

Université de Montréal

**Le rôle des protéines apoptotiques dans la  
physiopathologie de la sclérose systémique chez l'humain**

par

Martin Paradis

Programme de sciences biomédicales

Faculté de médecine

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

Août, 2003

© Martin Paradis, 2003



W  
4  
U58  
2004  
V.020

Direction des bibliothèques

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Le rôle des protéines apoptotiques dans la  
physiopathologie de la sclérose systémique chez l'humain**

présenté par :  
Martin Paradis

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Luc DesGroseillers, président-rapporteur  
Tamara Grodzicky, directeur de recherche  
Yves Raymond, co-directeur de recherche  
Richard Bertrand, membre du jury

## Résumé

La sclérodermie (sclérose systémique, SSc) est une maladie auto-immune débilitante des tissus conjonctifs d'origine inconnue, mais où les fibroblastes sont à la source d'une fibrose incontrôlée. Puisque le dérèglement de l'apoptose est à l'origine de plusieurs maladies auto-immunes, nous proposons que la survie prolongée des fibroblastes de la peau des patients SSc soit causée par une différence dans l'expression de certaines protéines apoptotiques. Des biopsies de peau lésionnelle et non-lésionnelle de 6 patients SSc diffus, 1 limité et 5 témoins ont été obtenues. Les fibroblastes ont été isolés et mis en culture primaire. Des patients diffus, 4 étaient sévèrement atteints. Les études de prolifération, utilisant le nocodazole pour accumuler les cellules en G<sub>2</sub>/M et l'incorporation de BrdU, ont démontré que les fibroblastes SSc proliféraient moins que ceux des témoins. Les résultats d'immunobuvardages ont montré une sur-expression de l'actine  $\alpha$  des muscles lisses ( $\alpha$ -sma), un marqueur des myofibroblastes, chez 3 des 4 patients sévèrement atteints. La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, source de fibrose, est caractéristique de la SSc. Les fibroblastes lésionnels de presque tous les patients exprimaient plus fortement l' $\alpha$ -sma que les non-lésionnels. Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, était sous-exprimée dans tous les fibroblastes lésionnels, plus spécifiquement ceux des 3 patients sévèrement atteints. La survivin, une autre protéine anti-apoptotique, était aussi sous-exprimée par les fibroblastes des 3 patients sévèrement atteints, et ce, pour les deux types de peaux. Mcl-1 et c-IAP-1, des protéines anti-apoptotiques, et p53, pro-apoptotique, étaient principalement sous-exprimées

dans les fibroblastes lésionnels des patients. Les résultats d'immunofluorescence en double marquage ont permis d'établir une corrélation entre la présence accrue de myofibroblastes et la sous-expression de survivin dans les populations de fibroblastes SSc. La sous-expression de survivin dans les fibroblastes non-lésionnels semble être un événement précoce chez les patients diffus sévèrement atteints. La présence importante de myofibroblastes chez les fibroblastes de patients sévèrement atteints est associée à une prolifération cellulaire ralentie et, en plus, à la sous-expression de plusieurs protéines apoptotiques. La sous-expression de plusieurs protéines apoptotiques, peut-être causée par les myofibroblastes, dans des fibroblastes issus de biopsies de peau de patients SSc semble démontrer l'implication de l'apoptose dans la maladie. Des recherches futures seront nécessaires pour trouver l'origine de la SSc afin de mieux comprendre le dérèglement de l'apoptose dans cette maladie très complexe.

**Mots-clés :** Sclérodermie, sclérose systémique, apoptose, fibroblaste, myofibroblaste, survivin, Bcl-2

## Abstract

Scleroderma (systemic sclerosis, SSc), an auto-immune disease, is a debilitating connective tissue disease of unknown cause resulting in progressive fibrosis due to fibroblast overgrowth. Since apoptosis or programmed cell death is implicated in many autoimmune diseases, we hypothesized that prolonged survival of skin fibroblasts could be due to varying expression levels of apoptotic proteins in SSc patients. Biopsies were obtained from 6 diffuse SSc patients, 1 limited and 5 controls. Fibroblasts were isolated and put in primary culture. From diffuse patients, 4 had severe SSc. Proliferation studies, using nocodazole to accumulate cells in G<sub>2</sub>/M phase and BrdU incorporation, demonstrated lower proliferation rates by SSc fibroblasts than controls. Immunoblot results showed an overexpression of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma), a specific myofibroblast marker, in 3 severe SSc patients. Myofibroblasts causing fibrosis, differentiated from fibroblasts, are common in SSc. Moreover lesional fibroblasts expressed more  $\alpha$ -sma than non-lesional fibroblasts. Bcl-2, an anti-apoptotic protein, was underexpressed in all lesional fibroblasts, especially in those of 3 severe SSc patients. Survivin, another anti-apoptotic protein, was under-expressed in both skin types of 3 severe SSc patients. Other results demonstrated under-expression of Mcl-1 and c-IAP-1, both anti-apoptotic proteins, and pro-apoptotic p53, mainly in lesional fibroblasts. Double staining immunofluorescence showed that survivin expression was inversely correlated with the presence of cells expressing  $\alpha$ -sma, i.e. myofibroblasts. Survivin underexpression in non-lesional fibroblasts appeared to be an

early event in severe diffuse SSc patients. Finally, the strong presence of myofibroblasts, in culture from patients with severe SSc, was associated with a low proliferation rate and underexpression of several apoptotic proteins. Underexpression of several apoptotic proteins, perhaps by myofibroblasts, in fibroblasts from skin biopsies of SSc patients supports a role for apoptosis in this disease. Further experiments will be needed to determine the exact cause of SSc and to better understand the role of apoptosis in this complex disease.

**Keywords :** Scleroderma, systemic sclerosis, apoptosis, fibroblast, myofibroblast, survivin,

Bcl-2

## Table des matières

Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Abbréviations.....	xii
Remerciements.....	xviii
Introduction.....	1
1. La sclérodermie.....	1
1.1. Phénomène clinique.....	5
1.2. Pathogenèse.....	5
1.3. Mécanismes auto-immunitaires.....	10
1.4 Origine de la sclérodermie.....	12
1.4.1. Facteurs environnementaux.....	12
1.4.2. Agents infectieux.....	13
1.4.3. Microchimérisme.....	16
2. Fibrose.....	17
3. Myofibroblastes.....	20
4. Apoptose.....	23
4.1. Caractéristiques générales de l'apoptose.....	23
4.2. Voies apoptotiques.....	24
4.3. Nécrose et apoptose.....	30
4.4. Protéines apoptotiques.....	33
4.4.1. Bcl-2.....	33
4.4.2. Mcl-1.....	35
4.4.3. Bax.....	35
4.4.4. Bcl-x <sub>L</sub> .....	37
4.4.5. Survivin.....	38
4.4.6. c-IAP-1.....	39

4.4.7. FlipL.....	40
4.4.8. P53.....	42
4.4.9. Caspase-3.....	44
4.5. L'apoptose dans la sclérodermie.....	45
5. Objectifs.....	48
Matériel et Méthode.....	50
1. Description des patients.....	50
2. Culture cellulaire.....	51
3. Études de prolifération.....	52
4. Dosage protéique.....	53
5.Électrophorèse, transfert et immunobuvardage.....	54
6. RT-PCR.....	56
7. Immunofluorescence.....	58
8. Études de corrélation.....	59
Résultats.....	60
1. Échantillons : témoins et patients.....	60
2. Études de prolifération.....	62
3. Expression de molécules du cytosquelette.....	66
4. Expression de molécules apoptotiques.....	68
4.1. Molécules pro-apoptotiques.....	69
4.2. Molécules anti-apoptotiques.....	70
4.3. ARNm de certaines protéines apoptotiques.....	74
5. Immunofluorescence.....	77
6. Études de corrélation.....	82
Discussion.....	86
1. Études de prolifération cellulaire.....	86
2. Expression de l' $\alpha$ -sma.....	89
3. Expression de molécules apoptotiques.....	93

3.1. Bcl-2.....	93
3.2. Survivin.....	95
3.3. Autres protéines apoptotiques.....	99
Conclusion et perspectives.....	104
Bibliographie.....	108
Annexe .....	I

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Fonctions de plusieurs cytokines ayant un rôle possible dans la sclérose systémique.....	9
<b>Tableau II :</b> Données démographiques et cliniques des patients et témoins.....	61
<b>Tableau III :</b> Évaluation sommaire des résultats d'immunobuvardages.....	75

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique illustrant les évènements de roulement, de fixation, d'adhésion ferme et de diapédèse.....	8
<b>Figure 2</b> : Représentation des deux principales voies apoptotiques.....	26
<b>Figure 3</b> : Représentation de la mort cellulaire induite par les cellules T cytotoxiques.....	29
<b>Figure 4</b> : Différence entre la nécrose et l'apoptose.....	31
<b>Figure 5</b> : Histogramme du cycle cellulaire des fibroblastes traités au nocodazole.....	64
<b>Figure 6</b> : Étude de prolifération cellulaire mesurée par l'incorporation de BrdU.....	65
<b>Figure 7</b> : Immunobuvardages des protéines de l'actine et de l' $\alpha$ -sma.....	67
<b>Figure 8</b> : Immunobuvardages des protéines pro-apoptotiques .....	72
<b>Figure 9</b> : Immunobuvardages des protéines anti-apoptotiques.....	73
<b>Figure 10</b> : RT-PCR de plusieurs molécules apoptotiques.....	76
<b>Figure 11</b> : Immunofluorescence effectuée à l'aide d'un double marquage dirigé contre les protéines survivin et $\alpha$ -sma des fibroblastes du témoin N1.....	78
<b>Figure 12</b> : Résultats après un double marquage dirigé contre la Survivin et l' $\alpha$ -sma pour tous les patients.....	79-80
<b>Figure 13</b> : Étude de corrélation avec et sans contrôles entre le pourcentage de survivin et de myofibroblastes.....	84
<b>Figure 14</b> : Étude de corrélation avec et sans contrôles entre l'expression de Bcl-2 et d' $\alpha$ -sma.....	85

## Abréviations

$\alpha$ -sma	Alpha-smooth muscle actin
ACA	Anti-centromeric antibody
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
ARNm	Adénosine ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated protein X
Bid	Bcl-2 interacting domain
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bmf	Bcl-2 modifying factor
BIR	Baculovirus IAP repeat
BH	Bcl-2 homology
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
Caspases	Cysteine-dependent aspartate specific protease
CD	Clusters differentiation

CED	Caenorhabditis elegans death protein
CENP-B	Centromeric protein-B
c-IAP	Caspases-inhibitory apoptosis protein
CMV	CytomégaloVirus
dATP	2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate
DD	Death domain
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
Diablo	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dNTP	Nucléotides
DR	Death receptor
EC	Endothelial cells
ECM	Extracellular matrix
ED-A	ectodysplasin-A
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Epr-1	Effector cell protease receptor-1
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas associated death domain
FasL	Fas ligand

FITC	Fluorescein iso-thiocyanate
Flip	Fas-associated DD-like interleukine (IL)-1 converting enzyme inhibitory protein
IAP	Inhibitory apoptosis protein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
kDa	Kilodalton
LTB4	Leukotriène B4
Mcl-1	myeloid cell leukemia-1
NAG-2	Novel antigen-2
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
NHDF	Normal human dermal fibroblast
NK	Natural killer
P53	Protéine 53
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PCD	Programmed cell death
PCR	Polymerase chain reaction

PDGF	Platelet derived growth factor
PEST	Proline, glutamate, sérine et thréonine motif
PI	Propidium iodide
PM	Polymyosite
RNP	Ribonucléoprotéines
RP	Raynaud's phenomenon
RPMI	Roswell park memorial institute
RT	Reverse transcriptase
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
Scl	Sclérodémie, sclérose systémique
SDS	Sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SSB	SDS sample buffer
SSc	Sclérodémie, sclérose systémique
SVF	Sérum de veau foetal
TAE	Tris-acetate EDTA
TBE	Tris-borate EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta

TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
TP	Température pièce
TRADD	TNF receptor-associated death domain
TRAF	TNF-receptor-associated-factor
T-TBS	Tween-Tris-buffered saline
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VSM	Vascular smooth muscle
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

*À mes parents,  
Linette et Serge*

## Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mes patrons, Tamara Grodzicky, M.D. et mon co-directeur Dr. Yves Raymond, de m'avoir laissé la chance d'effectuer deux merveilleuses années de maîtrise au laboratoire d'auto-immunité. Je tiens à les remercier pour l'aide et le support qu'ils m'ont accordés. Merci au Dr Jean-Luc Senécal, également du laboratoire d'auto-immunité, pour sa reconnaissance et ses encouragements. Je ne pourrais finalement pas oublier de remercier tout le harem du laboratoire : Monique Bernard, Mélanie Dieudé, Isabelle Clément, Nathalie Brassard, Mélanie Tremblay, Jill Hénault et Marie-Soleil Christin Piché. Un merci tout spécial à Monique qui a su m'enseigner une multitude de techniques. J'aimerais également remercier Mélanie pour son oreille attentive et sa gentillesse. Les nombreuses bières ingurgitées en sa compagnie m'ont permis de mieux connaître sa charmante personne. Mes parents, mon frère, mon parrain et ma marraine qui sont au loin et qui m'ont supporté et encouragé tout au long de mes études, méritent également un merci tout spécial. Merci à tous mes amis d'enfance et d'université que j'ai eu la chance de connaître, car aujourd'hui leur amitié m'est très précieuse. Finalement, j'en profite pour remercier l'amour de ma vie pour toute son aide, son dévouement et pour la motivation qu'elle a su me donner particulièrement en fin de rédaction.

# Introduction

## 1. La sclérodermie (sclérose systémique)

La sclérodermie (SSc) est une maladie auto-immune systémique peu commune caractérisée par une inflammation diffuse, une insuffisance vasculaire et une fibrose progressive de la peau et des organes internes (McSweeney & *al*, 2002 ; Jelaska & Korn, 2000). Les principaux organes ciblés par la fibrose sont la peau, les poumons, le tractus gastro-intestinal, le cœur et les reins. C'est précisément dans les régions où la perturbation vasculaire est la plus sévère que les premiers signes de fibrose apparaissent (LeRoy, 1996). Normalement, la maladie progresse lentement de façon centripète pour ensuite impliquer la pointe proximale des membres inférieurs et supérieurs et le tronc dans les formes plus sévères. Souvent ceci est associé à une raideur chronique, une inflammation, une décoloration de la peau ainsi qu'à des ulcères douloureux de la peau (R&D, 2002).

