo-N qui est réalisée dans des bactéries *E. coli*.

Nous avons constaté en immunobuvardage que l'héparine avait de l'affinité seulement pour la topo-N (résultat non montré). Puisque la DnaK ne se liait pas à l'héparine, nous avons procédé à une purification par affinité sur une colonne d'héparine. La figure 9 (d) permet de voir avec la coloration au rouge ponceau qu'une seule bande à environ 35 kDa est visible. L'immunobuvardage avec un anticorps anti-penta-histidine confirme la présence de topo-N. En effet, une seule bande correspondant à la masse moléculaire observé de la topo-N, 35 kDa, est visible sur le gel et reconnue par un anticorps anti-penta-histidine. Il est possible de voir avec la coloration au bleu de Coomassie le fragment topo-N purifié après concentration, il s'agit d'une bande située à environ 35 kDa (figure 9e). Cette méthode a permis de purifier environ 3.5µg de fragment topo-N/L de culture bactérienne.

Les fragments de la topo ainsi préparés ont été utilisés dans les expériences subséquentes.

Liaison des fragments de topo aux protéines de la matrice extracellulaire

Le laboratoire a déjà montré que la topo se liait à la MEC. Afin d'identifier quels fragments de topo pouvaient se lier aux protéines de la MEC, ils ont été testés en ELISA en utilisant toutefois un protocole inverse de celui habituellement utilisé. Les fragments de la topo ont été enduits au fond des puits et constituent alors la cible de l'interaction. La protéine à tester comme ligand a été ajoutée en solution dans les puits. Après lavage du ligand libre, un anticorps primaire dirigé contre la protéine à tester est ensuite ajouté. L'interaction des fragments avec la protéine à tester est finalement détectée grâce à un anticorps secondaire dirigé contre le premier anticorps couplé à la HRP.

La figure 10 (a) montre les différents contrôles qui ont été effectués afin de s'assurer de l'authenticité des interactions observées. L'exemple choisi montre les contrôles faits dans le cadre de l'ELISA pour vérifier l'interaction des fragments avec la fibronectine plasmatique. Des contrôles identiques ont été effectués pour tous les ligands que nous avons testés. Un premier contrôle vise à s'assurer que l'anticorps secondaire seul, c'est-à-dire sans le ligand ni l'anticorps primaire, n'interagit pas avec l'antigène (Ag⁺). Le second contrôle permet de vérifier qu'il n'y a pas d'interaction entre l'anticorps primaire et la cible, le ligand étant absent. Le troisième contrôle vérifie que l'anticorps secondaire n'interagit pas avec le ligand, en absence de l'anticorps primaire. Tous les contrôles ont aussi été réalisés en absence de la cible afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'interaction avec la plaque ELISA elle-même. Les contrôles suivants concernent le revêtement des puits par les fragments de topo. Il est particulièrement important de s'assurer que ce n'est pas l'absence de la cible qui est à la base de l'absence d'interaction avec le ligand. Pour ce faire, la présence des fragments est détectée grâce à un anticorps anti-penta-histidine dont la présence est révélée par un anticorps anti-souris IgG couplé à la HRP. Un contrôle visant à s'assurer que l'anticorps secondaire seul, c'est-à-dire en absence de l'anticorps primaire, n'interagit pas avec l'antigène est aussi requis.

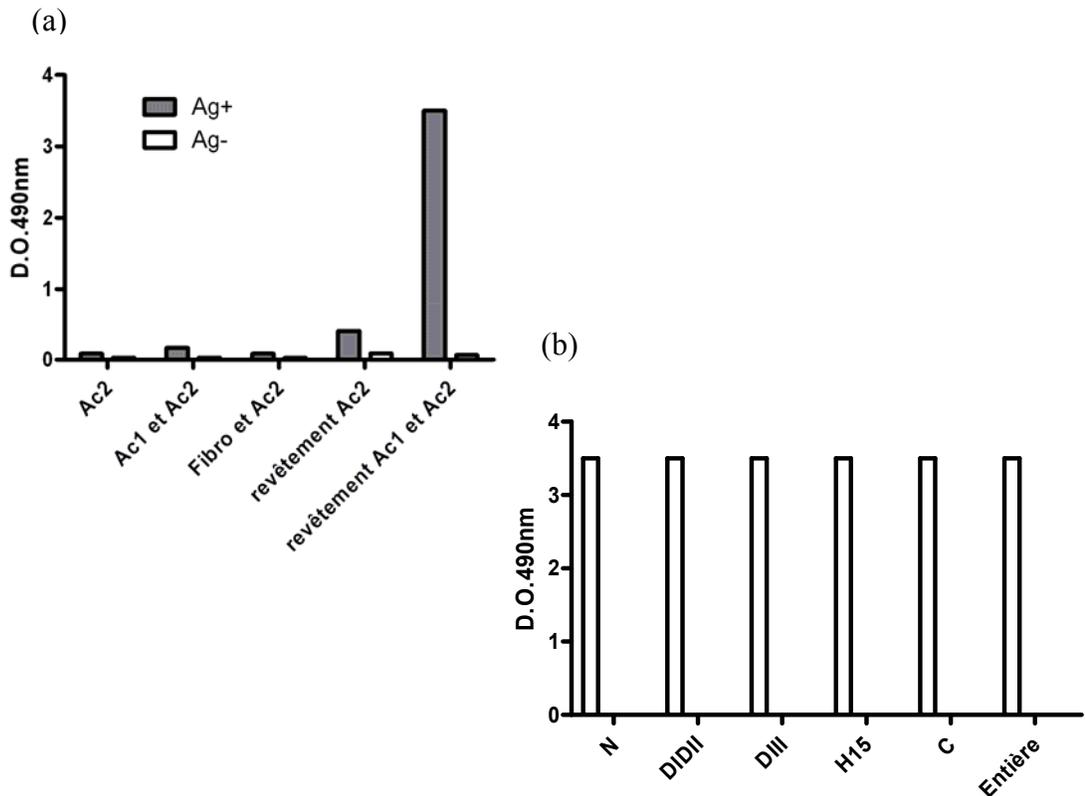


Figure 10. Contrôles de l'interaction de la fibronectine plasmatique et de la topo entière ainsi que du revêtement des puits en ELISA

(a) Contrôles de la liaison de la fibronectine plasmatique avec la topo entière. Liaison de l'anti-lapin IgG couplé à la HRP (Ac2) avec (+) et sans (-) la cible (Ag), qui est la topo entière. Liaison de l'anticorps anti-fibronectine (Ac1) et de l'Ac2 avec ou sans Ag. Liaison de la fibronectine plasmatique (Fibro) et de l'Ac2 avec ou sans Ag. Vérification de la présence de l'Ag comme revêtement dans les puits. Liaison de l'anticorps anti-souris IgM couplé à la HRP (Ac2) avec ou sans Ag. Liaison de l'anticorps anti-topo IgM (Ac1) et de l'anticorps anti-souris IgM couplé à la HRP (Ac2) avec ou sans Ag. **(b)** Liaison des fragments et de la topo entière dans les puits, détectées respectivement avec l'anticorps anti-penta-histidine pour les fragments et avec l'anticorps anti-topo IgM pour la topo entière.

Ce contrôle a aussi été réalisé en absence de cible (Ag-) afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'interaction avec la plaque ELISA elle-même. La figure 10 (b) montre le contrôle positif de revêtement pour chacun des fragments. La figure 10 permet de voir que tous les contrôles énumérés ci-haut étaient adéquats.

La figure 11 résume les résultats de l'interaction de la fibronectine plasmatique avec les fragments de topo. Il est possible de voir que seul le fragment topo-DIDII et la topo entière interagissent avec la fibronectine plasmatique présente à une concentration de 10µg/ml.

La figure 12 montre le résultat de l'interaction de la fibronectine cellulaire avec les fragments de topo. Il est possible de voir que seuls le fragment topo-DIDII et la topo entière interagissent avec la fibronectine cellulaire présente à une concentration de 10 µg/ml, conformément aux résultats obtenus avec la fibronectine plasmatique.

La figure 13 montre le résultat de l'interaction de la laminine avec les fragments de topo. Il est possible de voir que seuls le fragment topo-DIDII et la topo entière interagissent avec la laminine présente à une concentration de 5 µg/ml. En effet, l'interaction des fragments topo-H15 et topo-C est trop faible pour être considérée.

La figure 14 montre le résultat de l'interaction de la thrombospondine avec les fragments de topo. Il est possible de voir que seuls le fragment topo-DIDII et la topo entière interagissent avec la thrombospondine présente à une concentration de 0.5 µg/ml. En effet, l'interaction des fragments topo-N, topo-DIII et topo-H15 est trop faible pour être considérée.

La figure 15 montre le résultat de l'interaction de la vitronectine avec les fragments de topo. Il est possible de voir que les fragments topo-DIDII et topo-H15 ainsi que la topo entière interagissent avec la vitronectine présente à une concentration de 0.5 µg/ml.

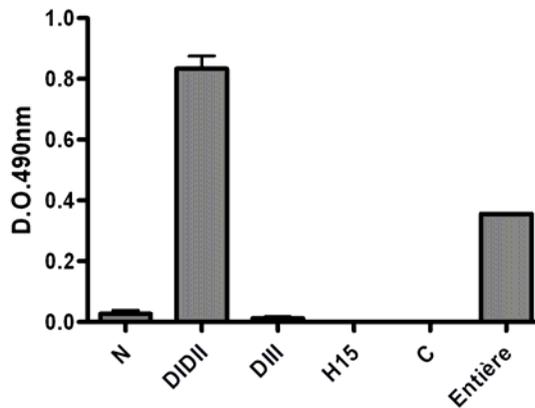


Figure 11. Interaction des fragments et de la topo entière avec la fibronectine plasmatique en ELISA

Liaison des fragments et de la topo entière enduits avec la fibronectine plasmatique (10 µg/ml). L'interaction est détectée à l'aide d'un anticorps anti-fibronectine.