La SSc est généralement divisée en deux formes : limitée et diffuse. Dans la forme diffuse de la SSc, la maladie progresse vers le tronc et les organes internes. Cette forme implique souvent une dégénérescence rapide, mettant ainsi en danger la vie des personnes affectées. Les personnes atteintes de la forme limitée ont généralement un meilleur pronostic, car l'atteinte peut se limiter à la peau des mains et des doigts avec une atteinte interne moins sévère (R&D, 2002 ; Li & *al*, 1998).

On estime que près de 300 000 Américains seraient atteints de cette maladie, dont 80% seraient des femmes de 35 à 55 ans (R&D, 2002). Le taux d'incidence chez la population américaine adulte est d'environ 20 par million par année. Ce taux a augmenté entre 1944 et 1973, mais est relativement stable depuis ce temps. La prévalence de la SSc aux États-Unis est également stable depuis les dernières décennies avec une estimation pour les adultes de 240 par million. Les taux d'incidence de la maladie, surtout sa forme diffuse, sont plus élevés chez les personnes de race noire que chez ceux de race blanche. De récentes études ont suggéré que la SSc est plus fréquente aux États-Unis que sur le continent européen, au Royaume-Uni et dans quelques pays d'Asie (Mayes, 2003).

Malgré les nombreuses études effectuées jusqu'à ce jour, l'origine de la SSc demeure inconnue. Les femmes et les personnes de plus de 25 ans sont les plus susceptibles de développer la SSc. L'exposition à des agents exogènes, qui peuvent être différents d'un individu à l'autre, comme les produits chimiques ingérés ou inhalés et les agents infectieux, sont d'autres facteurs possibles. Cependant, il semble y avoir un consensus parmi les chercheurs sur la chronologie des événements en début de maladie. Un des événements précoces de la maladie est l'activation et l'infiltration des lymphocytes T dans la peau et les organes internes. Les cellules CD4+ prédominent dans la peau et les cellules CD8+ prédominent dans les poumons des patients avec alvéolites, ce qui démontre une sélection dirigée par les antigènes. Les différentes sous-populations de cellules T

produites dépendent des organes impliqués, mais également du stade de la maladie. Les cellules B seraient aussi impliquées, précocement, avec une activation polyclonale (Vaishnay & al, 1997).

Les auto-anticorps spécifiques de la maladie ciblent principalement l'ADN topoisomérase I, les protéines centromériques et les ARN polymérases. Les caractéristiques des auto-anticorps dans la SSc suggèrent que les antigènes ciblés soient présentés au système immunitaire comme des molécules natives ou faisant partie d'un complexe à multiples unités. Il y a quelques homologues entre certains virus, comme le cytomégalovirus (CMV) et le « feline sarcoma virus », et les auto-antigènes dans la SSc, ce qui suggère que le mimétisme moléculaire puisse jouer un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire (White, 1996). Plusieurs autres cellules inflammatoires non-spécifiques infiltrent les tissus et démontrent des évidences d'activation, comme les macrophages, monocytes, mastocytes, éosinophiles, basophiles et les cellules cytotoxiques naturelles (natural killer, NK). De récentes études ont démontré l'apoptose des EC comme l'un des événements précoces de la SSc chez un modèle de poulet. Des changements similaires de l'endothélium sont trouvés dans le stade précoce de la maladie chez l'humain (Vaishnay & al, 1997). Il a été suggéré que les anticorps anti-EC soient responsables de l'induction de cette apoptose et que cet événement pourrait même précéder l'infiltration des lymphocytes (Grodzicky & Elkon, 2000). Les médiateurs solubles synthétisés par les

cellules T, B et non-spécifiques peuvent activer et endommager les fibroblastes, les cellules endothéliales (EC) et autres cellules vasculaires lors de l'infiltration (White, 1996).

Le stade plus tardif de la maladie est caractérisé par la prolifération des fibroblastes et par une sécrétion excessive de collagène. De plus, les fibroblastes isolés des patients SSc survivent plus longtemps en cultures primaires que les fibroblastes de sujets sains. Ainsi, la corrélation entre la survie prolongée et la modulation de régulateurs de l'apoptose extracellulaire ou intracellulaire est un sujet de grand intérêt pour les recherches futures (Vaishnay & *al*, 1997). En effet, la sur-expression de Bcl-2 dans les cultures de fibroblastes SSc dermiques est une découverte intéressante étant donné que la fibrose est produite tardivement dans la SSc (Grodzicky & Elkon, 2000). Le facteur de croissance transformant- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) est une cytokine importante dans la stimulation de la réponse fibrotique. Cette cytokine stimule la production de protéines de la matrice extracellulaire, la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et protège ceux-ci des stimuli apoptotiques. La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est une étape cruciale dans la fibrose. Leur persistance provoque un dérèglement de la fibrose et mène souvent à des maladies telles que la SSc (Kissin & Korn, 2002).

### **1.1. Phénomènes cliniques**

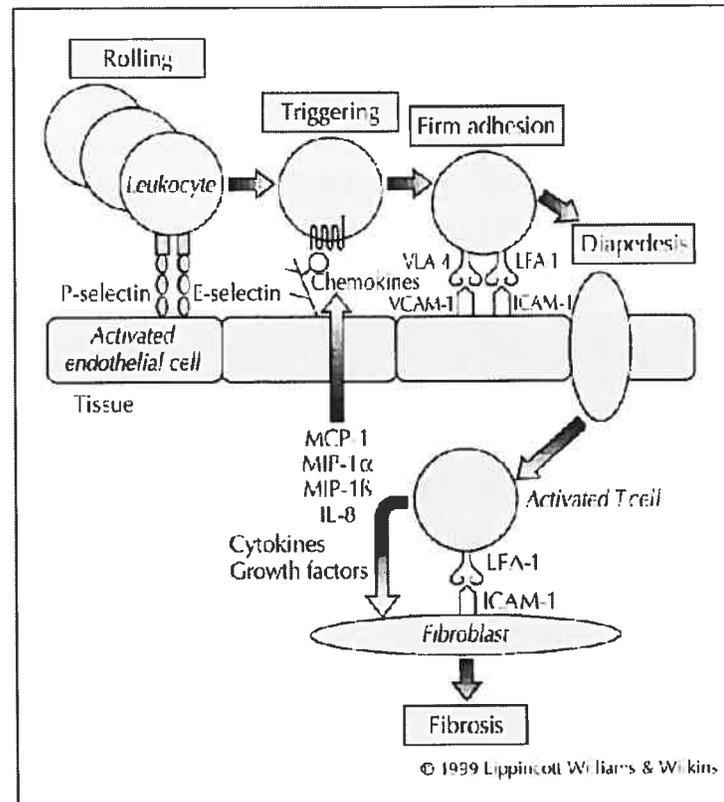
Le phénomène de Raynaud (RP) est un trouble de constriction des vaisseaux sanguins dans les doigts qui diminue anormalement la circulation locale. Ce phénomène, qui est aggravé par le froid, est souvent associé à la SSc. En effet, le RP est présent chez plus de 95% des patients atteints de SSc et précède habituellement le début de la maladie systémique de plusieurs années. Il reste que la qualité de vie et le bon fonctionnement des patients atteints de la SSc sont très variables et dépendent de multiples facteurs, comme la fréquence, la durée et la sévérité des attaques du RP, la présence et l'activité des ulcères digitaux, avec risque d'auto-amputation et les problèmes concomitants à la SSc, comme la rigidité de la peau, les problèmes musculosquelettiques, la douleur, l'atteinte digestive et la dyspnée. Ainsi, beaucoup de patients doivent changer leur routine journalière pour accommoder leurs symptômes et leurs limitations fonctionnelles, ce qui peut provoquer une anxiété significative en plus de la morbidité et mortalité associée à leur maladie (Merkel & *al*, 2002).

### **1.2. Pathogenèse**

L'origine de la SSc est toujours inconnue, mais les interactions des cellules lymphoïdes, des fibroblastes et des EC sont au cœur de la pathogenèse de la SSc. Ces interactions dépendent de l'expression et des fonctions des molécules d'adhésion et des chémokines. La relâche de certaines molécules d'adhésion solubles exprimées sur les EC

peut représenter une étape importante dans l'activation des EC, ce qui corrélait avec les premières étapes et les quelques complications de la maladie nommées à la section 1.1. Récemment, quelques anomalies ont été décrites pour les chémokines pouvant expliquer les accumulations anormales de sous-classes de leucocytes dans les tissus impliqués, ainsi que les interactions anormales des leucocytes avec les fibroblastes (Sato, 1999). Ces interactions accrues des fibroblastes et des cellules T activées dans la SSc peuvent contribuer à la synthèse accrue de la matrice extracellulaire (ECM) (figure 1). Parmi les molécules d'adhésion, on retrouve les intégrines qui sont des molécules hétérodimériques transmembranaires faites de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Elles lient les protéines de l'ECM ce qui permet de transmettre l'information de l'environnement à la cellule. L'expression des intégrines peut être augmentée sur les EC, les lymphocytes périvasculaires, les fibroblastes et les cellules dendritiques de la peau. La superfamille des gènes des immunoglobulines (Ig), comme les molécules d'adhésion intercellulaire-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1, CD54) et les molécules d'adhésion cellulaire vasculaire (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1, CD106) sont également des molécules d'adhésion. De plus, plusieurs médiateurs solubles, comme l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$ , le facteur de croissance dérivé de plaquettes (platelet derived growth factor, PDGF), les granzymes A et le leukotriène B4 (LTB4) peuvent altérer les fonctions des cellules vasculaires ou des fibroblastes (Abbas & *al*, 1994 ; Janeway & Travers, 1997) (Tableau I). Toutes ces molécules médiatrices peuvent être produites par les cellules T ou

autres cellules inflammatoires (White, 1996). Ces molécules ne sont pas toutes exprimées simultanément, car il semble y avoir une série d'événements chronologiques dans la SSc.



(Sato, 1999)

Figure 1 : Représentation schématique illustrant les événements de roulement, de fixation, d'adhésion ferme et de diapédèse qui se produisent lors de la migration des leucocytes. L'expression des E-sélectines, P-sélectines, VCAM-1, ICAM-1 et de l'IL-8 est augmentée tôt lors de l'inflammation de la peau des personnes atteintes de SSc. Les cellules T activées entrent alors en contact avec les fibroblastes via ICAM-1 qui est surexprimée par les fibroblastes SSc. Ceci active les fibroblastes et entraîne le développement de la fibrose par le relâchement de cytokines et de facteurs de croissance qui stimulent la synthèse de composantes de l'ECM.

**Tableau I :** Fonctions de plusieurs cytokines ayant un rôle possible dans la sclérose systémique.

Cytokines	Fonctions
IL-1	-Prolifération des cellules T et B -Production de l'ECM par les fibroblastes -Expression de ICAM-1 sur les EC
IL-2	-Facteur de croissance pour les cellules T -Stimule leur prolifération
IL-4	-Stimule la prolifération, le chimiotactisme et la production de l'ECM par les fibroblastes -Augmente l'adhésion entre les cellules T et les EC
IL-6	-Augmente l'activité des cellules cytotoxiques par son habileté à induire des sérines estérase et perforines
IL-8	-Responsable du chimiotactisme pour les neutrophiles, les lymphocytes et les EC
TNF- $\alpha$	-Semblable à l'IL-1, avec l'expression de E-selectine, de ICAM-1 et de VCAM-1 sur les EC et de leur activation -Participe à l'inflammation locale
TGF- $\beta$	-Stimule la production de collagène par les Fbs et les cellules musculaires vasculaires lisses et la production de l'endothéline-1(un vasoconstricteur qui stimule la synthèse de collagène par les Fbs) par les EC -Inhibe la croissance cellulaire -Anti-inflammatoire
PDGF	-Stimulateur potentiel de la prolifération de fibroblastes
Granzyme A	-Induit l'apoptose en fragmentant l'ADN en polynucléotides d'environ 200pb
LTB4	active les leucocytes

Au début de la maladie, des dommages aux petits vaisseaux dans les tissus distaux de la peau se produisent. Les cellules immunitaires sont ensuite recrutées et infiltrent l'environnement lésé produisant l'inflammation. Cette inflammation altère par le fait même l'environnement local, induisant l'hyperactivation des fibroblastes (R&D, 2002).

### **1.3. Mécanismes auto-immunitaires**

Les mécanismes auto-immunitaires semblent aussi être actifs dans la SSc, car les patients produisent spontanément une variété d'auto-anticorps hautement spécifiques de la maladie dirigés contre des antigènes nucléaires et nucléolaires. Des anticorps antinucléaires sont présents chez 90-98% des patients SSc. Normalement l'isotype est IgG, plus spécialement IgG3, mais des IgM, IgE et IgA sont également détectés. Les antigènes les plus communs sont l'ADN topoisomérase I, les protéines centromériques, spécialement la protéine centromérique B (CENP-B), et les ARN polymérases I, II et/ou III. Les auto-antigènes moins fréquemment ciblés incluent les U3-ribonucléoprotéines (RNP)(fibrillarine), les auto-antigènes polymyositis/scleroderma (PM-Scl), Th/To, et U1-RNP. Chaque patient ne produit typiquement qu'un seul de ces auto-anticorps, ce qui corrélait avec certaines manifestations et pronostiques de la maladie. Jusqu'à maintenant il n'est pas connu si les auto-anticorps participent directement à la physiopathologie de la maladie (Zhou et *al*, 2001).

Cependant, il y a trois principaux sous-groupes sérologiques de SSc, chacun caractérisé par un patron distinct de manifestations cliniques : les sera contenant des anticorps anti-DNA topoisomérase I, ceux contenant des anticorps reconnaissant une ou plusieurs protéines centromériques (CENP-A, -B, -C) (ACA) et les sera contenant des anticorps contre l'ARN polymérase III (I et/ou II). Ces anticorps sont généralement détectés chacun chez 20-25% des patients et sont mutuellement exclusifs. Les patients portant des anti-ARN polymérase III sont ceux ayant le plus haut risque de SSc cutanée diffuse, la plus haute moyenne pour l'épaisseur de la peau, le plus court temps de survie cumulative et le plus haut risque d'implication rénale comparativement aux deux autres groupes. Dans le groupe avec anti-topoisomérase I, ce sont les fibroses pulmonaires qui sont plus fréquentes. Finalement, ceux avec ACA possèdent le meilleur pronostic. Les sous-groupes possèdent des caractéristiques précises qui peuvent permettre de suivre l'évolution de la maladie (Georgina & *al*, 1999).

Il n'est pas encore connu d'où ces auto-anticorps proviennent ni comment ils sont impliqués dans le développement ou la progression de la maladie. Cependant, ces auto-anticorps sont de bons indicateurs de l'évolution de la maladie chez un individu. Souvent les patients atteints de la forme limitée ont des anti-CENP-B et ceux atteints de la forme diffuse ont des anti-topoisomérase I ou anti-ARN polymérase III (R&D, 2002).

## **1.4. Origines de la sclérodermie**

### **1.4.1. Facteurs environnementaux**

L'origine de la SSc étant inconnue, plusieurs hypothèses ont été émises afin d'en venir à une explication. Parmi celles-ci, l'exposition à des facteurs environnementaux a été étudiée comme l'une des causes possibles de la SSc. Par exemple, le chlorure de vinyle fut le premier produit chimique pouvant induire des symptômes similaires à la SSc : le RP, la sclérodactylie et les télangiectasies en sont quelques exemples. L'exposition au chlorure de vinyle peut causer des maladies impliquant les viscères, comme la SSc, mais seule la fibrose pulmonaire est similaire à la SSc dans ces maladies. De plus, l'exposition à la poussière de silice a été impliquée dans l'augmentation des risques de SSc chez les hommes. De nombreux cas de SSc et de maladie se rapprochant de la SSc ont également été associés à l'exposition à des solvants organiques. On aimerait croire que la SSc serait entièrement causée par l'exposition à certains facteurs environnementaux, mais les études effectuées jusqu'à maintenant ne permettent pas d'identifier de façon certaine les agents responsables (Steen, 1999 ; Steen, 1999).

### 1.4.2. Agents infectieux

Depuis plusieurs années des études étiologiques tentent de démontrer l'implication des agents infectieux dans la SSc et le RP. Les taux d'infection chez les patients atteints de SSc n'ont toutefois pas apporté de réponse claire quant à l'identification d'un pathogène spécifique comparativement à ceux des populations contrôles (Hamamdžić & *al*, 2002). Toutefois, il y a des évidences de mimétisme moléculaire, chez quelques patients SSc, démontrées par l'homologie entre certaines cibles d'auto-anticorps SSc et certains virus. Par exemple, les épitopes de l'ADN topoisomérase incluant les acides aminés 121-126 et 741-746 ont respectivement des homologies avec la protéine UL70 du CMV et la protéine p30gag du « feline sarcoma virus » (White, 1996). Ce mimétisme moléculaire pourrait induire des réponses auto-immunes et, ainsi, les agents infectieux pourraient contribuer au développement et à la progression de la SSc. Les infections virales pourraient donc être à l'origine de la SSc. En effet, la plupart des humains sont porteurs de virus à infections multiples, chroniques et apparemment asymptomatiques. Il est maintenant reconnu que les 8 virus de l'herpès humain sont endémiques chez l'adulte et ce, dans la plupart des populations humaines. Les autres virus à infection persistante qui passent souvent inaperçus par l'hôte sont les papilloma virus humains, les virus hépatiques, les lentivirus, les parvovirus B19 et 2 nouveaux virus : les virus transmis par transfusion et les virus hépatiques G (Hamamdžić & *al*, 2002).

Des évidences de mimétisme moléculaire de protéines de l'hôte par le pathogène, à partir de modèle animal, pouvant induire des maladies auto-immunes ont mené à l'hypothèse que certains virus pourraient jouer un rôle dans le développement et/ou l'accélération d'événements pathologiques de la SSc. Le CMV, un virus à herpès, est très étudié puisqu'il semble impliqué dans plusieurs maladies vasculaires incluant l'athérosclérose, le rejet d'allogreffe vasculopathique, la resténose et les réactions de greffes contre l'hôte. Un épitope de la protéine UL94, un des gènes latents du CMV, ciblé par les anticorps démontre des homologies avec NAG-2, une protéine exprimée par les EC. Cet exemple de mimétisme est retrouvé dans les sera de patients SSc. L'incubation de EC avec le sera de patients SSc induit l'apoptose de ces cellules ce qui est caractéristique des pathologies vasculaires. Malgré tout, il demeure difficile d'établir une association nécessaire entre le CMV et la SSc, en sachant que de 60 à 90% des adultes sont porteur de traces sérologiques d'une infection passée au CMV, alors que la SSc n'affecte que 3 personnes sur 10 000 (Hamamdžić & al, 2002).

Les infections bactériennes ont également été prises en considération pour expliquer l'origine de la SSc. Il existe deux hypothèses pour un rôle de l'infection bactérienne dans la pathogenèse de la SSc. La première, d'ordre anecdotique, est basée sur l'observation que les traitements aux antibiotiques ont fait disparaître les symptômes de SSc chez quelques personnes. L'autre concerne les réactions de greffes contre l'hôte, reconnues comme ayant

des similitudes avec la SSc, qui ne sont pas induites chez les animaux axéniques et qui sont significativement réduites chez les enfants traités avec des antibiotiques pour éradiquer leur flore bactérienne normale. Des études récentes impliquant les infections bactériennes dans la pathogenèse de la SSc se sont concentrées sur *Helicobacter pylori*, une bactérie gastrique impliquée dans d'autres maladies vasculaires, comme les maladies coronariennes. Cependant, aucune conclusion n'a permis d'établir une corrélation entre la SSc et le taux d'infection par *H. pylori*. Plusieurs facteurs ambigus, tels que les co-infections, les différentes souches de *H. pylori* et les facteurs génétiques et immunologiques de l'hôte devront être identifiés et contrôlés pour comprendre le rôle de *H. pylori* dans le phénomène de Raynaud, la SSc et les autres phénomènes vasculaires (Hamamdzic & al, 2002).

Les relations entre les phénomènes d'infection et la SSc ne sont donc pas concluantes. L'implication de certains virus dans la pathogenèse de la SSc est donc peu probable. La prévalence seule à l'infection par *H. pylori* ou CMV est insuffisante pour que ces pathogènes puissent avoir un rôle pour ou contre une maladie aussi complexe que la SSc. La SSc semble plutôt être le résultat d'interactions des agents infectieux avec une cascade de facteurs et d'événements spécifiques à l'hôte (Hamamdzic & al, 2002).

### 1.4.3. Microchimérisme

Un autre mécanisme pouvant être à l'origine du développement sporadique de la SSc est l'hypothèse du microchimérisme. Le microchimérisme consiste en la survie prolongée de lymphocytes allotypiques dans le sang circulant, comme les cellules T acquises durant la grossesse, les cellules reçues par transfusion sanguine ou par transplantation d'organe. Le microchimérisme désigne donc un organisme contenant une ou des populations de cellules provenant d'un autre individu, à un très faible niveau. Étant donné que les femmes sont prédisposées à la SSc et qu'un pic d'incidence survient après l'accouchement, il est important de prendre en considération le phénomène de microchimérisme dans la SSc. Effectivement, cette maladie auto-immune affecte majoritairement les femmes avec un ratio de 8 femmes pour un homme (Nelson, 1998). Les mécanismes et les effets pathogéniques des cellules microchimériques ne sont pas connus, mais ces cellules sont retrouvées dans les infiltrats cellulaires des parties lésées chez les patients SSc (Hamamdžic & *al*, 2002).

## 2. Fibrose

La fibrose progressive de la peau et de plusieurs organes internes est un indice pathologique de la SSc (Jimenez & *al*, 1996). Cette fibrose est la conséquence d'événements multiples, pas tous connus, menant à une accumulation de fibroblastes qui produisent des quantités excessives d'ECM. Il y a une hétérogénéité dans les populations de fibroblastes normaux. Des sous-populations de fibroblastes synthétisent plus de collagène que d'autres. Les processus pathologiques dans la SSc peuvent être le résultat d'une sélection et/ou une activation d'une sous-population qui produit plus de collagène, ce qui mènerait à une augmentation d'ECM et à une fibrose de la peau (Jelaska & Korn, 2000). Ce processus fibrotique provoque un bouleversement de l'architecture normale des organes affectés et, ultimement, mène à leur dysfonction et leur insuffisance. Le taux et l'étendue de la progression de ce processus fibrotique sont les facteurs majeurs dans l'évolution et le pronostic de la maladie. Les fibroblastes sont très importants dans ce processus de la SSc. Encore une fois, son origine est inconnue, mais des médiateurs solubles dérivés des cellules inflammatoires peuvent influencer la croissance, la différenciation et le chimiotactisme des fibroblastes tout comme les macromolécules synthétisées par le tissu conjonctif. Les évidences s'accumulent donc pour démontrer l'implication de certaines cytokines et certains facteurs de croissance dans la pathogenèse du processus fibrotique de la SSc (Jimenez & *al*, 1996).

L'ECM est une structure complexe composée de plusieurs molécules. Les interactions des composantes de l'ECM et des cellules qui s'y logent sont dynamiques et réciproques. Ces interactions modulent plusieurs aspects du comportement des fibroblastes et autres cellules mésenchymateuses, incluant le chimiotactisme, la migration, l'adhésion, la prolifération, la différenciation, l'apoptose et les activités biosynthétiques. L'ECM est profondément altérée dans les tissus SSc, ce qui se remarque facilement au niveau de la peau. L'augmentation de l'épaisseur du derme et l'accumulation marquée de fibres de collagènes denses et serrées remplacent les tissus adipeux moins tendus du derme et même sous-cutanés. Cette augmentation de la tension et de la synthèse de collagène est également remarquée dans la peau saine des patients SSc, ce qui démontre que l'activation des fibroblastes est un événement très précoce dans le processus de la fibrose (Jimenez & al, 1996).

Comparés aux fibroblastes normaux, les fibroblastes SSc possèdent une morphologie de cellules hautement actives par leur élargissement, un réticulum endoplasmique rugueux distendu, l'abondance de cytoplasme et un grand nombre de vésicules liées à la membrane qui contiennent du matériel amorphe représentant vraisemblablement de nouvelles protéines synthétisées pour l'exportation. Il est également connu que les fibroblastes de SSc *in vitro* produisent plus de collagène de type I que les normaux. D'autres composantes du tissu conjonctif sont également sur-exprimées par les

fibroblastes de SSc : les collagènes de type III, VI et VII, la fibronectine, la décorine et les glycosaminoglycans. Les niveaux respectifs de leur ARNm sont également élevés. Les collagènes sont une superfamille de protéines semblables, mais génétiquement distinctes. À ce jour, 9 types de collagène ont été détectés dans la peau. Le collagène de type I, le plus abondant dans le corps, est prédominant dans la peau et les os. Il fait plus de 50% du poids sec de la peau. Le collagène de type I joue un rôle important en formant la structure fibrillaire tridimensionnelle de l'ECM de la plupart des tissus et procure un échafaudage pour l'arrangement ordonné des cellules mésenchymateuses. Le collagène de type III est une composante mineure de la peau adulte, représentant moins de 20% du collagène total ; il est plus abondant dans les tissus fœtaux. Ce collagène est un composé proéminent de l'ECM dans le tractus gastro-intestinal, les poumons et les vaisseaux artériels sanguins, contribuant ainsi à l'élasticité et la flexibilité de ces organes. Les collagènes de type IV et VII sont principalement retrouvés dans les jonctions entre le derme et l'épiderme. La biosynthèse du collagène est un processus complexe régulé à plusieurs niveaux. La plupart des collagènes sont sécrétés sous forme de procollagène dans l'espace extracellulaire. Les fibres de collagène sont ensuite formées après un clivage enzymatique des propeptides amino- et carboxy-terminaux et par l'auto-assemblage des molécules clivées (Jimenez & *al*, 1996).

### 3. Myofibroblastes

Normalement, les myofibroblastes sont présents durant la cicatrisation des blessures, dans les cicatrices hypertrophiées et les tissus fibrosés. Les myofibroblastes sont le résultat de la différenciation des fibroblastes. La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes ou fibroblastes activés, est une étape cruciale, car les myofibroblastes produisent de grandes quantités de protéines d'ECM et régulent les éléments contractiles qui génèrent la force nécessaire à la fermeture de la plaie (Zhan & Phan, 1999) et (Kissin & Korn, 2002). Dans les étapes finales de retrait du tissu de granulation, la matrice permet de fermer la plaie et la formation de cicatrice, et les myofibroblastes sont ensuite éliminés par apoptose (Jelaska & Korn, 2000). Les fibroblastes des tissus conjonctifs, contrairement aux myofibroblastes, n'ont pas l'appareil de microfilaments contractiles ou les fibres de stress (Tomasek & *al*, 2002). L' $\alpha$ -sma (alpha-smooth muscle actin) est reconnue comme étant un marqueur spécifique des myofibroblastes (Zhan & Phan, 1999 ; Kissin & Korn, 2002). D'autres marqueurs sont également utilisés, comme la vimentine, la fibronectine ED-A et l'absence de desmine (Wang & *al*, 2003).

Avant d'être complètement activé et différencié, le fibroblaste peut cheminer par un autre type cellulaire. En effet, il existe un autre type de myofibroblastes, les proto-myofibroblastes. Ce type de myofibroblastes précoces n'exprime pas l' $\alpha$ -sma, contrairement aux myofibroblastes complètement différenciés. L'étape cruciale pour la

formation de proto-myofibroblastes est la tension mécanique, comme le stress d'une plaie provoqué par la déchirure du tissu. Ils peuvent, par la suite, être induits à exprimer l' $\alpha$ -sma et former des myofibroblastes différenciés (Tomasek & *al*, 2002).