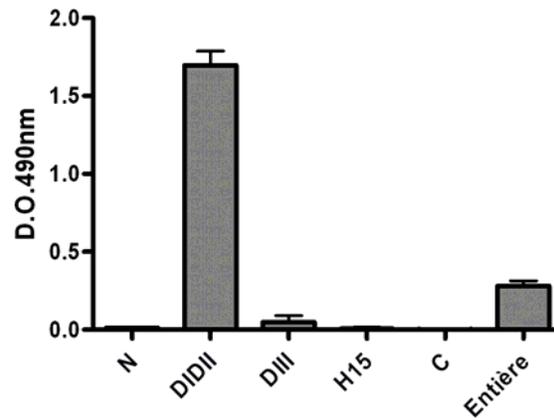


Figure 12. Interaction des fragments et de la topo entière avec la fibronectine cellulaire en ELISA

Liaison des fragments et de la topo entière enduits avec la fibronectine cellulaire (10 µg/ml). L'interaction est détectée à l'aide d'un anticorps anti-fibronectine.

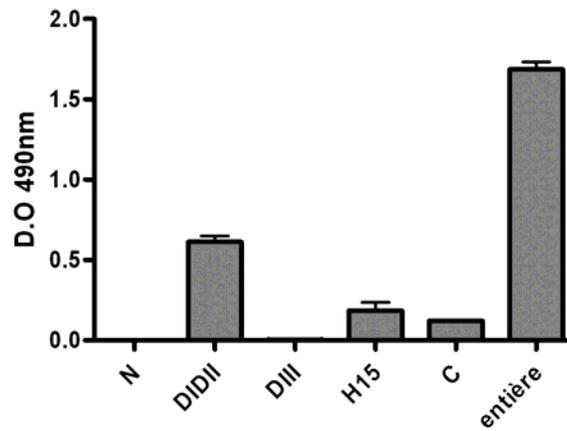


Figure 13. Interaction des fragments et de la topo entière avec la laminine en ELISA

Liaison des fragments et de la topo entière enduits avec la laminine (5 $\mu\text{g/ml}$).
L'interaction est détectée à l'aide d'un anticorps anti-laminine.

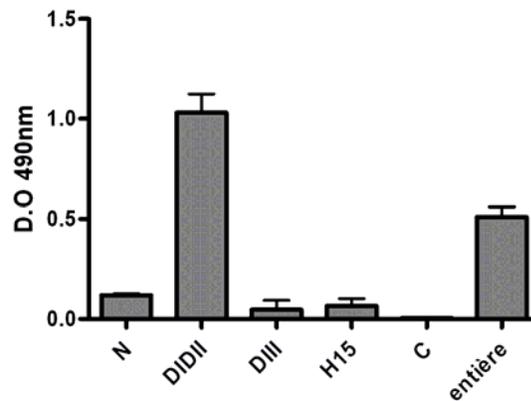


Figure 14. Interaction des fragments et de la topo entière avec la thrombospondine en ELISA

Liaison des fragments et de la topo entière enduits avec la thrombospondine (0.5 $\mu\text{g/ml}$). L'interaction est détectée à l'aide d'un anticorps anti-thrombospondine.

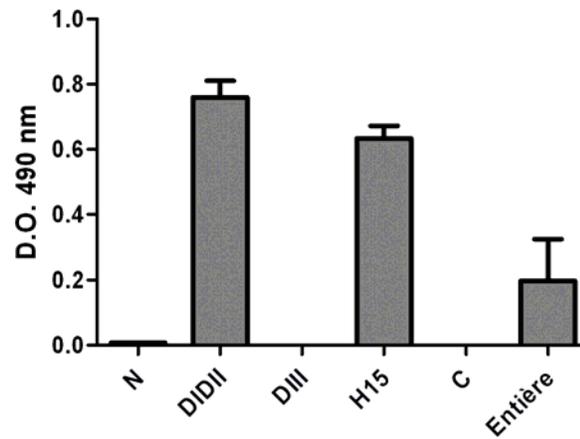


Figure 15. Interaction des fragments et de la topo entière avec la vitronectine en ELISA

Liaison des fragments et de la topo entière enduits avec la vitronectine (0.5 µg/ml). L'interaction est détectée à l'aide d'un anticorps anti-vitronectine.

La figure 16 montre le résultat de l'interaction du collagène de type I avec les fragments de topo. Il est possible de voir qu'aucun des fragments, ni la topo entière n'interagissent avec le collagène de type I présent à une concentration de 10 µg/ml. Le collagène agit donc comme un contrôle négatif démontrant la spécificité des interactions précédentes. Il est toutefois important de mentionner qu'un contrôle positif a été réalisé afin de vérifier que le collagène utilisé était fonctionnel (non montré).

Afin de déterminer davantage la spécificité des interactions observées, nous avons réalisé des ELISA avec les protéines de la MEC et la topo entière, mais en conditions ioniques plus strictes. Les tests ELISA ont été faits en parallèle dans les conditions ioniques initiales, avec 0.15 M NaCl dans du PBS, et en présence de 1 M NaCl. Les conditions ioniques plus strictes permettent d'éliminer les interactions purement électrostatiques. Toutes les interactions observées précédemment demeurent présentes en conditions ioniques plus strictes (figure 17). Une baisse de la moitié de la liaison de la fibronectine plasmatique et de la thrombospondine sur la topo entière a été observée. C'est l'interaction de la vitronectine avec la topo entière qui subit la plus importante diminution, d'environ 75 % de la densité optique mesurée. L'interaction de la laminine avec la topo entière est la seule à montrer une légère hausse en conditions ioniques accrues.

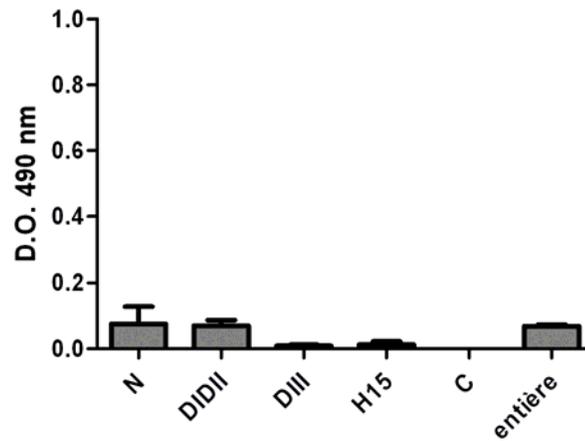


Figure 16. Interaction des fragments et de la topo entière avec le collagène type I en ELISA

Liaison des fragments et de la topo entière enduits avec le collagène type I (10 µg/ml). L'interaction est détectée à l'aide d'un anticorps anti-collagène type I.

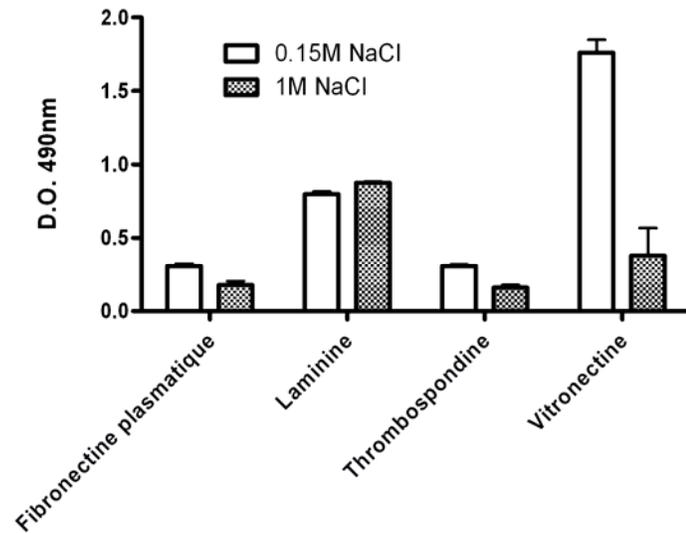


Figure 17. Comparaison de l'interaction de la topo entière et des protéines de la matrice extracellulaire en présence de différentes concentrations de NaCl

Liaison de la topo entière enduite avec la fibronectine plasmatique, la laminine, la thrombospondine et la vitronectine à deux concentrations de NaCl différentes, soit 0.15 et 1.0 M NaCl dans du PBS.

Liaison des fragments de topo aux protéines de la surface des fibroblastes

Des études réalisées antérieurement ont permis de montrer une interaction de la topo et des HS de la surface des fibroblastes (Arcand, résultats non publiés). Afin de déterminer à quel fragment cette interaction est due, un test ELISA réalisé comme ci-haut pour les protéines de la MEC a été fait. Toutefois, puisqu'il est très difficile d'enduire efficacement les HS dans les puits à cause des sucres présents sur cette molécule, l'héparine a donc servi de représentant. L'héparine qui a été utilisée étant couplée à la biotine, cela a évité l'utilisation d'un anticorps primaire. La streptavidine couplée à la HRP a remplacé l'utilisation d'un anticorps secondaire pour la détection du ligand. Les différents contrôles qui ont été effectués afin de s'assurer de l'authenticité des interactions observées pour les protéines de la MEC ont aussi été faits pour les protéines de la surface des fibroblastes (non montré).

La figure 18 (a) montre le résultat de l'interaction de l'héparine avec les fragments de topo. Il est possible de voir que les fragments topo-N et topo-DIDII ainsi que la topo entière interagissent avec l'héparine présente à une concentration de 1 µg/ml. En effet, l'interaction du fragment topo-C avec l'héparine est trop faible pour être considérée.

Afin de démontrer davantage la spécificité des interactions observées, nous avons réalisé un ELISA avec l'héparine et la topo entière, mais en conditions ioniques accrues. En effet, les tests ELISA ont été faits en parallèle dans les conditions ioniques initiales en présence de 0.15M NaCl dans du PBS et en conditions ioniques accrues avec 1 M NaCl. Les conditions ioniques plus strictes permettent d'éliminer les interactions purement électrostatiques. L'interaction observée précédemment demeure présente en conditions ioniques accrues malgré une baisse d'un tiers de la liaison (figure 18 b).