Dans la SSc, la fibrose est un processus qui se dérègle. Les fibroblastes régulent ce processus et leur prolifération, activation et mort dépendent d'une panoplie de facteurs endogènes et exogènes (Zhan & Phan, 1999 ; Kissin & Korn, 2002). La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est une étape cruciale dans la SSc, car la persistance des myofibroblastes est un événement critique dans la SSc. La persistance des myofibroblastes, menée par une inflammation constante ou par d'autres processus locaux, mènent ultimement à la fibrose (Jelaska & Korn, 2000). La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes serait médiée, selon certains auteurs, par le TGF- $\beta$  qui jouerait ainsi un rôle central dans la pathogenèse de la SSc en provoquant la contraction des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes (Zhan & Phan, 1999 ; Kissin & Korn, 2002). Dans la SSc, des sous-populations de fibroblastes répondraient au TGF- $\beta$ 1 et d'autres non, démontrant une hétérogénéité dans les fibroblastes (Jelaska & Korn, 2000). La différenciation des fibroblastes en cellules positives pour l' $\alpha$ -sma précéderait l'augmentation de la synthèse de collagène dans la pathogenèse de la SSc (Jelaska & Korn, 2000). L'augmentation de la production de collagène, de fibronectine et d'inhibiteurs de métalloprotéases de la matrice par les fibroblastes SSc est également le résultat de la

stimulation au TGF- $\beta$  (Kissin & Korn, 2002). Des études ont également démontré que la peau des patients SSc contient des fibroblastes prédisposés à produire des quantités élevées de collagène. D'autres études ont décrit que les populations de fibroblastes SSc lésionnels contiennent plus de myofibroblastes et sont plus résistantes à l'apoptose que les fibroblastes normaux (Jelaska & Korn, 2000). En maintenant la production de TGF- $\beta$ , l'ECM s'accumule, et la fibrose augmente (Yamamoto & Nishioka, 2002). Le TGF- $\beta$  protège également les myofibroblastes contre l'apoptose, contribuant ainsi au développement de la fibrose. Jelaska et Korn ont démontré que des fibroblastes normaux traités 6 semaines avec le TGF- $\beta$  réagissaient à une stimulation du récepteur Fas par une diminution de l'apoptose, de la prolifération et par la formation de myofibroblastes (Kissin & Korn, 2002). Il est donc important de prendre en considération la résistance à l'apoptose des myofibroblastes dans le processus fibrotique (Jelaska & Korn, 2000).

## 4. Apoptose

### 4.1 Caractéristiques générales de l'apoptose

Le développement aussi bien que l'homéostasie de plusieurs tissus adultes se font par plusieurs processus dynamiquement régulés tels que la prolifération, la différenciation cellulaire, et la mort cellulaire programmée (PCD) (Oitvai & *al*, 1993). L'apoptose ou PCD, qui signifie «tomber» comme le font les feuilles, est un programme cellulaire qui permet d'éliminer les cellules endommagées, inutiles ou dangereuses. L'apoptose a un rôle très important lors de l'embryogenèse, pour le maintien de l'homéostasie des tissus normaux, ainsi que sous certaines conditions pathologiques, comme l'oncogenèse, le syndrome de l'immuno-déficience acquise (SIDA), certaines maladies neurodégénératives et auto-immunes (Hetts, 1998).

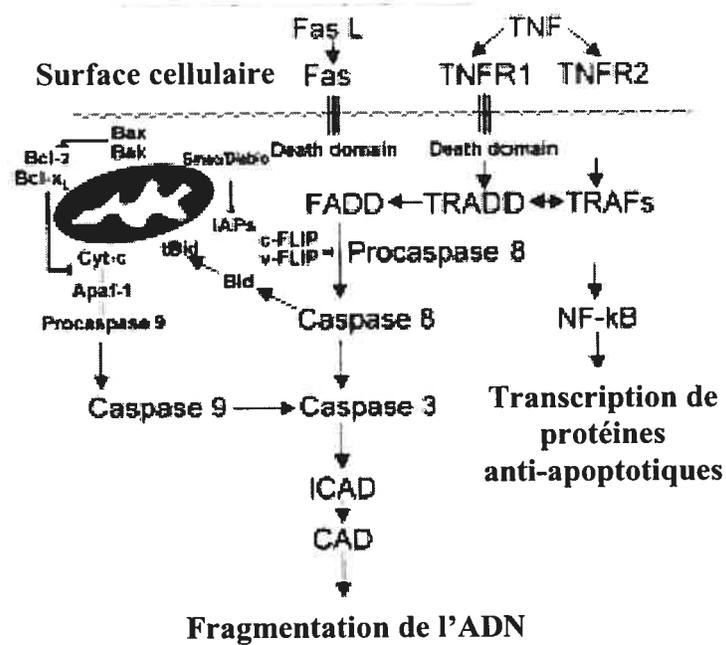
Les premières études de l'apoptose, faites chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, ont permis de distinguer 4 phases. Premièrement, il y a l'engagement de la mort cellulaire par des signaux extracellulaires ou intracellulaires. Ensuite, c'est l'exécution de la mort cellulaire par l'activation de protéases intracellulaires. Troisièmement, les cellules phagocytaires englobent les corps cellulaires. Et finalement, la dégradation des corps cellulaires dans les lysosomes de ces cellules phagocytaires. Les étapes et les gènes qui les contrôlent ont été conservés tout au long de l'évolution animale (Hetts, 1998).

Certaines voies apoptotiques sont ubiquistes. Par exemple, toute cellule normale répond à des dommages à l'ADN par les radiations en signalant un arrêt du cycle cellulaire, qui peut être rétabli ou non, si l'apoptose est engagée à cause de dommages trop sévères. D'autres signaux d'engagement de l'apoptose ne sont présents que dans certaines cellules spécifiques et à certains temps. Il existe une abondance relative de molécules de signal qui permettent de déterminer le seuil apoptotique de la cellule, la vitesse, la force et la probabilité d'activer la voie apoptotique ou anti-apoptotique. L'avantage d'utiliser une variété de signaux est de cibler des sous-classes spécifiques de cellules sans pour autant éliminer d'autres types de cellules ou des cellules adjacentes (Hetts, 1998).

#### **4.2. Voies apoptotiques**

Le sort de la cellule dépend ultimement de l'équilibre entre les stimuli pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Ces stimuli originent, par exemple, de l'importante famille des Bcl-2 et des gènes suppresseurs de tumeurs, comme p53. En plus de ces influences génétiques, la cellule est influencée par plusieurs autres molécules, comme les cytokines (IL-1, IL-2, IL-10), tout comme d'autres molécules circulantes ou se liant à la membrane qui sont capables de cibler les interactions spécifiques des récepteurs et de leurs ligands. De ces récepteurs, il y a les récepteurs Fas et les récepteurs du facteur nécrosant de tumeur-I et -II (tumor necrosis factor receptor I et II, TNF-RI et TNF-RII) (Grodzicky & Elkon, 2000). Ces récepteurs sont appelés les récepteurs de la mort et jouent un rôle central

lors de l'apoptose (Schultz & Harrington, 2003). Leurs ligands respectifs sont FasL et TNF- $\alpha$ . Le récepteur Fas est exprimé sur plusieurs types cellulaires, mais son ligand est principalement exprimé sur les cellules T Th1 activées. FasL induit la trimérisation du récepteur et le regroupement des domaines intracellulaires, les domaines de la mort (DD). Ceci permet alors le recrutement de la protéine cytoplasmique associée aux domaines de la mort de Fas (Fas-associated death domain, FADD), qui possède aussi un DD, et recrute par la suite la caspase-8, un membre de la famille des cystéine protéases (les caspases) pour former un complexe de signal induisant la mort (DISC), ce qui mène ultimement à la mort de la cellule par apoptose par l'activation de la cascade des caspases (figure 2) (Grodzicky & Elkon, 2000 ; Schultz & Harrington, 2003). La principale fonction de la voie de Fas est la terminaison des réponses immunitaires en causant l'élimination périphérique des lymphocytes T et B activés. Cette voie permet aussi d'éviter l'inflammation dans les sites privilégiés, comme les yeux ou les testicules, où FasL est exprimé constitutivement de même que l'élimination des cellules infectées ou transformées. La mutation de ce récepteur ou du ligand est associée à une expansion lymphoïde périphérique et à certaines maladies auto-immunes (Grodzicky & Elkon, 2000).



(Schultz & Harrington, 2003)

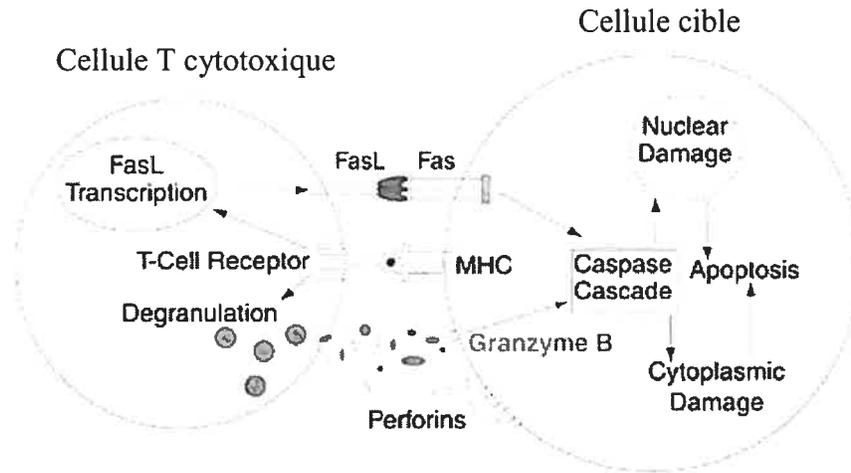
Figure 2 : Représentation des deux principales voies apoptotiques. La voie extrinsèque est médiée par les membres de la superfamille des TNFR, tels que le récepteur Fas et TNFR1 et TNFR2, et leurs ligands respectifs. La voie intrinsèque est principalement associée à la mitochondrie. Les deux voies mènent à l'activation de la caspase-3 et à la mort cellulaire apoptotique proprement dite.

Une deuxième voie passe par le récepteur TNF (figure 2). Son ligand, le TNF- $\alpha$ , est une cytokine soluble produite par les lymphocytes T activés et les macrophages suite à l'inflammation et à l'infection. Tout comme la voie du récepteur Fas, une fois le ligand lié à son récepteur, l'appariement des domaines intracellulaires se produit. Le recrutement de protéines cytoplasmiques permet ensuite de lier TRADD (TNF receptor-associated death domain) (Grodzicky & Elkon, 2000). Le résultat final, tout comme avec le récepteur Fas, permet l'activation de la caspase-8 pour mener à la PCD (Schultz & Harrington, 2003). L'engagement de ce récepteur permet également l'activation de facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 qui induisent l'activation et la prolifération de la cellule. Il existe d'autres récepteurs de la mort comme DR3, DR4 et DR5 (death receptor 3, 4 et 5). Les nombreuses voies apoptotiques convergent toutes vers un mécanisme de mort commun où les caspases clivent plusieurs autres protéines cellulaires (Nomura & *al*, 2003).

Chez les mammifères, la mitochondrie joue un rôle essentiel lors de l'apoptose initiée par les voies extrinsèques en relâchant des facteurs apoptogéniques, incluant le cytochrome c, Smac/DIABLO et Omi/HtrA2, de son espace intermembranaire vers le cytoplasme (figure 2) (Masaya & *al*, 2003). L'activation des récepteurs de la mort active habituellement les caspases 8 et 10 d'abord. Une fois le cytochrome c relâché dans le cytoplasme, il se lie à Apaf-1, ce qui permet de recruter et activer la caspase-9 initiateur qui active à son tour les caspases effectrices 3 et 7 (Masaya & *al*, 2003). Ce complexe

formé du cytochrome c, d'Apaf-1, de déoxyadénosine triphosphate (dATP) et de la caspase-9 se nomme apoptosome (Schultz & Harrington, 2003). Pendant ce temps, Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 facilitent l'activation des caspases en interagissant avec les protéines inhibitrices d'apoptose (IAP), une famille de protéines inhibitrices de caspases (Masaya & al, 2003). Le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie peut également se faire par la voie intrinsèque de l'apoptose. La cascade de caspases, qui est autocatalytique, mène à l'amplification du signal apoptotique initial (Grodzicky & Elkon, 2000). Cette cascade de caspases est régulée par l'interaction protéine-protéine, à un niveau post-traductionnel.

Un autre groupe de protéases peut également être impliqué dans l'apoptose. Il s'agit de la famille des protéases à sérines, avec les granzymes B comme plus important membres. La voie des granzymeB-perforine est une composante critique de l'exocytose des granules et le principal mécanisme impliqué dans la mort cellulaire induite par les cellules T cytotoxiques et les NK (figure 3) (Grodzicky & Elkon, 2000). Finalement, l'apoptose peut également être initiée par plusieurs agents qui risquent d'endommager l'ADN, comme les rayons ultraviolets, les rayons X, l'absence de facteur de croissance et les drogues chimiothérapeutiques (Schultz & Harrington, 2003).



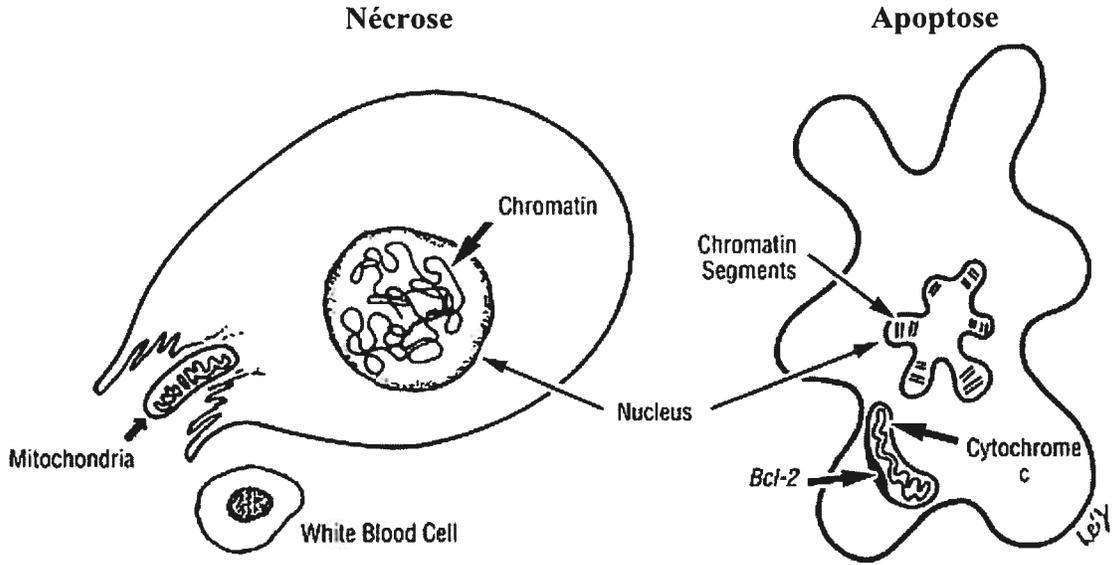
(Hetts, 1998)

Figure 3 : Représentation de la mort cellulaire induite par les cellules T cytotoxiques. Les cellules T cytotoxiques peuvent induire la mort en liant leur ligand Fas au récepteur Fas de la cellule cible, en relâchant des granzymes B, qui activent directement les caspases en entrant dans la cellule cible, et des perforines, qui forment des pores dans la membrane de la cellule cible.