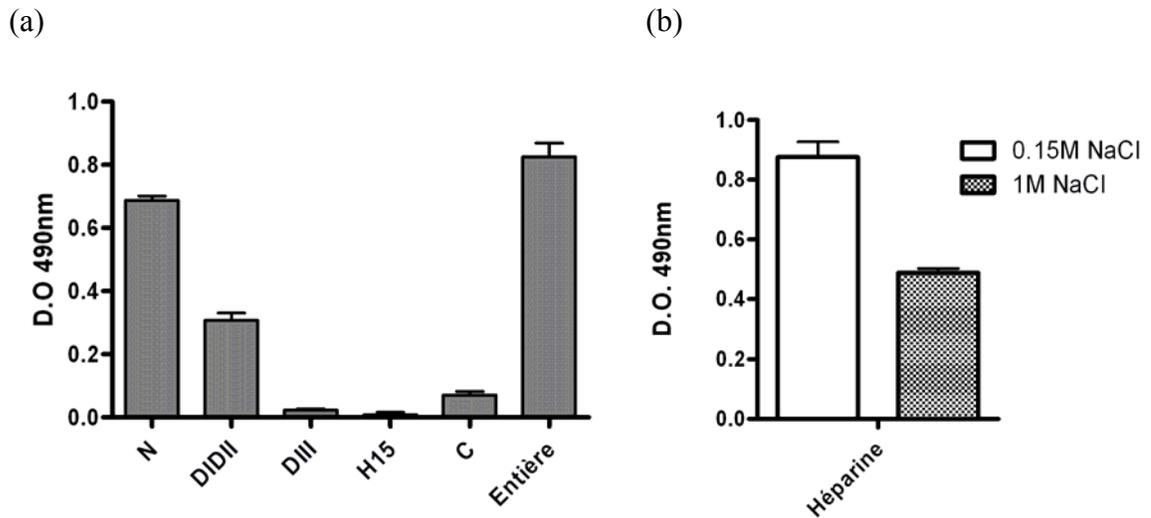


Figure 18. Interaction des fragments et de la topo entière avec de l'héparine en ELISA

(a) Liaison des fragments et de la topo entière enduits avec de l'héparine couplée à la biotine (1 µg/ml). L'interaction est détectée à l'aide de la streptavidine couplés à la HRP.

(b) Liaison de la topo entière enduite avec de l'héparine couplée à la biotine, en présence de 0.15 ou 1.0 M NaCl dans du PBS.

Le tableau 2 résume les interactions des protéines de la MEC et de la surface des fibroblastes avec les fragments de topo. Il est possible de voir que le principal fragment responsable de la liaison à la MEC est le topo-DIDII. Le seul autre fragment à avoir montré une interaction avec une des protéines de la matrice extracellulaire, la vitronectine, est le fragment topo-H15. Au niveau des protéines de la surface des fibroblastes, deux fragments sont impliqués, le topo-N et le topo-DIDII. Il est également possible de voir que les fragments topo-DIII et topo-C n'interagissent avec aucune des protéines testées tant au niveau de la MEC que de la surface des fibroblastes.

Tableau 2. Résumé des interactions des fragments de la topo et des ligands de la matrice extracellulaire et de la surface des fibroblastes

Ligands	Fragments de topoisomérase I				
	N	DIDII	DIII	H15	C
Matrice extracellulaire					
Fibronectine plasmatique		x			
Fibronectine cellulaire		x			
Laminine		x			
Thrombospondine		x			
Vitronectine		x		x	
Surface des fibroblastes					
Héparine	x	x			

Discussion

Les fragments de topo

Cinq fragments recombinants de la topo ont été produits. Ces fragments ont été déterminés en fonction de la structure de la topo, mais aussi des épitopes qui étaient reconnus par les sérums de patients SSc. Ils ont été produits dans le but de caractériser les interactions de la topo avec la surface des fibroblastes et la MEC, afin d'identifier le ou les domaines de liaisons de la topo aux fibroblastes et à la MEC. De plus, ces résultats pourront contribuer à l'identification de la cible de la topo sur les fibroblastes. En effet, une meilleure connaissance du fragment qui lie la surface des fibroblastes pourra permettre de rétrécir le champ de recherche pour la cible de la topo sur les fibroblastes. Le premier fragment, topo-N, correspond à la partie N-terminale de la topo. Le deuxième, topo-DIDII, correspond aux sous-domaines I et II du domaine noyau. Le troisième, topo-DIII, correspond au sous-domaine III du domaine noyau. Le quatrième, topo-H15, correspond à un épitope immunodominant faisant partie du fragment topo-DIII. Finalement le dernier fragment, topo-C, correspond à la partie C-terminale de la topo (figure 3).

Hénault *et al.* avaient démontré, en 2006, que la topo pouvait se lier à la surface des fibroblastes sans toutefois pouvoir identifier la cible de cette liaison. D'autre part, certains fragments de la topo, soit topo-DIII et topo-H15, avaient déjà été produits afin de mieux caractériser la liaison de la topo aux fibroblastes (Tremblay, 2004). Nous avons donc poursuivi dans cette voie, en produisant les autres fragments de la topo. De plus, nous avons voulu caractériser la liaison de la topo à la MEC.

Interactions des fragments de topo avec la matrice extracellulaire

Plusieurs protéines de la MEC ont été testées, dont la fibronectine cellulaire et plasmatique ainsi que la laminine, la thrombospondine-1, la vitronectine et le collagène de type 1, pour leur interaction avec les fragments de topo. Ces interactions ont été mises en évidence par la technique d'ELISA. Les fragments ont été enduits dans les puits et les protéines de la MEC utilisées comme ligands. Puis, les interactions ont été détectées grâce à des Ac spécifiques aux ligands utilisés.

Toutes les protéines de la MEC testées ont montré une liaison avec la topo entière à l'exception du collagène de type 1. Ce dernier n'a pas non plus d'interaction avec les fragments de la topo. Parmi les protéines de la MEC testées, les deux formes de fibronectine ont donné les mêmes résultats et interagissent avec le fragment topo-DIDII. Il en est de même pour la laminine et la thrombospondine. La vitronectine montre, elle aussi, une interaction avec le fragment topo-DIDII, mais également avec le fragment topo-H15. Il semble donc que la topo-DIDII soit principalement responsable de l'interaction de la topo avec la MEC.

Interaction topo-DIDII et matrice extracellulaire

Les différentes protéines de la MEC testées possèdent des caractéristiques communes que le collagène de type 1 ne partage pas. En effet, la fibronectine, la laminine, la thrombospondine et la vitronectine partagent une structure exempte d'hélice contrairement au collagène de type 1, qui lui est formé d'hélices (Kornblihtt & Gutman, 1988 ; Adams, 2001 ; Pankov & Yamada, 2002 ; Leitinger & Hohenester, 2007 ; Miner, 2008). Bien que toutes les molécules de la MEC testées possèdent des domaines de liaison aux cellules, soit par le motif R-G-D ou en plus par le motif Y-I-G-S-R présent sur la laminine, le collagène de type I ne possède pas de domaine de liaison à l'héparine (Kornblihtt & Gutman, 1988). Il est donc possible que la topo-DIDII se lie aux molécules

de la MEC par leur domaine de liaison à l'héparine. Ceci expliquerait que le collagène n'interagisse pas avec le fragment topo-DIDII. Une façon de mettre en évidence l'interaction des protéines de la MEC et du fragment topo-DIDII, par l'intermédiaire du domaine de liaison à l'héparine des protéines de la MEC, pourrait être d'utiliser un court peptide correspondant à la séquence du domaine de liaison à l'héparine. Ensuite, un test ELISA qui met en compétition une protéine de la MEC ainsi que le peptide pourrait être fait. Si le peptide inhibe la liaison de la topo-DIDII à la protéine de la MEC, cela indique que la topo-DIDII se lie à la protéine de la MEC à l'aide du domaine de liaison à l'héparine de cette dernière. Il s'agit de la technique utilisée par Yamada et Kennedy pour montrer qu'il est possible d'inhiber l'attachement cellulaire à la fibronectine. En effet, ils ont utilisé un peptide synthétique tiré du domaine de liaison cellulaire de la fibronectine, le R-G-D-S. Il semble que ce peptide agisse comme compétiteur du domaine de liaison cellulaire de la fibronectine (Yamada & Kennedy, 1984).

Une autre explication de l'absence d'interaction de la topo-DIDII avec le collagène est que cette interaction ait lieu via le domaine de liaison cellulaire R-G-D des protéines de la MEC. En effet, toutes les protéines de la MEC que nous avons testées possèdent ce domaine de liaison cellulaire. Cependant, il est possible que le motif R-G-D du collagène de type I ne soit pas disponible pour la topo-DIDII. Ceci expliquerait qu'il n'y a pas de liaison entre la topo et le collagène I. C'est d'ailleurs le cas pour l'intégrine $\alpha\beta_3$ qui se lie au collagène via le site R-G-D. Lorsque le collagène est natif, la liaison est impossible; toutefois, après clivage par les MMP, les sites R-G-D deviennent accessibles pour la liaison (Eliceiri & Cheresch, 1999). Afin de vérifier cette hypothèse, il serait possible d'utiliser du collagène incubé avec des MMP ainsi que du collagène natif afin de refaire le test ELISA pour vérifier si, après clivage par les MMP, la liaison du collagène avec la topo-DIDII est possible.

Interaction topo-H15 et vitronectine

Nous avons observé que la vitronectine pouvait lier le fragment topo-H15 en plus du fragment topo-DIDII, reconnu par les autres molécules de la MEC sauf le collagène de type I. Un fait intéressant est que la vitronectine ne lie pas le fragment topo-DIII bien que le fragment topo-H15 soit contenu dans la séquence de la topo-DIII. Une explication plausible à cette observation serait qu'il y a une différence de conformation entre la topo-DIII et la topo-H15. Le fragment topo-DIII (201 a.a.) est plus grand que le fragment topo-H15 (84 a.a.). Il est donc possible que la topo-DIII adopte une conformation qui rende inaccessible la portion topo-H15 pour la vitronectine et donc qui empêche la liaison.

Les prédictions de structures tertiaires générées par le serveur Phyre du *Structural Bioinformatics Group* de l'*Imperial College London*, qui permet la visualisation en trois dimensions de protéines, ont permis de constater que le repliement des deux protéines n'est pas identique (non montré). Dans la structure tertiaire de la topo-DIII, la portion topo-H15 semble divisée en deux régions. Tandis que dans la structure tertiaire de la topo-H15, ces deux régions sont réunies. Il est possible que ces deux régions de la topo-H15 doivent être jointes pour qu'il y ait liaison avec la vitronectine. Il est également possible que des structures secondaires de la topo-DIII bloquent l'accès à la portion topo-H15. Ces deux possibilités expliqueraient les résultats observés.

Interactions des fragments de topo avec la surface des fibroblastes

Une étude réalisée par Hénault *et al.* en 2006 avait mis en évidence la liaison de la topo aux fibroblastes. Cette étude avait démontré que la topo relâchée par les cellules endothéliales en apoptose se liait spécifiquement aux fibroblastes, mais pas aux cellules endothéliales. Bien que la cible de la topo à la surface des fibroblastes n'ait pas encore été identifiée, il a été suggéré qu'il s'agisse d'une protéine de surface ou d'un complexe de protéines qui est capable d'effectuer un trafic de surface rapide (Hénault *et al.*, 2006).

Ces pistes nous ont dirigés vers les HS comme ligand pour la topo à la surface des fibroblastes. Il a été montré que les HS sont impliqués dans le transport à la surface cellulaire. En effet, le syndécane-4, un HSPG, est impliqué au niveau du trafic et de la localisation des protéines à la surface cellulaire (Scarpellini *et al.*, 2009). Les HS pourraient agir comme corécepteur plutôt que comme récepteur principal à la surface des fibroblastes pour la topo. D'ailleurs, le facteur de croissance des fibroblastes requière lui aussi comme corécepteur les HS, afin de stabiliser sa liaison au récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (Kurosu & Kuro-o, 2009). Les HS sont présents à la surface d'autres cellules adhérentes telles que les cellules endothéliales en plus des fibroblastes (Bernfield *et al.*, 1999 ; Alexopoulou *et al.*, 2006). Toutefois, si leur présence n'est pas spécifique aux fibroblastes, il semble que la composition des HS soit différente d'un type cellulaire à un autre. En effet, les HS d'un type cellulaire sont presque identiques peu importe l'espèce. Ceci serait dû à des différences dans les modifications retrouvées sur les chaînes d'oligosaccharides des HS (Kreuger *et al.*, 2006).

Pour des raisons pratiques, nous avons utilisé l'héparine comme analogue des HS pour représenter la surface des fibroblastes (Mahalingam *et al.*, 2007 ; Scarpellini *et al.*, 2009). Nous avons observé que la topo entière se liait effectivement à l'héparine par ELISA. Nous avons ensuite voulu identifier le fragment de la topo responsable de la liaison avec l'héparine. Nous avons observé que deux des fragments se lient à l'héparine, la topo-DIDII et la topo-N. Toutefois, c'est la topo-N qui semble être principalement responsable de l'interaction de la topo avec l'héparine, puisque son interaction est environ deux fois plus forte que celle du fragment topo-DIDII.

Les résultats d'une autre étude

Une étude limitée de la liaison des fragments de topo aux fibroblastes avait déjà été réalisée, avec les fragments topo-DIII et topo-H15. Lors de cette étude, la liaison avait été observée directement sur des fibroblastes normaux en culture, puis mise en évidence grâce à des sérums anti-topo de patients. Les résultats obtenus avaient montré que le fragment topo-DIII, mais pas le topo-H15, se liait à la surface des fibroblastes (Tremblay, 2004).

Les résultats que nous avons obtenus ne corroborent pas ceux de Tremblay, mais il faut mentionner que les deux études n'ont pas été réalisées de la même façon. La technique que nous avons employée est indirecte. Nous avons utilisé l'héparine pour représenter la surface des fibroblastes lors d'un ELISA. Tandis que pour l'autre étude, la liaison observée était directe.

Une explication possible pour ces résultats divergents est que la topo-DIII ait une cible autre que les HS. Ceci expliquerait la liaison avec les fibroblastes observée par Tremblay, mais aussi le fait que nous n'ayons pas observé de liaison entre l'héparine et la topo-DIII. Il est, par contre, aussi pertinent de se demander si l'héparine représente correctement la surface des fibroblastes.

L'authenticité des liaisons observées

Nous avons déterminé la spécificité des interactions observées à l'aide d'ELISA réalisés en conditions ioniques plus strictes. Ces ELISA ont été réalisés en présence de 1 M NaCl plutôt qu'en conditions ioniques physiologiques, dans le but d'éliminer les interactions qui sont uniquement électrostatiques. Bien que l'intensité de la liaison de la topo avec la fibronectine plasmatique, la thrombospondine, la vitronectine et l'héparine ait diminué dans ces conditions, elle est demeurée présente. Par contre, l'intensité de la liaison de la topo avec la laminine a très légèrement augmenté. Ceci peut s'expliquer par les charges de la laminine qui, étant masquées par les ions, n'interfèrent plus avec la liaison.

Ainsi, il est possible d'affirmer que les liaisons de la topo aux molécules de la MEC testées sont réellement spécifiques. La figure suivante résume les interactions des fragments de topo et des ligands testés (figure 19).

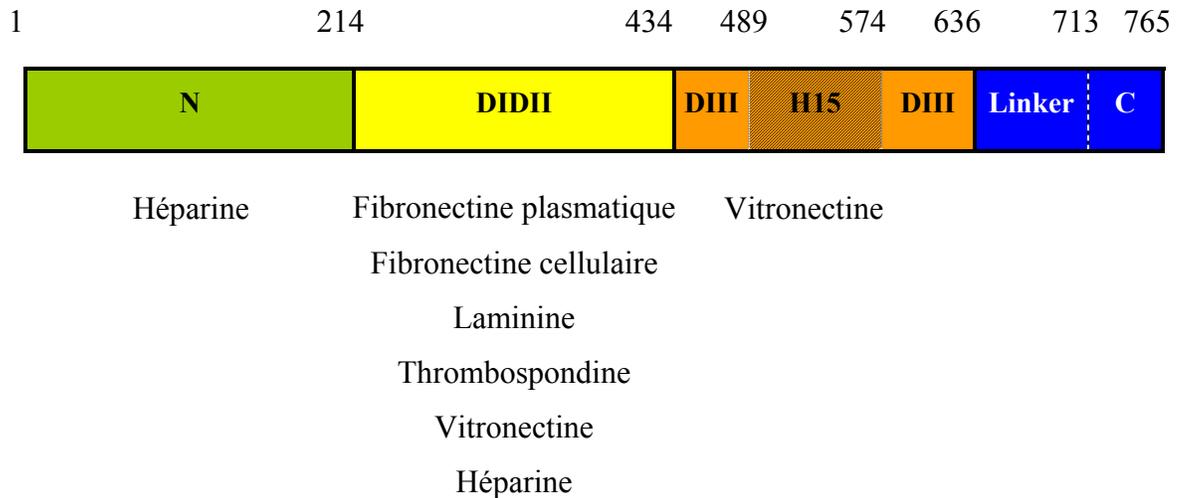


Figure 19. Représentation schématique de la structure de la topo I et de l'interaction des différents fragments avec les protéines de la matrice extracellulaire et de la surface des fibroblastes

La topo-N interagit avec l'héparine. La topo-DIDII interagit avec toutes les molécules testées : fibronectine plasmaticque, fibronectine cellulaire, laminine, thrombospondine, vitronectine et héparine. La topo-H15 interagit seulement avec la vitronectine. La topo-C et la topo-DIII n'ont montré aucune aucune interaction avec les molécules testées.

Perspectives futures

Suite à ces résultats, il serait intéressant d'étudier l'interaction des fragments de la topo avec les fibroblastes. Cela pourrait être fait par la technique du *cell ELISA* (Tremblay, 2004 ; Hénault *et al.*, 2006). Il s'agit de cultiver des fibroblastes au fond des puits d'une plaque à ELISA, puis d'ajouter les fragments de topo qui sont ensuite détectés à l'aide d'un anticorps anti-histidine. Cette expérience permettrait de comparer nos résultats de liaison aux fibroblastes obtenus de façon indirecte à des résultats de liaison directe. Il serait alors possible de constater si d'autres fragments que la topo-N et la topo-DIDII se lient aux fibroblastes.

Dans un deuxième temps, puisque nous savons que la topo-N et la topo-DIDII se lient aux HS, il serait intéressant de faire un autre *cell ELISA*, mais en traitant les fibroblastes à l'héparanase. Il s'agit d'une enzyme qui est connue pour hydrolyser les HS (Roy & Marchetti, 2009). Cette expérience permettrait de mieux évaluer le rôle des HS dans la liaison de la topo aux fibroblastes. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les HS agissent en tant que corécepteurs dans la liaison de la topo et des fragments de topo à la surface des fibroblastes. Selon cette hypothèse, il est attendu que le traitement des fibroblastes à l'héparanase provoque une diminution de l'intensité de la liaison de la topo et des fragments sans toutefois complètement l'inhiber.