### 4.3. Nécrose et apoptose

Il est important de faire la distinction entre la nécrose et l'apoptose. La nécrose est causée par un stimulus nocif externe et implique des portions de tissu contigues (Kuan & Passaro, 1998). Elle se produit normalement lors de blessures nonphysiologiques aiguës, comme celles d'un tissu après un arrêt vasculaire ischémique ou à des sites d'action de toxines (Hetts, 1998). Le processus est passif et des blessures sont produites. L'insulte produit la lyse ou la rupture de la membrane cellulaire et le relâchement du cytosol dans le milieu extracellulaire. Les organelles comme la mitochondrie sont facilement lésées, et le noyau qui est fortement protégé par sa membrane reste intact. Des médiateurs de l'inflammation, dont les quinines, contenus dans le cytosol se retrouvent alors dans le tissu et incitent l'inflammation. S'ensuit l'œdème, la dilatation capillaire, et l'agrégation des macrophages. La réponse inflammatoire dure des heures et même des jours en laissant des traces de sa présence par la formation de cicatrice (figure 4) (Kuan & Passaro, 1998).

• L'apoptose se produit à cause d'un processus préprogrammé qui peut être activé par la cellule elle-même ou par des stimuli externes. Ce processus physiologique et actif demande de l'énergie à la cellule. Initialement, la cellule se détache de ses voisines et se rétracte morphologiquement. La membrane de la cellule se déforme et le corps cellulaire s'atrophie (Dietrich, 1997 ; Kuan & Passaro, 1998). Des protéases intracellulaires activent des enzymes capables de défaire le réseau du cytosquelette. La chromatine se condense



	<b>Nécrose</b>	<b>Apoptose</b>
Processus	Pathologique	Physiologique
Énergie	Passive	Active
Stimulus	Externe	Interne
Réponse de l'hôte	Inflammation	Aucune
Membrane cellulaire	Lysée	Corps apoptotiques intacts
Mitochondrie	Éliminée	Intacte (Cytochrome C relâché)
Durée	Jours	Heures
Résultat	Cicatrice	Aucun/Corps apoptotiques

(Kuan & Passaro, 1998)

Figure 4 : Différences entre la nécrose et l'apoptose

près de la membrane nucléaire et est fractionnée en bouts de 180-200 pb de longueur (Kuan & Passaro, 1998). En fin d'apoptose, la cellule se fragmente en corps apoptotiques contenant les organites intacts qui seront phagocytés par les cellules voisines ou par les macrophages (Dietrich, 1997). Étant donné qu'aucun contenu cytosolique n'est déchargé dans le milieu extracellulaire, il n'y a pas de réponse inflammatoire. Ce processus, contrairement à la nécrose, est relativement rapide en s'effectuant dans les 2 heures (Kuan & Passaro, 1998) (figure 4). Il existe donc plusieurs caractéristiques qui permettent à l'organisme de reconnaître les cellules en apoptose. Les cellules viables ont toutes des phospholipides distribués dans la membrane où les phosphatidylsérines anioniques sont retrouvés totalement du côté cytoplasmique, à l'intérieur du feuillet, sans être en contact avec les éléments du milieu. Lorsque le mécanisme d'apoptose est enclenché, les phosphatidylsérines se déplacent de l'intérieur vers l'extérieur du feuillet de la membrane plasmatique, c'est-à-dire à la surface de la cellule et sont maintenant exposées à l'environnement. De plus, il y a la fragmentation de l'ADN génomique en fragments plutôt réguliers de 180 à 200 pb et le relâchement de fragments de membrane appelés corps apoptotiques (Schultz & Harrington, 2003).

## 4.4. Protéines apoptotiques

### 4.4.1. Bcl-2

Bcl-2, une protéine de 26 kDa, fait partie de la grande famille des Bcl-2. Cette famille régule les pores de la membrane mitochondriale qui relâche le cytochrome c et autres facteurs apoptogéniques (Kuan & Passaro, 1998). Cette grande famille de protéines est caractérisée par les similarités dans les motifs conservés BH1 et BH2 (Bcl-2 homology 1 et 2) (Oitvai & Korsmeyer, 1994). Il existe également les domaines homologues BH3 et BH4. Cette famille de protéines est au centre de la PCD, avec des protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, et d'autres pro-apoptotiques, à multiples domaines BH, comme Bcl-x<sub>s</sub>, Bax et Bak, et plusieurs autres avec BH3 comme seul domaine, comme Bid, Bad, Bim, et Bmf (Xu & Reed, 1998 ; Masaya & al, 2003). Cette habileté de réguler la mort cellulaire est conservée tout au long de l'évolution. Le nématode *C. elegans* a déjà été mentionné comme premier modèle d'étude de l'apoptose avec CED-9 comme protéine homologue à Bcl-2 (Xu & Reed, 1998).

Il est généralement accepté que Bcl-2 exerce ses effets anti-apoptotiques par hétérodimérisation avec des membres pro-apoptotiques de sa famille, tels que Bax et Bad (Shitashige & al, 2001). Bcl-2 est capable d'empêcher l'apoptose lorsque le processus en est à ses débuts en bloquant le bourgeonnement ou « blebbing » de la membrane cellulaire, la contraction de la cellule, la condensation nucléaire et le clivage endonucléolytique de

l'ADN (Schultz & Harrington, 2003 ; Kuan & Passaro, 1998). Bcl-2 est intimement relié à la membrane externe de la mitochondrie et prévient le relâchement du cytochrome c dans l'espace cytosolique. Si le cytochrome c est relâché, plusieurs voies apoptotiques seront alors activées, menant à la dépolarisation de la membrane mitochondriale, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Kuan & Passaro, 1998). On retrouve également Bcl-2 près de la membrane nucléaire et dans d'autres compartiments cellulaires, comme le réticulum endoplasmique (Oitvai & *al*, 1993 ; Schultz & Harrington, 2003). En plus de pouvoir agir sur la survie de la cellule, Bcl-2 peut retarder la poursuite du cycle et faire entrer la cellule en quiescence (Rutella & *al*, 2000). Dans plusieurs situations d'inhibition d'apoptose par Bcl-2, surtout celles en déprivation de facteurs de croissance, les cellules entrent en phases G<sub>0</sub> ou G<sub>1</sub>. Les cellules poursuivant le cycle cellulaire sont plus susceptibles aux stimuli apoptotiques que les cellules quiescentes. Bax, en se liant à Bcl-2, est capable de contrecarrer ce phénomène. Dans certains modèles de tumeurs récentes, une forte expression de Bcl-2 est corrélée avec une résistance à l'apoptose et un faible taux de prolifération. L'effet anti-mitotique de Bcl-2 se perd avec la progression de la tumeur (Chattopadhyay & *al*, 2001). L'expression de cette protéine anti-apoptotique est reconnue comme un marqueur de malignité dans plusieurs types de tumeurs (Shitashige & *al*, 2001).

#### 4.4.2. Mcl-1

Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1), un membre de 40 kDa de la famille des Bcl-2, possède des propriétés anti-apoptotiques similaires à celle de Bcl-2. Mcl-1 possède les domaines homologues BH4, BH3, BH-1 et BH-2 et, contrairement à Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, possède un domaine PEST, caractérisé par les acides aminés proline, glutamate, sérine et thréonine. Ce domaine est fréquemment retrouvé dans les protéines à courte durée de vie. La distribution de Mcl-1 semble plus large que celle de Bcl-2, malgré sa prédominance à la membrane mitochondriale, car on retrouve Mcl-1 dans plusieurs compartiments non-mitochondriaux. Les mécanismes par lesquels Mcl-1 encourage la survie cellulaire ne sont pas encore bien compris. Tout comme Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1 peut s'hétérodimériser avec Bax, qui migre du cytosol à la mitochondrie suite à un stress apoptotique, et neutraliser son activité pro-apoptotique. Cette protéine se retrouve donc largement exprimée dans les lignées cellulaires mélanocytiques humaines, normales et malignes, et dans les métastases de mélanomes. La sur-expression de Mcl-1 représenterait donc un événement précoce des transformations malignes du cancer (Thallinger & *al*, 2003).

#### 4.4.3. Bax

Bax (Bcl-2-associated protein x) fait également partie de la famille des Bcl-2, mais ses effets sont pro-apoptotiques. Cette protéine de 21 kDa peut former des dimères avec elle-même ou avec Bcl-2, et, lorsque surproduite, provoquer l'apoptose (Oitvai &

Korsmeyer, 1994). La tendance à l'hétérodimérisation entre les membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques a mené à la suggestion que la quantité de Bax qui n'est pas hétérodimérisée à Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub> devait déterminer le seuil apoptotique de la cellule (Rutella & al, 2000). Les capacités de Bax et de Bcl-2 à rivaliser l'une pour l'autre pour former des hétérodimères suggèrent une relation réciproque dans laquelle les monomères ou homodimères de Bcl-2 favorisent la survie et les homodimères de Bax favorisent la mort (Oitvai & al, 1993). Ce membre pro-apoptotique de la famille des Bcl-2 possède un domaine BH3, en plus des domaines BH1 et BH2, tout comme Bak.

Normalement, Bax est une protéine soluble dans les cellules saines. À la suite de l'induction de l'apoptose, un changement conformationnel de Bax lui permet d'exposer ses segments hydrophobiques et ainsi de se translocaliser du cytosol à la mitochondrie. Ces segments hydrophobiques semblent spécifiques à la translocalisation de Bax, car leur ablation empêche Bax de s'insérer dans la mitochondrie durant l'apoptose. Une fois à la mitochondrie, Bax s'oligomérisé et forme des pores à la surface de la membrane externe de la mitochondrie afin de permettre le relâchement du cytochrome c qui active les caspases pour induire l'apoptose (Hou & al, 2003 ; Nechushtan & al, 1999).

#### 4.4.4. Bcl-x<sub>L</sub>

Bcl-x<sub>L</sub>, une protéine de 26 kDa, est un autre membre de la famille des Bcl-2 qui inhibe l'apoptose tumorale (Chattopadhyay & *al*, 2001). En effet, la forme longue, conservant les deux domaines BH1 et BH2, inhibe l'apoptose, contrairement à la forme courte Bcl-x<sub>s</sub>, avec BH3 comme seul domaine, qui favorise la mort cellulaire (Oitvai & Korsmeyer, 1994). Plusieurs études démontrent l'importance de Bcl-x<sub>L</sub> dans la protection contre l'apoptose dans les cellules B. Plusieurs pensent que Bcl-x<sub>L</sub> joue un rôle plus important que Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose des cellules B (Saltzman & *al*, 1998). En plus d'avoir des effets anti-apoptotiques, Bcl-x<sub>L</sub> retarde l'entrée du cycle cellulaire des cellules en quiescence, tout comme Bcl-2. En effet, l'habileté de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> de retarder la transition des cellules en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> vers la phase S est bien décrite chez les fibroblastes. Bad est l'une des molécules, avec BH3 comme seul domaine homologue, capable de lier fortement Bcl-x<sub>L</sub>. Bad module la fonction de Bcl-x<sub>L</sub> et de Bcl-2 par l'interaction directe de son domaine BH3. En absence de facteurs de survie, Bad est rapidement déphosphorylé et ciblé à la surface de la mitochondrie où il se lie à Bcl-x<sub>L</sub> ou Bcl-2, et cause la mort cellulaire. Tout comme Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> semble jouer un rôle important lors de l'oncogenèse de certaines tumeurs (Chattopadhyay & *al*, 2001).

#### 4.4.5. Survivin

La survivin est une protéine de 16 kDa faisant partie de la famille des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP). Ces protéines ont initialement été identifiées lors de l'étude des événements apoptotiques des cellules d'insectes infectées à l'aide de virus (Saltzman & *al*, 1998). Jusqu'à maintenant, il y a 8 membres de cette famille : NAIP, c-IAP-1, c-IAP-2, XIAP, Ts-XIAP, ML-IAP, apollon et survivin. Ils contiennent tous au moins un domaine BIR (Baculovirus IAP repeat), en plus d'un doigt de zinc, sauf pour survivin et NAIP (O'connor & *al*, 1999 ; Roy & *al*, 1997). Un mécanisme d'action par lequel ces protéines inhibent l'apoptose a récemment été suggéré : XIAP interagit et bloque l'activité des caspases-3 et -7 (Saltzman & *al*, 1998). Le motif BIR, caractéristique de la famille des IAP, suggère que ce domaine joue un rôle central dans la protection cellulaire, mais aucune conclusion ne le prouve vraiment. L'absence de doigt de zinc chez survivin et NAIP appuie cette affirmation qui démontre l'importance du motif BIR dans l'inhibition de l'apoptose (Roy & *al*, 1997).

La survivin est une protéine à double fonction. La première consiste à inhiber l'apoptose et la seconde à réguler le cycle cellulaire (Reed, 2001 ; O'connor & *al*, 1999). Mais les mécanismes par lesquels survivin régule la mort et la division cellulaires sont très controversés. La survivin est retrouvée en grande quantité dans les tissus fœtaux et est très peu abondante dans les tissus adultes. Dans la plupart de tumeurs on retrouve de forts

niveaux de survivin, ce qui suggère que le gène soit réactivé lors d'un cancer (Giodini & *al*, 2002).

L'expression de survivin est dépendante du cycle cellulaire puisqu'elle est principalement exprimée dans la phase de la mitose, ou G<sub>2</sub>/M (Giodini & *al*, 2002). Son expression diminue rapidement dans la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Zhao & *al*, 2000). Elle est localisée au réseau mitotique, fait de fuseaux de microtubules, et est associée à la dernière structure, le « midbody », retenant les deux cellules-filles ensemble à la fin de la télophase, juste avant leur séparation en deux cellules distinctes. Des études ont démontré qu'une réduction de l'expression de survivin entraîne des cellules à centrosomes multiples qui effectuent des erreurs durant la mitose et la cytokynèse produisant ainsi des cellules polyploïdes et multinuclées (Reed, 2001).

#### **4.4.6. c-IAP-1**

c-IAP-1 est un autre membre de la famille des IAP, de 72 kDa, avec des fonctions anti-apoptotiques. Les protéines humaines c-IAP-1 et c-IAP-2 ont d'abord été identifiées comme des protéines qui étaient recrutées par les domaines cytosoliques du TNF-RII via leur association avec les protéines TRAF (TRAF-1 et -2). Il a également été démontré que c-IAP-1 pouvait faire partie du complexe de TNF-RI par son association avec TRAF-2.