Suite à ceci, il serait intéressant de pouvoir identifier la cible de la topo à la surface des fibroblastes. Hénault *et al.* en 2006 ont commencé la caractérisation de ce ligand. Ils ont mis en évidence qu'il ne s'agit pas d'un ligand de type ADN puisqu'un traitement à la DNase n'affecte pas la liaison. Ils ont également suggéré que le ligand puisse être une protéine ou un complexe de protéines dont le trafic de surface est rapide. Pour déterminer quel est le ligand principal de la topo sur les fibroblastes, il serait possible d'utiliser la technologie *protein microarray*. Il s'agit de protéines immobilisées sur une phase solide, dans le cas présent il s'agirait de toutes les protéines connues qui se retrouvent à la surface

des fibroblastes. La topo et les fragments seraient ensuite appliqués puis détectés grâce à une réaction chimiluminescente. Plus le signal de densité est fort, plus les possibilités pour que la protéine avec laquelle il y a liaison soit la cible sont élevées (Templin *et al.*, 2002). Une banque d'ADN complémentaire pourrait être réalisée avec toutes les protéines de surface cellulaire afin de produire les protéines recombinantes qui pourraient être ancrées sur le *microarray*.

Afin de s'assurer que la protéine identifiée par *microarray* est effectivement la cible, il faudrait inhiber l'expression du gène qui code pour cette protéine de surface cellulaire. La technique des siRNA pourrait être employée à cet effet. Une fois l'expression du ligand inhibé, il faudrait traiter les fibroblastes à l'héparanase pour couper les HS. Ensuite, la topo et les fragments de topo pourraient être mis en contact avec ces fibroblastes et l'absence de liaison pourrait corroborer les résultats obtenus par *microarray*.

Effets de la liaison de la topo aux fibroblastes

Par ailleurs, des résultats préliminaires ont montré que la liaison de la topo a des effets sur les fibroblastes. Il a été observé que la production d'IL-8 par les fibroblastes augmente lorsqu'il y a liaison de la topo. Une augmentation de la migration des fibroblastes a également été remarquée (Arcand, résultat non publié). L'IL-8 est une chimiokine dont le niveau est élevé dans les biopsies de peau de patients atteints de SSc. Elle est sécrétée par les macrophages et les fibroblastes pulmonaires chez les patients qui ont une fibrose pulmonaire. De plus, les effets de l'IL-8 sur les cellules endothéliales permettent l'angiogénèse, un processus nécessaire à l'affluence des fibroblastes et des cellules inflammatoires requis pour le développement de la fibrose (Atamas & White, 2003). Il serait donc intéressant de connaître quels fragments de la topo sont responsables de ces effets. Pour ce faire, il faudrait mettre des fibroblastes en contact avec les différents fragments de topo à différentes concentrations, puis mesurer la sécrétion d'IL-8 grâce à une trousse ELISA qui en permet le dosage.

En connaissant quels fragments de topo sont impliqués dans la liaison aux fibroblastes et dans le processus de fibrogenèse normale qui a lieu durant la réparation d'une blessure, il serait possible d'intervenir au niveau de ces fragments. Par exemple, il serait envisageable de bloquer leur liaison aux fibroblastes grâce à des peptides complémentaires ou encore, grâce à des anticorps spécifiques à cette région de la topo.

Provenance *in vivo* de la topo

Plusieurs protéines intranucléaires peuvent être retrouvées à l'extérieur des cellules. La topo et la *high mobility group box chromosomal protein 1* (HMGB1) en sont des exemples. Comme la topo, la HMGB1 est une protéine qui lie l'ADN. Deux mécanismes rendant disponibles les protéines intranucléaires ont été étudiés pour la HMGB1. Le premier consiste en une translocation de la protéine dans une vésicule sécrétoire, laquelle est ensuite sécrétée par exocytose, puis la protéine devient disponible à l'extérieur de la cellule (Gardella *et al.*, 2002). Le deuxième mécanisme est l'apoptose. Il semble que la HMGB1 puisse également être relâchée des cellules lors de leur apoptose (Pisetsky, 2007). Dans le milieu extracellulaire, la HMGB1 est impliquée dans des réactions inflammatoires. En effet, la HMGB1 possède des caractéristiques et des fonctions communes avec les chimiokines (Degryse & De Virgilio, 2003).

Il semble que ce soit l'apoptose qui serve à externaliser la topo. En effet, il a été possible de mettre en évidence la liaison de la topo aux fibroblastes grâce à des surnageants de cellules endothéliales en apoptose. La liaison a été détectée à l'aide d'anticorps anti-topo purifiés à partir de sérums de patients atteints de SSc. Il semble toutefois que la topo retrouvée dans les surnageants de cellules en apoptose ne soit pas la topo entière, mais plutôt un fragment de 76 à 80 kDa (Hénault *et al.*, 2006). Ces fragments sont probablement dus à l'action des caspases-3 et 6. En effet, comme plusieurs autres aAg, la topo est clivée durant l'apoptose (Samejima *et al.*, 1999).

Avenues thérapeutiques

La SSc est encore de nos jours une maladie incurable. Il n'y a pas qu'une seule médication utilisée pour traiter toute la constellation des manifestations de cette maladie, mais plutôt une thérapie pour chacun des organes impliqués (Zandman-Goddard *et al.*, 2005). Cependant, il existe maintenant des alternatives aux traitements non spécifiques, qui étaient utilisés auparavant, comme des immunosuppresseurs tels que les cyclophosphamides et les corticostéroïdes.

Il a été montré que les lymphocytes B contribuent de façon importante aux pathogénèses associées à l'autoimmunité en produisant des aAc (Tuscano *et al.*, 2002). Ceci désigne donc les lymphocytes B comme une cible intéressante pour des traitements contre la SSc. En effet, plusieurs stratégies de traitements visant directement les lymphocytes B ont été développées pour une autre maladie autoimmune, le SLE (Tieng & Peeva, 2008).

Une de ces stratégies vise à dépléter les lymphocytes B. Voici deux exemples de traitement utilisant cette stratégie : le Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique souris/humain dirigé contre l'antigène de surface CD20 situé sur les lymphocytes B et l'Epratuzumab un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'antigène de surface CD22 également situé sur les lymphocytes B (Hawker, 2008). Deux études récentes ont démontré l'efficacité du Rituximab pour traiter la SSc. En effet, il a été conclu que le Rituximab permet la déplétion des lymphocytes B circulants et dermiques, mais il ne provoque qu'une légère diminution des niveaux d'aAc associés à la SSc (Lafyatis *et al.*, 2009). Tandis que le second groupe a remarqué une amélioration de la fonction des poumons chez les patients atteints de SSc traités avec du Rituximab (Daoussis *et al.*, 2009). D'autres stratégies existent : elles consistent à bloquer les signaux de costimulation à l'aide d'anticorps monoclonaux ou encore à neutraliser les facteurs de la famille des TNF activant les lymphocytes B tels que le *BlyS* (Tieng & Peeva, 2008).

Toutefois, aucune de ces thérapies ne vise exclusivement les lymphocytes B autoréactifs. Leur utilisation diminue l'efficacité du système immunitaire et expose le patient à des risques d'infections. De plus, les anticorps monoclonaux chimériques sont immunogènes et peuvent induire le développement d'aAc contre l'agent thérapeutique lui-même (Tieng & Peeva, 2008). Bien que ces traitements ne soient pas idéaux et ne permettent toujours pas de guérir la maladie, ils en ralentissent cependant les effets. Par contre, il existe une autre stratégie actuellement utilisée pour traiter le SLE qui cible spécifiquement les lymphocytes B autoréactifs.

Cette stratégie consiste à déléter les lymphocytes B autoréactifs ou à les rendre anergiques (Tieng & Peeva, 2008). Le traitement se nomme LJP 394 ou abetimus sodium. Il consiste en quatre molécules synthétiques d'ADN double brin de 20 mers conjuguées à une plateforme de triéthylène glycol inerte. Il peut se lier aux aAc anti-ADN en solution de même qu'aux récepteurs des lymphocytes B menant ainsi à l'anergie ou à l'apoptose de la cellule en absence de signaux de costimulation. Il semble que lorsqu'il est utilisé pour traiter le SLE, le LJP 394 permet une diminution des niveaux d'aAc anti-ADN (Alarcón-Segovia *et al.*, 2003). Il s'agit d'un principe qui pourrait être applicable pour la SSc; il faudrait cependant remplacer les quatre molécules d'ADN par des épitopes de la topo pour qu'elles puissent se lier aux aAc anti-topo présents dans la SSc.

Il existe aussi des traitements qui visent à réduire la fibrose. Les anticorps anti-TGF- β , le Relaxin et le Pirfenidone sont des exemples d'agents antifibrotiques récemment utilisés dans le traitement de la SSc, certains avec des résultats prometteurs (Bournia *et al.*, 2009). Néanmoins, une meilleure connaissance des interactions de la topo avec la MEC et avec les fibroblastes de même que de son rôle et de celui des aAc anti-topo dans la SSc est essentiel pour le développement d'un traitement plus ciblé empêchant la progression de la maladie et permettant même sa régression.

Bibliographie

- Adams, J. C. (2001). Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 25-51.
- Akbarali, Y., Matousek-Ronck, J., Hunt, L., Staudt, L., Reichlin, M., Guthridge, J. M., and James, J. A. (2006). Fine specificity mapping of autoantigens targeted by anti-centromere autoantibodies. *J Autoimmun* **27**, 272-80.
- Alarcon-Segovia, D., Tumlin, J. A., Furie, R. A., McKay, J. D., Cardiel, M. H., Strand, V., Bagin, R. G., Linnik, M. D., and Hepburn, B. (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.
- Albert, L. J., and Inman, R. D. (1999). Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* **341**, 2068-74.
- Alexopoulou, A. N., Multhaupt, H. A., and Couchman, J. R. (2007). Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 505-28.
- Allcock, R. J., Forrest, I., Corris, P. A., Crook, P. R., and Griffiths, I. D. (2004). A study of the prevalence of systemic sclerosis in northeast England. *Rheumatology (Oxford)* **43**, 596-602.
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395-401.

- Arnett, F. C., Howard, R. F., Tan, F., Moulds, J. M., Bias, W. B., Durban, E., Cameron, H. D., Paxton, G., Hodge, T. J., Weathers, P. E., and Reveille, J. D. (1996). Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum* **39**, 1362-70.
- Atamas, S. P., and White, B. (2003). The role of chemokines in the pathogenesis of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* **15**, 772-7.
- Baker, N. M., Rajan, R., and Mondragon, A. (2009). Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Res* **37**, 693-701.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68**, 729-77.
- Bournia, V. K., Vlachoyiannopoulos, P. G., Selmi, C., Moutsopoulos, H. M., and Gershwin, M. E. (2009). Recent advances in the treatment of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **36**, 176-200.
- Brown, L. F., Dubin, D., Lavigne, L., Logan, B., Dvorak, H. F., and Van de Water, L. (1993). Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. *Am J Pathol* **142**, 793-801.
- Bucala, R., Spiegel, L. A., Chesney, J., Hogan, M., and Cerami, A. (1994). Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* **1**, 71-81.

- Buzza, M. S., Zamurs, L., Sun, J., Bird, C. H., Smith, A. I., Trapani, J. A., Froelich, C. J., Nice, E. C., and Bird, P. I. (2005). Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem* **280**, 23549-58.
- Casciola-Rosen, L., Wigley, F., and Rosen, A. (1997). Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J Exp Med* **185**, 71-9.
- Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* **179**, 1317-30.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**, 369-413.
- Chen, Y., Leask, A., Abraham, D. J., Pala, D., Shiwen, X., Khan, K., Liu, S., Carter, D. E., Wilcox-Adelman, S., Goetinck, P., Denton, C. P., Black, C. M., Pitsillides, A. A., Sarraf, C. E., and Eastwood, M. (2008). Heparan sulfate-dependent ERK activation contributes to the overexpression of fibrotic proteins and enhanced contraction by scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **58**, 577-85.
- Cherny, R. C., Honan, M. A., and Thiagarajan, P. (1993). Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid in vitronectin abolishes cell adhesion. *J Biol Chem* **268**, 9725-9.

- Chiffot, H., Fautrel, B., Sordet, C., Chatelus, E., and Sibilia, J. (2008). Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* **37**, 223-35.
- Clark, R. A., An, J. Q., Greiling, D., Khan, A., and Schwarzbauer, J. E. (2003). Fibroblast migration on fibronectin requires three distinct functional domains. *J Invest Dermatol* **121**, 695-705.
- Clements, P.J. and Furst, D.E., (2004) *Systemic sclerosis*. 2nd edn. Lipincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Couchman, J. R. (2003). Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 926-37.
- Cram, D. S., Fisicaro, N., McNeilage, L. J., Coppel, R. L., and Harrison, L. C. (1993). Antibody specificities of Thai and Australian scleroderma sera with topoisomerase I recombinant fusion proteins. *J Immunol* **151**, 6872-81.
- Daoussis, D., Liosis, S. N., Tsamandas, A. C., Kalogeropoulou, C., Kazantzi, A., Sirinian, C., Karampetsou, M., Yiannopoulos, G., and Andonopoulos, A. P. (2009). Experience with rituximab in scleroderma: results from a 1-year, proof-of-principle study. *Rheumatology (Oxford)*.
- Degryse, B., and de Virgilio, M. (2003). The nuclear protein HMGB1, a new kind of chemokine? *FEBS Lett* **553**, 11-7.

- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* **2**, 1032-9.
- Derk, C. T., and Jimenez, S. A. (2003). Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun Rev* **2**, 181-91.
- Dick, T., Mierau, R., Bartz-Bazzanella, P., Alavi, M., Stoyanova-Scholz, M., Kindler, J., and Genth, E. (2002). Coexistence of antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **61**, 121-7.
- Elenius, K., Vainio, S., Laato, M., Salmivirta, M., Thesleff, I., and Jalkanen, M. (1991). Induced expression of syndecan in healing wounds. *J Cell Biol* **114**, 585-95.
- Eliceiri, B. P., and Cheresch, D. A. (1999). The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* **103**, 1227-30.
- Englert, H., Small-McMahon, J., Davis, K., O'Connor, H., Chambers, P., and Brooks, P. (1999). Systemic sclerosis prevalence and mortality in Sydney 1974-88. *Aust N Z J Med* **29**, 42-50.
- Erat, M. C., Slatter, D. A., Lowe, E. D., Millard, C. J., Farndale, R. W., Campbell, I. D., and Vakonakis, I. (2009). Identification and structural analysis of type I collagen sites in complex with fibronectin fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4195-200.

- Fears, C. Y., and Woods, A. (2006). The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol* **25**, 443-56.
- Gailit, J., Welch, M. P., and Clark, R. A. (1994). TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* **103**, 221-7.
- Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L. V., Torrisi, M. R., Bianchi, M. E., and Rubartelli, A. (2002). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* **3**, 995-1001.
- Geirsson, A. J., Steinsson, K., Guthmundsson, S., and Sigurthsson, V. (1994). Systemic sclerosis in Iceland. A nationwide epidemiological study. *Ann Rheum Dis* **53**, 502-5.
- Gu, Y. S., Kong, J., Cheema, G. S., Keen, C. L., Wick, G., and Gershwin, M. E. (2008). The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* **38**, 132-60.
- Har-el, R., and Tanzer, M. L. (1993). Extracellular matrix. 3: Evolution of the extracellular matrix in invertebrates. *FASEB J* **7**, 1115-23.
- Harris, M. L., and Rosen, A. (2003). Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* **15**, 778-84.
- Hasegawa, M., Fujimoto, M., Takehara, K., and Sato, S. (2005). Pathogenesis of systemic sclerosis: altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *J Dermatol Sci* **39**, 1-7.

- Hawker, K. (2008). B-cell-targeted treatment for multiple sclerosis: mechanism of action and clinical data. *Curr Opin Neurol* **21 Suppl 1**, S19-25.
- Hellebust, H., Uhlen, M., and Enfors, S. O. (1990). Interaction between heat shock protein DnaK and recombinant staphylococcal protein A. *J Bacteriol* **172**, 5030-4.
- Henault, J., Robitaille, G., Senecal, J. L., and Raymond, Y. (2006). DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* **54**, 963-73.
- Henault, J., Tremblay, M., Clement, I., Raymond, Y., and 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.
- Hertle, M. D., Jones, P. H., Groves, R. W., Hudson, D. L., and Watt, F. M. (1995). Integrin expression by human epidermal keratinocytes can be modulated by interferon-gamma, transforming growth factor-beta, tumor necrosis factor-alpha, and culture on a dermal equivalent. *J Invest Dermatol* **104**, 260-5.
- Hesselstrand, R., Scheja, A., and Akesson, A. (1998). Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis* **57**, 682-6.
- Hildebrandt, S., Weiner, E. S., Senecal, J. L., Noell, G. S., Earnshaw, W. C., and Rothfield, N. F. (1990). Autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70): analysis by gel diffusion, immunoblot, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Immunol Immunopathol* **57**, 399-410.

- Ho, K. T., and Reveille, J. D. (2003). The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* **5**, 80-93.
- Hochberg, M.C., Silman, A.J., Smolen, J.S., Weinblatt, M.E. and Weisman, M.H., (2008) *Rheumatology*. 4th edn. Mosby Elsevier. Philadelphia.
- Hohenester, E., and Engel, J. (2002). Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* **21**, 115-28.
- Hoyles, R. K., Khan, K., Shiwen, X., Howat, S. L., Lindahl, G. E., Leoni, P., du Bois, R. M., Wells, A. U., Black, C. M., Abraham, D. J., and Denton, C. P. (2008). Fibroblast-specific perturbation of transforming growth factor beta signaling provides insight into potential pathogenic mechanisms of scleroderma-associated lung fibrosis: exaggerated response to alveolar epithelial injury in a novel mouse model. *Arthritis Rheum* **58**, 1175-88.
- Hsieh, C. S., Heimberger, A. B., Gold, J. S., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1992). Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6065-9.
- Hsu, T. C., Lee, T. L., and Tsay, G. J. (1997). Autoantigen components recognizable by scleroderma sera are exported via ectocytosis of fibroblasts. *Br J Rheumatol* **36**, 1038-44.
- Hu, P. Q., Fertig, N., Medsger, T. A., Jr., and 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.

- Hu, P. Q., Fertig, N., Medsger, T. A., Jr., and Wright, T. M. (2004). Molecular recognition patterns of serum anti-DNA topoisomerase I antibody in systemic sclerosis. *J Immunol* **173**, 2834-41.
- Ihn, H. (2002). Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* **14**, 681-5.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M.J., (2003) *Immunobiologie : Le système immunitaire fondamentale et pathologique*. 2^e édition. De Boeck. Paris.
- Jones, J. C., Dehart, G. W., Gonzales, M., and Goldfinger, L. E. (2000). Laminins: an overview. *Microsc Res Tech* **51**, 211-3.
- Kornblihtt, A. R., and Gutman, A. (1988). Molecular biology of the extracellular matrix proteins. *Biol Rev Camb Philos Soc* **63**, 465-507.
- Kreuger, J., Spillmann, D., Li, J. P., and Lindahl, U. (2006). Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J Cell Biol* **174**, 323-7.
- Kubo, M., Ihn, H., Yamane, K., and Tamaki, K. (2002). Upregulated expression of transforming growth factor-beta receptors in dermal fibroblasts of skin sections from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* **29**, 2558-64.
- Kurien, B. T., and Scofield, R. H. (2008). Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev* **7**, 567-73.
- Kurosu, H., and Kuro, O. M. (2009). Endocrine fibroblast growth factors as regulators of metabolic homeostasis. *Biofactors* **35**, 52-60.