L'association de c-IAP-1 et c-IAP-2 à ces complexes de récepteurs ne permet pas de déduire leurs fonctions précises dans la cascade de transduction de signal de la famille des TNFR. Cependant, il a été démontré que c-IAP-1 était capable d'inhiber l'apoptose induite par différents stimuli lorsqu'il était sur-exprimé dans les cellules de mammifères, tout comme les autres protéines IAP. Le mécanisme par lequel ces protéines inhibent l'apoptose est incertain pour plusieurs, mais certaines études ont démontré que c-IAP-1 et c-IAP-2 liaient directement les caspases-3 et -7 pour inhiber l'apoptose. Ces protéines étaient également capables d'inhiber l'apoptose en liant les protéines pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2, Bik et Bak (Roy & *al*, 1997).

#### **4.4.7. FlipL**

FLIP (Fas-associated DD-like interleukine (IL)-1 converting enzyme inhibitory protein) est une protéine anti-apoptotique de 55 kDa. FLIP est un homologue de la caspase-8, mais inactif enzymatiquement, ce qui en fait une protéine inhibitrice de caspases. Elle possède 2 domaines effecteurs de la mort et se lie aux domaines effecteurs de la mort de FADD et de la caspase-8, prolongeant ainsi la survie cellulaire en bloquant la transmission du signal de la mort induit par Fas (Schultz & Harrington, 2003). L'expression de Flip est le résultat du produit de l'épissage alternatif de deux gènes prédominants : la forme courte, Flips, est structurellement semblable à la forme virale de Flip et possède deux domaines effecteurs de la mort. La forme longue, FlipL, possède un

domaine supplémentaire semblable aux caspases « caspase-like ». Les deux formes de Flip sont d'importants régulateurs de la mort cellulaire et inhibent potentiellement l'apoptose induite par la voie Fas et les autres récepteurs humains de la mort. L'importance de Flip dans la régulation de l'homéostasie cellulaire et son rôle anti-apoptotique a été remarquée lorsque de forts niveaux d'expression ont été détectés dans les lignées cellulaires de mélanomes et d'autres tumeurs malignes. L'expression de Flip dans les lymphocytes T et autres cellules mononucléaires confère une résistance à l'apoptose médiée par Fas, ce qui pourrait être l'une des causes du développement de certaines maladies auto-immunes (Sharief, 2000).

De plus en plus d'études mentionnent les effets pro-apoptotiques de la forme longue de Flip. Jusqu'à tout récemment, le rôle de FlipL dans l'apoptose demeure encore controversé. Dans la majorité des études, FlipL est décrite comme une protéine anti-apoptotique, principalement à cause de sa capacité à inhiber l'apoptose lorsqu'elle est exprimée à de forts niveaux. Cependant, les lignées cellulaires utilisées pour mesurer les niveaux de FlipL ne démontraient que 1% des niveaux de pro-caspase-8 endogène. Des essais sur-exprimant transitoirement FlipL démontraient que l'apoptose pouvait être induite aussi bien qu'inhibée. Cette même étude démontre qu'à des niveaux endogènes normale, c'est-à-dire à de faibles niveaux, FlipL encourage l'activation de la pro-caspase-8. Contrairement, des niveaux d'expression élevés de FlipL inhibe l'apoptose (Chang & *al*,

2002). Ainsi, Flips serait maintenant la protéine anti-apoptotique clé qui empêcherait l'association des caspases-8 et -10 avec leurs molécules adaptatrices FADD (Djerbi & al, 1999).

#### 4.4.8. P53

P53, une protéine de 53 kDa, est une protéine pro-apoptotique extrêmement importante. Son rôle de facteur de transcription est très important dans la réponse cellulaire suite à une variété d'insultes extra- et intracellulaires, comme les dommages à l'ADN, l'activation oncogénique et la rupture des microtubules (Zhang & al, 2002). L'activation et la stabilisation de p53, aussi appelée protéine suppresseuse de tumeur, se fait par les stress cellulaires, comme la déprivation en facteur de croissance, les dommages à l'ADN et l'expression d'oncogène. Il est important de se rappeler qu'il existe deux voies principales d'apoptose : la voie extrinsèque et intrinsèque. P53 utilise la voie intrinsèque qui est provoquée par des stress. L'apoptose induite par la voie de p53 se fait via les caspases qui, en clivant leur substrat, mènent au phénotype apoptotique caractéristique. L'activation des caspases par p53 se fait par le relâchement de facteurs apoptogéniques provenant de la mitochondrie, comme le cytochrome c et Smac/DIABLO (Schuler & Green, 2001). Le relâchement du cytochrome c permet la formation d'un complexe de haut poids moléculaire, l'apoptosome, qui active la caspase-9 suite à son recrutement. La caspase-9 activée clive et active les caspases effectrices, telles la caspase-3 et -7, qui exécutent le

programme de mort cellulaire (Schuler & Green, 2001 ; Bossy-Wetzel & Green, 1999) et 16. Le relâchement de Smac/DIABLO facilite l'activation des caspases par la répression des IAP. Le relâchement des facteurs apoptogéniques de la mitochondrie est régulé par la famille des protéines pro- et anti-apoptotiques Bcl-2, qui induisent ou préviennent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Leonardo & *al*, 1997).

Plusieurs des fonctions de p53 sont exercées via la transcription de séquences spécifiques de gènes. Lorsque l'apoptose est induite par p53, des éléments de réponse de p53 sont retrouvés dans les promoteurs des protéines pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2, telles que Bax, Noxa et PUMA qui sont sur-exprimées. Ces protéines ont la capacité d'induire le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie et ainsi d'activer les caspases par la voie intrinsèque (Schuler & Green, 2001). Les protéines avec BH3 comme seul domaine homologue, comme Noxa et PUMA, peuvent aussi inhiber directement les fonctions des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2. De plus, Bim serait un médiateur de l'apoptose en réponse à la dégradation du cytosquelette avec Bad qui empêcherait l'induction de facteur de croissance (Zong & *al*, 2001).

La fidélité de la réplication du génome est possible grâce à la coordination de cette réplication, de la réparation de l'ADN et de la ségrégation des chromosomes avec les voies de transduction des signaux biochimiques appelées points de contrôle, qui s'assurent de la

progression ordonnée des événements dans le cycle cellulaire. Les points de contrôle empêchent la cellule de passer aux étapes suivantes du cycle cellulaire avant la fin de l'étape précédente. Des erreurs lors des points de contrôle existent et peuvent augmenter l'instabilité génétique sous des conditions qui normalement activeraient les points de contrôle. Ainsi p53 est impliqué dans les points de contrôle de toutes les phases du cycle cellulaire. En G<sub>1</sub>, p53 est activé par plusieurs types de dommages à l'ADN et lors de la déplétion des ribonucléotides en absence de dommage à l'ADN afin de prévenir l'entrée en phase S. Sa sur-expression peut également provoquer l'arrêt en G<sub>2</sub>. Une déficience de p53 augmente les risques de bris chromosomiques et d'amplification des gènes, la production de multiples centrosomes à l'intérieur d'une même cellule et la polyploïdie (Leonardo & al, 1997).

#### **4.4.9. Caspase-3**

La caspase-3 est une protéine apoptotique d'une grande famille de plus de 14 protéases cystéines (caspases) (Schultz & Harrington, 2003). Le «c» fait référence aux protéases cystéines et le «aspase» à la capacité de ces enzymes à cliver après un résidu d'acide aspartique. Les caspases sont synthétisées en proenzymes inactives qui comprennent un peptide N-terminal (pro-domaine) avec une large et une petite sous-unité (Cohen, 1997). La mort cellulaire par apoptose se fait par l'activation des caspases suite à leur clivage, aux résidus aspartates spécifiques pour former de petites et de grosses sous-unités, et ainsi participer à la cascades enzymatiques des caspases (Schultz & Harrington,

2003). Ainsi, certaines caspases activent d'autres caspases, démontrant une certaine hiérarchie entre les caspases. Plus d'un modèle proposent la caspase-8 comme une protéase initiatrice, qui active une protéase amplificatrice, comme la caspase-1, qui à son tour active la machinerie de protéases, comme les caspases-3 et -7. Les différentes caractéristiques des motifs contenant les sites de clivage spécifique dans les différentes caspases nous donnent des indices sur leurs activités et sur le lien des caspases entre elles (Cohen, 1997).

La caspase-3 est l'une des exécutrices clés de l'apoptose. Elle est responsable en partie ou totalement du clivage protéolytique de plusieurs protéines clés, comme PARP, qui est clivé dans plusieurs systèmes durant l'apoptose. La caspase-3 est une protéase cystéine de 32 kDa, aussi appelée CPP32, Yama et apopain. Elle est largement distribuée, mais principalement dans les lignées cellulaires d'origine lymphocytaire, suggérant son importance en tant que médiateur de l'apoptose dans le système immunitaire. L'enzyme active est composée de deux sous-unités, de 17 et 12 kDa, dérivées de la pro-caspase-3 par clivage des résidus Asp-28-Ser-29 et Asp-175-Ser-176 (Cohen, 1997).

#### **4.5. L'apoptose dans la sclérodermie**

L'exacte cause de la SSc reste toujours inconnue, mais la possibilité que l'apoptose soit impliquée dans l'initiation et/ou la perpétuité de la maladie a été suggérée par plusieurs

auteurs. En effet, plusieurs études suggèrent que l'apoptose des EC, probablement causée par des anticorps anti-EC cytotoxiques, puisse avoir lieu avant l'infiltration des lymphocytes. Plus tard, les fibroblastes prolifèrent et deviennent résistants à l'apoptose. Des études démontrent que Bcl-2 est sur-exprimé dans des cultures de fibroblastes dermiques de patients SSc (Grodzicky & Elkon, 2000). En effet, Jelaska et Korn ont émis l'hypothèse que durant le développement de la SSc, une certaine sélection suivie de la prolifération de fibroblastes résistants à l'apoptose se produisait. L'hétérogénéité des fibroblastes SSc a également été observée dans des sous-populations produisant du collagène d'une façon excessive. L'une des hypothèses de Jelaska et Korn est que cette accumulation de fibroblastes pourrait provenir d'un renouvellement continu de cellules altérées et résistantes à l'apoptose. La survie prolongée de ces populations de fibroblastes provoque donc une augmentation de cellules et de dépôt de l'ECM. Les fibroblastes expriment normalement le récepteur Fas à leur surface et l'apoptose devrait être induite par un anticorps anti-Fas. Des études antérieures démontraient également une hétérogénéité considérable parmi des populations de fibroblastes pour l'induction de l'apoptose à l'anti-Fas. Les fibroblastes lésionnels de SSc étaient significativement plus résistants à l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas que les fibroblastes normaux ou non-lésionnels (Jelaska & Korn, 2000).

Une autre possibilité pouvant expliquer cette résistance à l'apoptose serait la possibilité que d'autres facteurs, comme les cytokines, soient impliqués dans le développement de la maladie. Un traitement prolongé au TGF- $\beta$ 1 a réduit dramatiquement la susceptibilité des fibroblastes à l'apoptose et a incité, après un traitement successif à l'anti-Fas, leur prolifération. Ceci coïncide avec le fait que le TGF- $\beta$ 1 est présent dans la peau non-lésionnelle en début de maladie, avant la fibrose. Ainsi, le TGF- $\beta$ 1 pourrait favoriser la survie des fibroblastes qui seraient normalement éliminés par les cellules inflammatoires infiltrant les tissus au cours du développement de la SSc. Cependant, le mécanisme par lequel le TGF- $\beta$ 1 bloque l'apoptose n'est pas clair. Chez les fibroblastes synoviaux, TGF- $\beta$ 1 inhibe l'apoptose induite par l'anti-Fas en diminuant les niveaux de Fas et en augmentant les niveaux de Bcl-2. Mais d'autres expériences seront nécessaires pour déterminer le mécanisme de résistance à l'apoptose par le TGF- $\beta$ 1 dans les fibroblastes de derme (Jelaska & Korn, 2000).

## 5. Objectifs

Le rôle de l'apoptose dans le développement de la SSc demeure un domaine d'étude des plus intéressants. Malgré les recherches intensives en cours, portant surtout sur le potentiel fibrogénique des fibroblastes SSc, il n'y a aucun traitement efficace pour renverser ni freiner l'évolution de cette maladie associée à une morbidité et à une mortalité significatives. La survie cumulative à 10 ans va de 75%, pour la forme limitée, à 22-26%, pour la forme diffuse (Silman, 1997 ; Schumacher & *al*, 1993 ; Altman & *al*, 1991). Les études sur l'apoptose dans la SSc à l'aide d'échantillons de peaux de patients sont peu nombreuses. Ainsi, une nouvelle direction dans la recherche sur la SSc chez l'humain est proposée, notamment la recherche de dysfonctions intrinsèques au niveau des voies apoptotiques principales dans les fibroblastes dermiques isolés de biopsies cutanées, qui sont représentatives de tous les fibroblastes tissulaires, de patients SSc. Des patients des deux formes de SSc, limitée et diffuse, ainsi qu'à différents stades d'évolution de la maladie ont été analysés et comparés à des sujets volontaires sains d'âge et de sexe correspondants. Les dysfonctions apoptotiques ont été recherchées par l'étude des niveaux d'expression protéique de plusieurs molécules importantes impliquées dans la régulation de l'apoptose : caspase-3, -2, -8, FLIP (isoformes longue et courte), Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bax, survivin et c-IAP-1. Le RT-PCR a permis d'analyser les niveaux d'ARNm de certaines de ces protéines apoptotiques. Les autres techniques d'immunofluorescence, de cytométrie de flux et d'incorporation de BrdU pour mesurer la prolifération cellulaire, ont permis de mieux caractériser les populations de fibroblastes SSc issus de biopsies cutanées. Une

partie de la faisabilité de ce projet concernant l'isolement des fibroblastes à partir de biopsies cutanées a été assurée par notre collaboration avec Lucie Germain, Ph.D., et son équipe du Laboratoire d'Organogenèse Expérimentale (LOEX), Centre Hospitalier Affilié Universitaire de Québec. La caractérisation d'anomalies au niveau des voies apoptotiques dans la SSc chez l'humain permettra de déterminer de nouveaux sous-groupes de patients, avec des différences au niveau de leurs réponses aux traitements et de leurs manifestations cliniques, et mènera ultimement à la découverte de traitements plus ciblés, plus efficaces et moins toxiques.

# Matériel et Méthode

## 1. Description des patients

Les biopsies ont été pratiquées sur des régions de la peau cliniquement lésionnelles et non lésionnelles de 7 patients SSc dont 6 diffus, allant de précoce à tardif, 1 limité tardif et sur des peaux normales de 5 volontaires sains (N1-N5). Dans la maladie diffuse, 3 catégories sont établies. Dans une première sous-classe, SSc diffuse précoce active, on retrouve 2 patients. Le patient A, avec moins de 8 mois de maladie depuis le premier diagnostic, était âgé de 53 ans avec une SSc sévère en plus d'une alvéolite. Le deuxième, le patient D, était âgé de 76 ans, avec moins de 3 mois de maladie et était sévèrement atteint en plus d'une alvéolite modérée. Dans la deuxième sous-classe de SSc diffuse, intermédiaire inactive, on retrouve le patient E qui est âgé de 44 ans avec 2 ½ ans de maladie. Il était également sévèrement atteint avec une fibrose terminale des poumons. Il était en attente d'une greffe pulmonaire et seule une biopsie de la peau lésionnelle de ce patient a été prélevée. La troisième sous-classe de SSc diffuse, tardive inactive, comporte 3 patients. Un premier, le patient B, était âgé de 39 ans avec plus de 10 ans de maladie, a été classé comme ayant une SSc de faible à modérée. Le patient C avait plus de 20 ans de maladie et était âgé de 51 ans avec une SSc sévère. Le patient G avait plus de 10 ans de maladie avec des anticorps anti-centromères et seule une biopsie de la peau non-lésionnelle de ce patient fut prélevée. Finalement, le patient F a été classé dans la catégorie SSc

limitée tardive avec une SSc de plus de 29 ans d'évolution. Sa SSc était en réactivation depuis 3 mois avec une atteinte aux pieds.

## **2. Culture cellulaire**

Les biopsies ont été envoyées au LOEX (Laboratoire d'organogenèse expérimentale, Québec) afin d'isoler les différents types cellulaires, tels que les fibroblastes, les péricytes et les kératinocytes. La pureté des cellules isolées a été déterminée par immunofluorescence à plus de 98% pour les péricytes, kératinocytes et fibroblastes. L' $\alpha$ -actin était le marqueur spécifique des péricytes et la kératine AE3 était celui des kératinocytes. La pureté des fibroblastes isolés a été calculée par la fraction de cellules négatives pour le facteur VIII et les autres marqueurs déjà mentionnés. Les cellules endothéliales et les myofibroblastes ont déjà été isolés par l'équipe du Dr Germain sur des échantillons de peau normale (Moulin & *al*, 2000 ; Black & *al*, 1998 ; Pouliot & *al*, 1998). L'isolation de ces types cellulaires est présentement en cours sur des échantillons de peau de patients SSc. Les fibroblastes sont les cellules utilisées pour nos expériences. Les fibroblastes ont été maintenus en culture à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) et enrichi de 10% de sérum de veau foetal (SVF) de Wisent.

### 3. Études de prolifération cellulaire

Les fibroblastes des deux échantillons de peaux des patients A et B, du contrôle N1 et des fibroblastes du derme normal humain (NHDF) ont été mis en culture dans le milieu DMEM 10% SVF. À une confluence d'environ 50%, les cellules ont été mises en présence de 0,04  $\mu\text{g/ml}$  de nocodazole durant 24 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées et comptées, afin d'avoir 100 000 cellules pour l'essai de cytométrie en flux (FACS). Une solution de Krishan modifiée (Citrates de Sodium 0,1% ; Rnase 0,02  $\text{ng/ml}$  ; iodure de propidium (PI) 0,05  $\mu\text{g/ml}$ ) a permis de colorer les noyaux des cellules au PI et ainsi de compter, à l'aide du FACS et du logiciel ModFit LT pour Mac version 3.1, les noyaux en mitose ou en  $G_2/M$ . Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Graphpad InStat par des tests statistiques Mann-Whitney.

Un second test de prolifération cellulaire a été fait à l'aide d'un kit enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) anti-BrdU de Roche. Brièvement, les cellules ont été mises en culture dans une plaque à 96 puits à une concentration de 3200 cellules/puits dans un milieu DMEM 10% SVF. Après 24 h, les cellules ont été mises en présence du milieu à tester, soit le DMEM 10% SVF ou le RPMI sans sérum. Six heures avant la fin de ce second 24 h, une solution de BrdU a été ajoutée aux cellules, afin d'avoir une concentration finale de 5  $\mu\text{M}$ . À la fin, le milieu a été enlevé simplement par inversion des plaques qui ont été séchées 10 minutes au séchoir. Les cellules ont été fixées et l'ADN dénaturé en

ajoutant 200  $\mu$ l/puits de FixDenat durant 30 minutes. Après avoir enlevé le FixDenat, 100  $\mu$ l/puits d'anti-BrdU-POD conjugué à une enzyme a été ajouté pour 90 minutes. Après 3 lavages de 200  $\mu$ l/puits d'une solution de lavage, 100  $\mu$ l/puits de la solution contenant le substrat a été ajouté. La réaction a été arrêtée après 10-15 min à l'aide de 25  $\mu$ l/puits de  $H_2SO_4$  1 M. Les plaques ont été lues à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque MRX Revelation-Dynex Technologies.

#### **4. Dosage protéique**

Les protéines ont été dosées puis séparées par électrophorèse sur un gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE). Les cellules ont été amenées à pleine confluence dans un pétri de 150 mm jusqu'à un maximum de 6 passages. La récolte des cellules a été faite avec 500  $\mu$ l de tampon de lyse à l'ortho-vanadate (10 mM Tris pH 7,4; 1 mM sodium ortho-vanadate; 1% SDS) fraîchement bouilli. Ensuite, les lysats cellulaires ont été bouillis 10 secondes au micro-onde et soniqués à une amplitude de 9 (« peak to peak ») à l'aide d'un sonicateur MSE. Les lysats cellulaires ont été maintenus sur glace lorsqu'ils n'étaient pas manipulés. Pour le dosage protéique, un volume de 20  $\mu$ l a été mis de côté. Le reste du lysat cellulaire a été mesuré afin d'y ajouter le volume de tampon SDS 4X (SSB 4X) nécessaire pour une concentration finale de 1X SSB. Les échantillons pour le dosage protéique et ceux mélangés avec le tampon SSB4X ont été placés à  $-80^\circ C$  s'ils n'étaient pas utilisés immédiatement. Le dosage a été fait à l'aide du kit Micro BCA<sup>TM</sup> Protein Assay

Reagent kit de PIERCE. Brièvement, l'échantillon à doser a été amené à 0,1% SDS, tout comme le tampon de lyse à l'ortho-vanadate qui sert à faire les dilutions. Les échantillons à doser ont été dilués avec le tampon de lyse à l'ortho-vanadate 0,1% en rapportant le volume à 1 ml. Un deuxième ml d'une solution de réactifs, fait de 25 parties de réactif A, 24 parties de réactif B et 1 partie de réactif C, du kit de PIERCE a été ajouté au premier ml des échantillons à tester. Les échantillons ont été incubés 60 minutes à 60°C. Après l'incubation, les échantillons ont été refroidis 10 minutes et l'absorbance a été mesurée à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman DU®520). Le dosage a été effectué à l'aide d'une courbe standard de BSA (albumine de sérum bovin).

## **5. Électrophorèse, transfert et immunobuvardage**

Les électrophorèses SDS-PAGE de type MIDI ont été effectuées à l'aide d'appareil BIO RAD. Deux tampons différents ont été utilisés pour effectuer l'électrophorèse : le tampon inférieur (100mM Tris, 0,1% SDS, pH 8,1) et le tampon supérieur TGS 10X (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS. pH 8,3, BIO RAD) utilisé à 1X. Pour chaque puits, 25 µg de protéines ont été séparés à l'aide de gels allant de 10 à 14% d'acrylamide, à 200 V pendant environ 45 minutes. Les volumes de protéines à séparer ont été ajustés à 25 µl pour obtenir une concentration de 1 µg/µl. Après la migration, les gels ont été trempés 15 minutes dans une solution de tampon pour le transfert (20% H<sub>2</sub>O, 20% MeOH et 60% de tampon d'immunobuvardage 5X (156 mM Tris, 1,2 M glycine, pH 8,3)) avant d'effectuer

le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose. Les papiers filtres à pores grossiers (Fisherbrand, Fisher Scientific), les membranes de nitrocellulose (Trans-Blot, transfert medium, 0,45  $\mu\text{m}$  de BIO RAD) et les papiers filtres épais (extra thick blot paper, BIO RAD) ont été incubés 30 minutes dans le même tampon de transfert. Les protéines ont été transférées par la méthode semi-sec (Trans-Blot<sup>®</sup> SD, Semi-Dry transfer cell, BIO RAD) sur des membranes de nitrocellulose à 25 V, pendant 45 minutes. Les membranes ont ensuite été bloquées durant une nuit à 4°C avec du T-TBS (1% de Tween 20 dans du Tris-buffered Saline (TBS), pH 7,4) contenant 5% de lait en poudre écrémé ou 2 h à la température de la pièce. Pour l'immunobuvardage, les membranes de nitrocellulose ont été incubées et agitées avec les anticorps primaires à température pièce (TP) durant 3 heures. Les anticorps primaires utilisés à différentes concentrations étaient dirigés contre l'actine (1/20 000) et l'actine  $\alpha$  des muscles lisses ( $\alpha$ -sma, 1/5000) de Sigma, Bcl-2 (1/500), Bax (1/500) et Bcl-x<sub>L</sub> (1/5000) de Transduction Lab, FlipL (1/200) de ProSci, Caspase-3 (1/10 000), c-IAP-1 (1/200) et Mcl-1 (1/500) de Pharmingen, p53 (1/500) de Santa Cruz et survivin (1/5000) de R&D Systems. Après l'incubation de l'anticorps primaire, 4 lavages avec agitation de 5 minutes ont été faits à l'aide de T-TBS. Les anticorps secondaires de chèvre, anti-souris IgG (1/10 000) ou anti-lapin IgG (1/20 000) conjugués à la peroxydase de Jackson Lab, ont été incubés 1 h à TP avec agitation. Après une autre série de 4 lavages au T-TBS, les complexes immuns ont été détectés par chimioluminescence en incubant les membranes 5 minutes avec une solution de réactifs

contenant une partie de A pour une partie de B (Supersignal West Pico, PIERCE). L'exposition a été faite sur des films KODAK ou ULTIDENT.

## 6. RT-PCR

La méthode de Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) a été utilisée pour doser les niveaux d'ARNm correspondants de quelques protéines apoptotiques analysées par immunobuvardage. L'ARN a été isolé à partir de cellules à sous-confluence (60-80% de confluence) à l'aide du kit de Roche High Pure RNA Isolation kit. Les cellules ont été récoltées à l'aide d'une solution Trypsine/EDTA de Clonetics et maintenues sur glace. Un compte cellulaire a été fait afin d'être dans les normes établies par le kit. Brièvement, le kit a permis de purifier les ARN en quelques étapes. Premièrement, les cellules ont été lysées dans un tampon inactivant les RNases. L'ADN a été digéré par une DNase, et plusieurs lavages subséquents ont permis d'éliminer la DNase et autres contaminants. Finalement, l'ARN a été élué du lysat cellulaire à l'aide d'eau sans nucléase. Les échantillons d'ARN ont été conservés à -80°C. L'ARN a par la suite été dosé en prenant bien soin de faire tremper tous les appareils, support, peigne pour le gel et l'appareil, dans l'eau diéthylpyrocarbonate (DEPC). L'ARN a été dénaturé à 65°C pendant 10 minutes dans un bain sec et refroidi 5 minutes sur glace. L'ARN dénaturé a été déposé dans un gel fait d'agarose 0,8% et de TBE 0,5X (45 mM Tris-borate; 1 mM EDTA, pH 7,5-7,8) et migré à 60 V. Une photo a été prise à l'aide de lampe UV et a permis de

doser les ARNm en les comparant à ceux d'ARNm déjà dosés, à l'aide du logiciel AlphaImager 2000 version 3.2. Pour effectuer les PCR, les cDNA correspondants aux ARNm ont été produits à l'aide du kit « C. therm. Polymerase for Reverse Transcription in Two-Step RT-PCR » de Roche. Un mélange contenant des amorces aléatoires, des nucléotides (dNTP), des inhibiteurs de RNases (RNaseIN) et l'ARN a été fait. Le tout a été incubé à 65°C pendant 5 minutes, afin de permettre aux amorces de lier l'ARN. Après centrifugation le dithiothreitol (DTT) et le tampon RT ont été incubés avec l'ARN pendant 10 minutes à TP. Finalement l'enzyme C. therm. polymerase a été ajoutée pendant 50 minutes à 37°C, pour transcrire l'ARN en cDNA.

L'amplification a été faite à l'aide de l'appareil T gradient de Biometra®. Les amorces ont été sélectionnées à l'aide du logiciel MacVector™ 6.5.3 et de quelques articles (Hu & al, 2002 ; Yamaguchi & al, 2002 ; Liu & al, 2001). Des amorces ont été sélectionnées pour les ARNm de survivin, Epr-1, l'antagoniste de survivin, Bax, GAPDH, Bcl-2 $\alpha$  (isoforme alpha), FlipSL (isoforme complet et non-coupé) et Mcl-1. Brièvement, le mélange pour cette étape doit contenir du tampon 10X (10X PCR Buffer 15 mM MgCl<sub>2</sub> de Applied Biosystems) des dNTP, l'enzyme Taq (Amplitaq® DNA Polymerase de Applied Biosystems), le cDNA, les amorces (synthétisées par Alpha DNA) et de l'eau. Une première série de mises au point a permis de sélectionner la température optimale pour l'amplification. Ensuite, le nombre de cycles a été choisi et finalement l'amplification a été

faite à la température et au nombre de cycles optimaux. L'amplification des cDNA a été analysée sur un gel d'agarose de 1,5% et de TAE (40 mM Tris-acétate; 1 mM EDTA, pH 8). La migration a été faite à 110 V pendant 40 minutes dans un appareil de BIO RAD. Un appareil à lampe UV a permis de visualiser les bandes et de les doser à l'aide du logiciel AlphaImager 2000 version 3.2.

## **7. Immunofluorescence**

L'immunofluorescence a été faite sur des cellules mises en culture sur des lames, jusqu'à une confluence de 60 à 80%. Les lames ont été fixées à l'aide de méthanol et d'acétone, i.e. trempées 5 minutes dans le méthanol et 10 minutes dans l'acétone, les deux à -20°C. Les fibroblastes ainsi fixés peuvent être conservés à -20°C pendant 1 mois. Le double marquage des fibroblastes a été fait avec des anticorps primaires dirigés contre la survivin (1/40) et l' $\alpha$ -sma (1/40) durant 30 minutes. L'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à l'Alexa (1/2000) a permis de détecter la survivin et l'anti-souris conjugué au FITC (1/40) l' $\alpha$ -sma, après une incubation de 30 minutes à la noirceur. Les noyaux ont été colorés à l'aide d'une solution de Hoechst # 33258 (10  $\mu$ g/ml) dans du PBS pendant 5 minutes. Les images ont été prises à l'aide d'une caméra Nikon, du logiciel Metamorph. Les montages photos ont été faits à l'aide du logiciel Photoshop 5.0 et les calculs à l'aide du logiciel Excel.