- Kuwana, M., Kaburaki, J., Arnett, F. C., Howard, R. F., Medsger, T. A., Jr., and Wright, T. M. (1999a). 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.
- Kuwana, M., Kaburaki, J., Medsger, T. A., Jr., and Wright, T. M. (1999b). An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum* **42**, 1179-88.
- Kuwana, M., Kaburaki, J., Mimori, T., Kawakami, Y., and Tojo, T. (2000a). Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **43**, 1074-84.
- Kuwana, M., Kaburaki, J., Mimori, T., Tojo, T., and Homma, M. (1993). Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I. Clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **36**, 1406-13.
- Kuwana, M., Medsger, T. A., Jr., and 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.
- Kuwana, M., Medsger, T. A., Jr., and 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.

- Kuwana, M., Medsger, T. A., Jr., and Wright, T. M. (2000b). 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.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lafyatis, R., Kissin, E., York, M., Farina, G., Viger, K., Fritzler, M. J., Merkel, P. A., and Simms, R. W. (2009). B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **60**, 578-83.
- Leitinger, B., and Hohenester, E. (2007). Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* **26**, 146-55.
- Leppard, J. B., and Champoux, J. J. (2005). Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* **114**, 75-85.
- Leroy, E. C. (1972). Connective tissue synthesis by scleroderma skin fibroblasts in cell culture. *J Exp Med* **135**, 1351-62.
- Lim, P. L., and Zouali, M. (2006). Pathogenic autoantibodies: emerging insights into tissue injury. *Immunol Lett* **103**, 17-26.
- Lin, C. Q., and Bissell, M. J. (1993). Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J* **7**, 737-43.

- Madden, K. R., Stewart, L., and Champoux, J. J. (1995). Preferential binding of human topoisomerase I to superhelical DNA. *EMBO J* **14**, 5399-409.
- Mahalingam, Y., Gallagher, J. T., and Couchman, J. R. (2007). Cellular adhesion responses to the heparin-binding (HepII) domain of fibronectin require heparan sulfate with specific properties. *J Biol Chem* **282**, 3221-30.
- Mahler, M., Mierau, R., Genth, E., and Bluthner, M. (2002). Development of a CENP-A/CENP-B-specific immune response in a patient with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **46**, 1866-72.
- Maricq, H. R., Weinrich, M. C., Keil, J. E., Smith, E. A., Harper, F. E., Nussbaum, A. I., LeRoy, E. C., McGregor, A. R., Diat, F., and Rosal, E. J. (1989). Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum* **32**, 998-1006.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81.
- Maul, G. G., Jimenez, S. A., Riggs, E., and 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 U S A* **86**, 8492-6.
- Mayes, M. D. (1996). Scleroderma epidemiology. *Rheum Dis Clin North Am* **22**, 751-64.

- Michet, C. J., Jr., McKenna, C. H., Elveback, L. R., Kaslow, R. A., and Kurland, L. T. (1985). Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc* **60**, 105-13.
- Miner, J. H. (2008). Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech* **71**, 349-56.
- Morgan, M. R., Humphries, M. J., and Bass, M. D. (2007). Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 957-69.
- Navratil, J. S., Sabatine, J. M., and Ahearn, J. M. (2004). Apoptosis and immune responses to self. *Rheum Dis Clin North Am* **30**, 193-212.
- O'Toole, E. A. (2001). Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol* **26**, 525-30.
- Oppenheim, J. J., Dong, H. F., Plotz, P., Caspi, R. R., Dykstra, M., Pierce, S., Martin, R., Carlos, C., Finn, O., Koul, O., and Howard, O. M. (2005). Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J Leukoc Biol* **77**, 854-61.
- Pankov, R., and Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* **115**, 3861-3.
- Park, P. W., Reizes, O., and Bernfield, M. (2000). Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J Biol Chem* **275**, 29923-6.
- Pisetsky, D. S. (2007). The role of nuclear macromolecules in innate immunity. *Proc Am Thorac Soc* **4**, 258-62.

- Preissner, K. T. (1991). Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 275-310.
- Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J., and Hol, W. G. (1998). Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* **279**, 1504-13.
- Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med* **185**, 461-9.
- Rizou, C., Ioannidis, J. P., Panou-Pomonis, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Moutsopoulos, H. M., and Vlachoyiannopoulos, P. G. (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.
- Roberts-Thomson, P. J., Jones, M., Hakendorf, P., Kencana Dharmapatni, A. A., Walker, J. G., MacFarlane, J. G., Smith, M. D., and Ahern, M. J. (2001). Scleroderma in South Australia: epidemiological observations of possible pathogenic significance. *Intern Med J* **31**, 220-9.
- Roy, M., and Marchetti, D. (2009). Cell surface heparan sulfate released by heparanase promotes melanoma cell migration and angiogenesis. *J Cell Biochem* **106**, 200-9.
- Ruoslahti, E., Hayman, E. G., and Pierschbacher, M. D. (1985). Extracellular matrices and cell adhesion. *Arteriosclerosis* **5**, 581-94.

- Sakkas, L. I., and Platsoucas, C. D. (2004). Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* **50**, 1721-33.
- Samejima, K., Svingen, P. A., Basi, G. S., Kottke, T., Mesner, P. W., Jr., Stewart, L., Durrieu, F., Poirier, G. G., Alnemri, E. S., Champoux, J. J., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (1999). Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 4335-40.
- Scarpellini, A., Germack, R., Lortat-Jacob, H., Muramitsu, T., Johnson, T. S., Billett, E., and Verderio, E. A. (2009). Heparan sulphate proteoglycans are receptors for the cell-surface trafficking and biological activity of transglutaminase-2. *J Biol Chem*.
- Scheja, A., Hellmer, G., Wollheim, F. A., and Akesson, A. (1993). Carboxyterminal type I procollagen peptide concentrations in systemic sclerosis: higher levels in early diffuse disease. *Br J Rheumatol* **32**, 59-62.
- Schultz, G. S., and Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* **17**, 153-62.
- Scussel-Lonzetti, L., Joyal, F., Raynaud, J. P., Roussin, A., Rich, E., Goulet, J. R., Raymond, Y., and Senecal, J. L. (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.
- Senecal, J. L., Henault, J., and Raymond, Y. (2005). The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol* **32**, 1643-9.

- Silman, A., Jannini, S., Symmons, D., and Bacon, P. (1988). An epidemiological study of scleroderma in the West Midlands. *Br J Rheumatol* **27**, 286-90.
- Sissi, C., and Palumbo, M. (2009). Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. *Nucleic Acids Res* **37**, 702-11.
- Skhirtladze, C., Distler, O., Dees, C., Akhmetshina, A., Busch, N., Venalis, P., Zwerina, J., Spriewald, B., Pileckyte, M., Schett, G., and Distler, J. H. (2008). Src kinases in systemic sclerosis: central roles in fibroblast activation and in skin fibrosis. *Arthritis Rheum* **58**, 1475-84.
- Stewart, L., Ireton, G. C., Parker, L. H., Madden, K. R., and Champoux, J. J. (1996a). Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I. *J Biol Chem* **271**, 7593-601.
- Stewart, L., Ireton, G. C., and Champoux, J. J. (1996b). The domain organization of human topoisomerase I. *J Biol Chem* **271**, 7602-8.
- Stewart, L., Redinbo, M. R., Qiu, X., Hol, W. G., and Champoux, J. J. (1998). A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science* **279**, 1534-41.
- Stringer, S. E., and Gallagher, J. T. (1997). Heparan sulphate. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 709-14.
- Subramanian, S. V., Fitzgerald, M. L., and Bernfield, M. (1997). Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem* **272**, 14713-20.

- Tager, A. M., LaCamera, P., Shea, B. S., Campanella, G. S., Selman, M., Zhao, Z., Polosukhin, V., Wain, J., Karimi-Shah, B. A., Kim, N. D., Hart, W. K., Pardo, A., Blackwell, T. S., Xu, Y., Chun, J., and Luster, A. D. (2008). The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* **14**, 45-54.
- Tamaki, T., Mori, S., and Takehara, K. (1991). Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo. *Arch Dermatol Res* **283**, 366-71.
- Tamby, M. C., Chanseaud, Y., Guillevin, L., and Mouthon, L. (2003). New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* **2**, 152-7.
- Tan, K., Duquette, M., Liu, J. H., Zhang, R., Joachimiak, A., Wang, J. H., and Lawler, J. (2006). The structures of the thrombospondin-1 N-terminal domain and its complex with a synthetic pentameric heparin. *Structure* **14**, 33-42.
- Tanzer, M. L. (2006). Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci* **11**, 326-31.
- Templin, M. F., Stoll, D., Schrenk, M., Traub, P. C., Vohringer, C. F., and Joos, T. O. (2002). Protein microarray technology. *Trends Biotechnol* **20**, 160-6.
- Tieng, A. T., and Peeva, E. (2008). B-cell-directed therapies in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* **38**, 218-27.
- Tkachenko, E., Rhodes, J. M., and Simons, M. (2005). Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* **96**, 488-500.

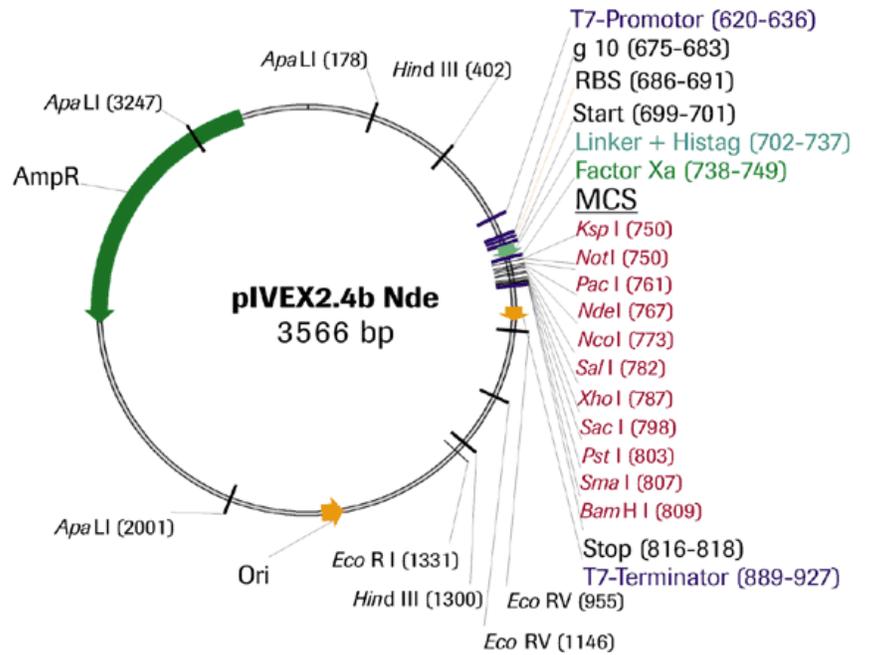
- Tremblay, M., (2004) *Les autoanticorps anti-ADN topoisomérase I dans la sclérose systémique : interaction directe avec les fibroblastes médiée par l'autoantigène*. Université de Montréal. Montréal.
- Tuscano, J. M., Harris, G. S., and Tedder, T. F. (2003). B lymphocytes contribute to autoimmune disease pathogenesis: current trends and clinical implications. *Autoimmun Rev* **2**, 101-8.
- Varga, J., and Bashey, R. I. (1995). Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* **12**, 187-99.
- Vazquez-Abad, D., Monteon, V., Senecal, J. L., Walsh, S., and Rothfield, N. (1997). Analysis of IgG subclasses of human antitopoisomerase I autoantibodies suggests chronic B cell stimulation. *Clin Immunol Immunopathol* **84**, 65-72.
- Veeraraghavan, S., Renzoni, E. A., Jeal, H., Jones, M., Hammer, J., Wells, A. U., Black, C. M., Welsh, K. I., and du Bois, R. M. (2004). Mapping of the immunodominant T cell epitopes of the protein topoisomerase I. *Ann Rheum Dis* **63**, 982-7.
- Verheijen, R., Van den Hoogen, F., Beijer, R., Richter, A., Penner, E., Habets, W. J., and van Venrooij, W. J. (1990). A recombinant topoisomerase I used for autoantibody detection in sera from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* **80**, 38-43.
- Walker, J. G., and Fritzler, M. J. (2007). Update on autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* **19**, 580-91.
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 430-40.

- Wong, C., Sridhara, S., Bardwell, J. C., and Jakob, U. (2000). Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques* **28**, 426-8, 430, 432.
- Wynn, T. A. (2004). Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* **4**, 583-94.
- Wynn, T. A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* **117**, 524-9.
- Yamada, K. M., and Kennedy, D. W. (1984). Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J Cell Biol* **99**, 29-36.
- Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Meguro-Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y., and Matsumoto, M. (2008). Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med* **205**, 2827-38.
- Yuan, W., and Varga, J. (2001). Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem* **276**, 38502-10.
- Zandman-Goddard, G., Tweezer-Zaks, N., and Shoenfeld, Y. (2005). New therapeutic strategies for systemic sclerosis--a critical analysis of the literature. *Clin Dev Immunol* **12**, 165-73.

Annexe

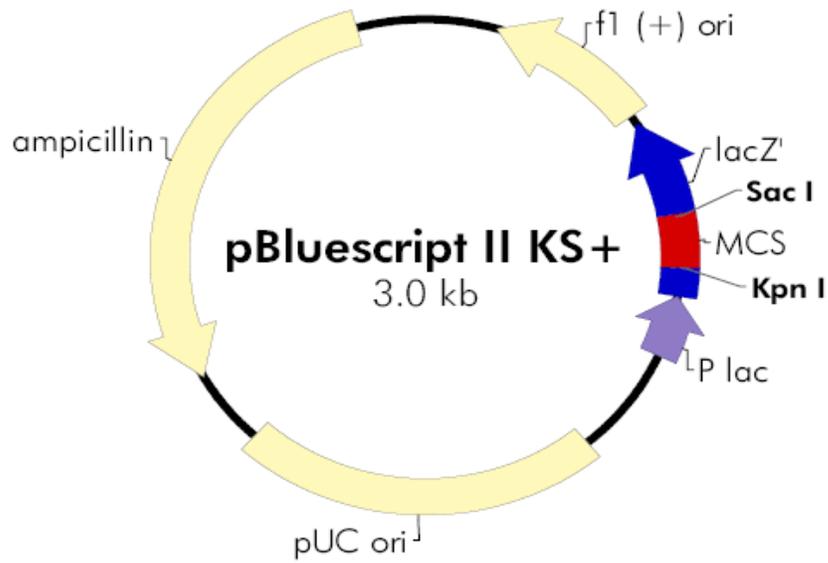
Annexe I- Carte des vecteurs utilisés

(a) pIVEX2.4b/Nde

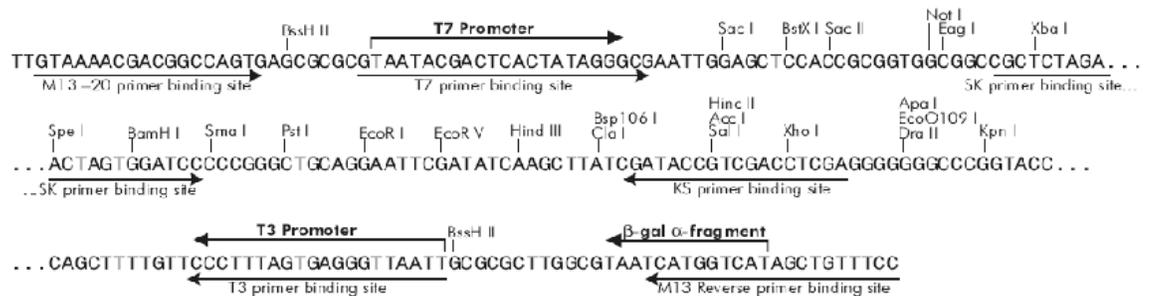


	T7-Promotor				
601	GATCTCGATC CTAGAGCTAG	CCGCGAAATT GGCGCTTTAA	AATACGACTC TTATGCTGAG	ACTATAGGGA TGATATCCCT	GACCACAACG CTGGTGTTCG
	g10 ε				
651	GTTTCCCTCT CAAAGGGAGA	AGAAATAATT TCTTTATTAA	TTGTTTAACT AACAAATTGA	TTAAGAAGGA AATTCCTCCT	GATATACC AT CTATATGGTA Me
	Linker	Histag			KspI
701	GTCTGGTTCT CAGACCAAGA tSerGlySer	CATCATCATC GTAGTAGTAG HisHisHisH	ATCATCATAG TAGTAGTATC isHisHisSe	CAGCGGCATC GTCGCCGTAG rSerGlyIle	GAAGGCCGCG CTTCCGGCCG GluGlyArgG
	NotI PacI	NdeI	NcoI	SalI XhoI	SacI PstI
751	GCCGCTTAAT CGCGAAATTA lyArgLeuIl	TAAACATATG ATTTGTATAC eLysHisMet	ACCATGGCAA TGGTACCGTT ThrMetAlaS	GTCGACTCGA CAGCTGAGCT erArgLeuGl	GCGAGCTCTG CGCTCGAGAC uArgAlaLeu
	SmaIBamHI				
801	CAGCCCCGGA GTCGGGCCCT GlnProGlyI	TCCGGTAAGA AGGCCATCT leArg***	TCCGGCTGCT AGGCCGACGA	AACAAAGCCC TTGTTTCGGG	GAAAGGAAGC CTTTCCTTCG

(b) pbluescript II SK(+)



**pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)**



(B) Bande correspondant à la DnaK

A7ZHA4 (100%), 69 116,1 Da

DNAK_ECO24 Chaperone protein dnaK [Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC)]

29 unique peptides, 37 unique spectra, 164 total spectra, 324/638 amino acids (51% coverage)

MGK I I G I D L G	T T N S C V A I M D	G T T P R V L E N A	E G D R T T P S I I
A Y T Q D G E T L V	G Q P A K R Q A V T	N P Q N T L F A I K	R L I G R R F Q D E
E V Q R D V S I M P	F K I I A A D N G D	A W V E V K G Q K M	A P P Q I S A E V L
K K M K K T A E D Y	L G E P V T E A V I	T V P A Y F N D A Q	R Q A T K D A G R I
A G L E V K R I I N	E P T A A A L A Y G	L D K G T G N R T I	A V Y D L G G G T F
D I S I I E I D E V	D G E K T F E V L A	T N G D T H L G G E	D F D S R L I N Y L
V E E F K K D Q G I	D L R N D P L A M Q	R L K E A A E K A K	I E L S S A Q Q T D
V N L P Y I T A D A	T G P K H M N I K V	T R A K L E S L V E	D L V N R S I E P L
K V A L Q D A G L S	V S D I D D V I L V	G G Q T R M P M V Q	K K V A E F F G K E
P R K D V N P D E A	V A I G A A V Q G G	V L T G D V K D V L	L L D V T P L S L G
I E T M G G V M T T	L I A K N T T I P T	K H S Q V F S T A E	D N Q S A V T I H V
L Q G E R K R A A D	N K S L G Q F N L D	G I N P A P R G M P	Q I E V T F D I D A
D G I L H V S A K D	K N S G K E Q K I T	I K A S S G L N E D	E I Q K M V R D A E
A N A E A D R K F E	E L V Q T R N Q G D	H L L H S T R K Q V	E E A G D K L P A D
D K T A I E S A L T	A L E T A L K G E D	K A A I E A K M Q E	L A Q V S Q K L M E
I A Q Q Q H A Q Q Q	T A G A D A S A N N	A K D D D V V D A E	F E E V K D K K