## **8. Étude de corrélation**

Les études de corrélation entre les myofibroblastes et les protéines anti-apoptotiques survivin et Bcl-2 des fibroblastes primaires issus de biopsies cutanées ont été faites à l'aide du logiciel Prism version 3.0. L'étude de corrélation entre les myofibroblastes et survivin a été faite avec les données obtenues par les expériences d'immunofluorescence. La corrélation entre les myofibroblastes et Bcl-2 a été faite avec la densité des bandes d'immunobuvardages mesurées par le programme AlphaImager 2000 version 3.2. Les corrélations ont été faites à l'aide d'un test de Pearson bilatéral avec un intervalle de confiance de 95%. Les régressions linéaires ont été faites avec un intervalle de confiance de 95%.

# Résultats

## 1. Échantillons : témoins et patients

Les études ont été effectuées à l'aide d'échantillons de peau, lésionnelle et non-lésionnelle, prélevés sur 7 patients SSc (6 femmes et 1 homme) et d'échantillons de peau normale de 5 volontaires sains (4 femmes et 1 homme). Trois des patients sont de catégorie diffuse précoce et sévèrement atteints de la maladie. Trois autres patients sont également de type diffus, mais tardif, dont 1 avec une SSc sévère et les 2 autres avec une SSc allant de faible à modérée. Un dernier patient, le seul de type limité tardif, possède une SSc de plus de 29 ans d'évolution. L'âge moyen des patients est de 53,7 ans, allant de 39 à 76 ans, et la moyenne d'âge des volontaires sains est de 43,2 ans, allant de 35 à 49. Toutes ces caractéristiques, en plus du diagnostic de chaque patient, se retrouvent au tableau II.

Les échantillons de peau obtenus ont été envoyés au LOEX de Québec afin de séparer les différents types cellulaires des biopsies cutanées, i.e. les péricytes, kératinocytes, myofibroblastes, EC et fibroblastes. La présente étude n'a porté que sur les fibroblastes. Ceux-ci ont été mis en culture dans un milieu DMEM enrichi de 10% de SVF jusqu'au passage 6, amenés à confluence complète pour les immunobuvardages et à une confluence de 60-80% pour les RT-PCR. La technique d'immunofluorescence

**Tableau II :** Données démographiques et cliniques des témoins et des patients ayant fourni une biopsie de la peau lésionnelle et non-lésionnelle.

Patient	Sexe	Âge	Peau	Type de SSc	Sévérité	Caractéristique(s) principale(s)
A	F	53	L NL	Diffuse précoce (< 8 mois d'évolution)	sévère	Alvéolite Fibrose pulmonaire
B	F	39	L NL	Diffuse tardive(> 10 ans d'évolution)	non sévère	Pas d'atteinte d'organes majeurs
C	F	51	L NL	Diffuse tardive (> 20 ans d'évolution)	très sévère	Fibrose pulmonaire
D	M	76	L NL	Diffuse précoce (< 3mois d'évolution)	sévère	Phase œdémateuse Alvéolite moyenne Fibrose pulmonaire
E	F	44	L NL non-disponible	Diffuse précoce (2 1/2 d'évolution)	sévère	Fibrose pulmonaire terminale En attente d'une greffe
F	F	57	L NL	Limitée tardive (> 29 ans d'évolution)	non sévère	En réactivation depuis 3 mois Atteinte des pieds
G	F	56	NL L non-disponible	Diffuse tardive(> 10 ans d'évolution)	non sévère	Anticorps anti-centromères
Âge moyen		53,7				

Témoins	Sexe	Âge	Peau
N1	F	42	Normale
N2	F	35	Normale
N3	M	35	Normale
N4	F	55	Normale
N5	F	49	Normale
Âge moyen		43,2	

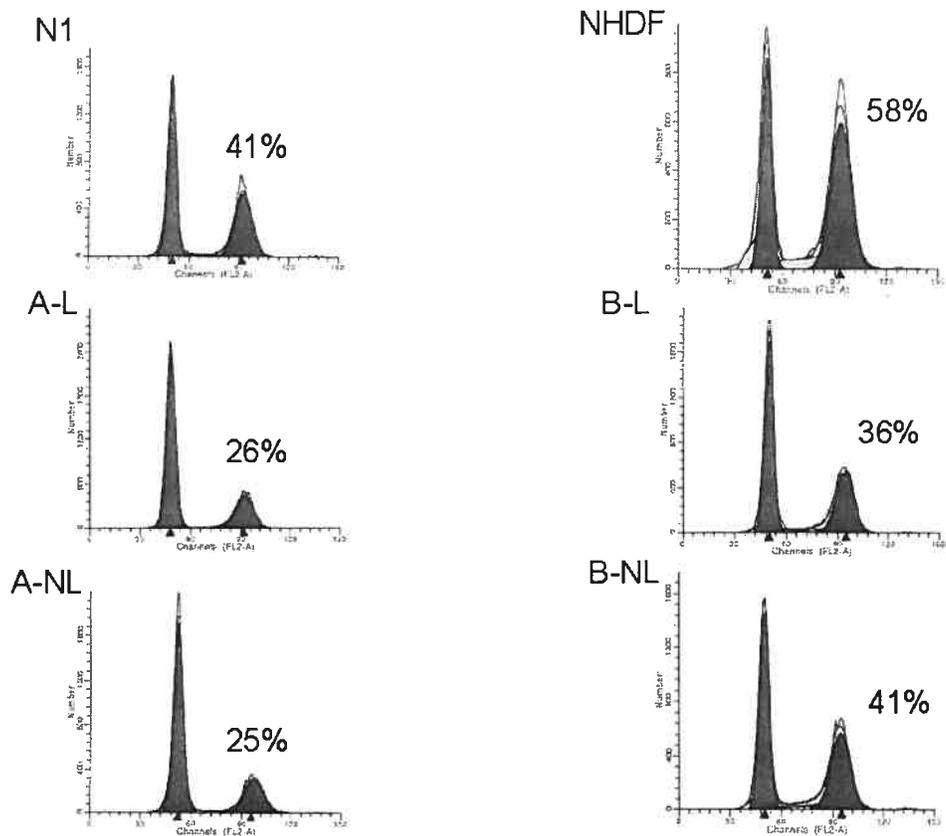
nécessitait des cellules mises en culture sur des lames de microscope jusqu'au passage 5 et à une confluence de 60-80%. Toutes les expériences ont été effectuées afin de comparer les fibroblastes des patients entre eux et ceux-ci aux fibroblastes de témoins et de fibroblastes commerciaux NHDF, que se soit pour l'expression de molécules apoptotiques ou pour la prolifération cellulaire. Les comparaisons entre les patients sont faites en tenant compte des fibroblastes des peaux lésionnelles et non-lésionnelles des patients et en fonction de la sévérité de la maladie.

## **2. Études de prolifération**

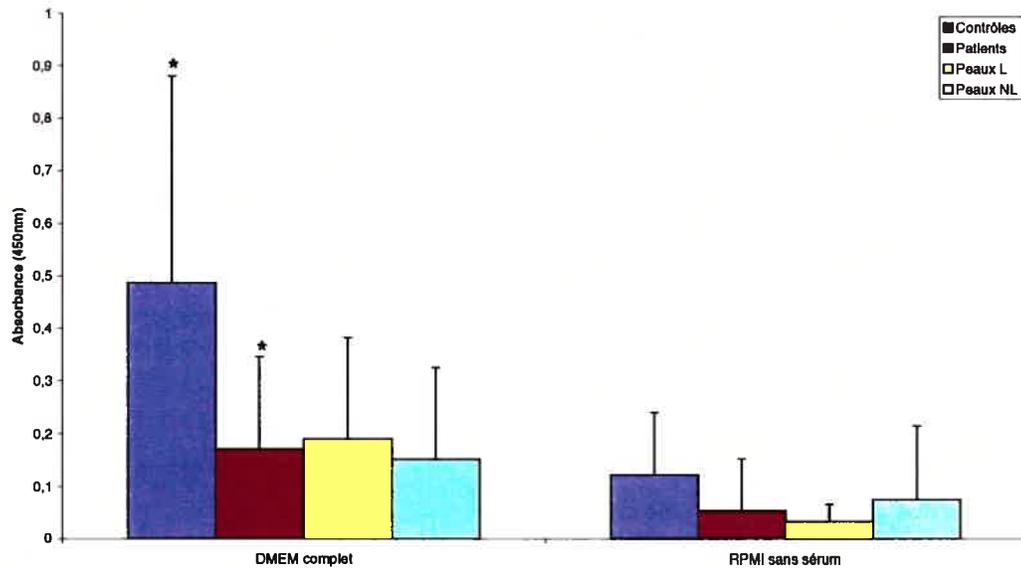
Dans un premier temps, des essais de prolifération cellulaire ont été faits. Ces expériences n'ont été faites qu'une seule fois étant donné que les résultats obtenus étaient similaires à d'autres résultats déjà obtenus dans le laboratoire. Les fibroblastes ont été mis en culture dans un milieu complet DMEM contenant 10% SVF. À confluence de 50%, les cellules ont été mises en présence de nocodazole, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, pendant 24 h. Le nocodazole permet d'arrêter les cellules en  $G_2/M$  et donc de voir le pourcentage de cellules en prolifération. Ces études préliminaires permettaient déjà d'observer une différence de prolifération entre les fibroblastes de 2 patients et de 2 témoins (Figure 5). En effet, le pourcentage moyen de cellules en  $G_2/M$  pour les témoins était de 50% comparativement à 25% pour les échantillons de peau du patient A. La moyenne pour les échantillons de peau du patient B, à 39%, était également inférieure aux

témoins. Ce dernier pourcentage est plus élevé que celui du patient A et se rapproche de des témoins. La sévérité de la maladie semble avoir une influence sur la prolifération cellulaire, car les fibroblastes du patient A, sévèrement atteint, proliféraient moins rapidement que ceux du patient B, moins sévèrement atteint (Tableau II et figure 5). Il ne semble pas y avoir de différence de prolifération entre les peaux lésionnelles et non-lésionnelles pour chaque patient.

Un autre type d'expérience sur la prolifération cellulaire a été pratiqué avec toutes les populations de fibroblastes SSc (A-G), témoins (N1-N5) et NHDF dans deux milieux de culture différents, afin de voir l'influence de la déprivation de sérum sur la prolifération (figure 6). Le premier était le milieu standard utilisé pour mettre en culture les fibroblastes, soit du milieu complet DMEM contenant 10% SVF et l'autre un milieu RPMI sans sérum. Après 24 h d'acclimatation dans le milieu complet DMEM, les cellules étaient mises en présence de l'un des deux milieux, DMEM 10% SVF ou RPMI sans sérum, pour un second 24 h. Une solution contenant du BrdU, qui s'incorpore à l'ADN nouvellement synthétisé, était ajoutée au milieu 6 h avant la fin du second 24 h. L'incorporation du BrdU était mesurée par ELISA, ce qui permettait de quantifier la prolifération des cellules. Que se soit dans le milieu complet DMEM ou RPMI sans sérum, les fibroblastes des patients ont un taux de prolifération moins rapide que ceux des témoins. Il s'agit ici de la moyenne des absorbances, suite à un test de prolifération, de tous les fibroblastes des patients



**Figure 5 :** Histogramme du cycle cellulaire des fibroblastes du témoin N1, NHDF et des peaux lésionnelles (L) et non-lésionnelles (NL) des patients A et B. Le premier pic correspond à la phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, le deuxième pic correspond à la phase G<sub>2</sub>/M et la phase S est entre les pics.



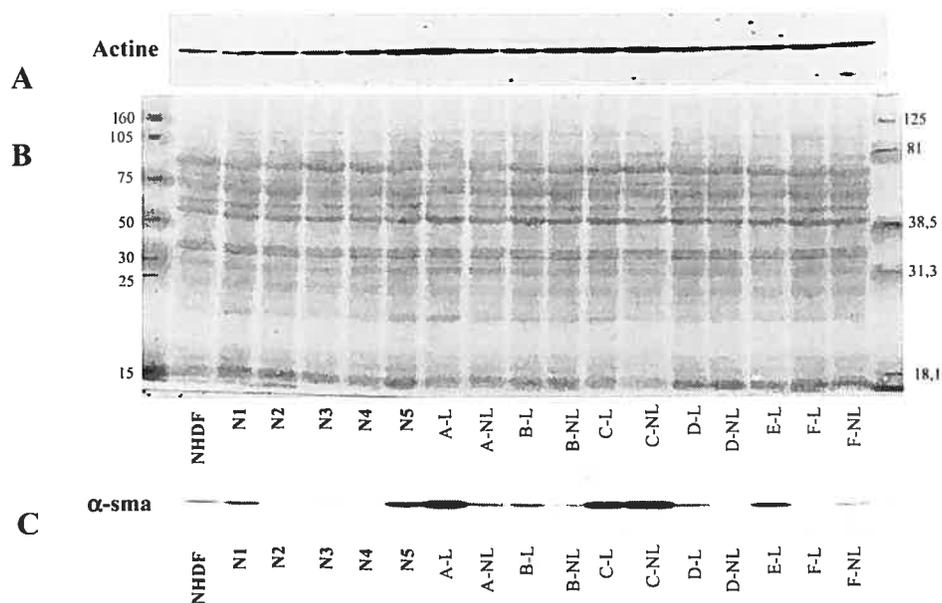
\* : Différence statistiquement significative.

**Figure 6** : Étude de prolifération cellulaire effectuée sur des fibroblastes de 7 patients et de 6 volontaires sains maintenus dans un milieu DMEM avec 10% sérum ou un milieu RPMI sans sérum 24h.

comparée à la moyenne de tous les fibroblastes de volontaires sains et commerciaux. Dans les 2 cas, l'absorbance des fibroblastes des patients est inférieure à la moitié de celle des témoins. Cependant, seuls les fibroblastes des patients dans le milieu DMEM avaient un taux de prolifération plus lent, statistiquement significatif ( $P= 0,032$ ), comparativement aux témoins. De plus, il est à remarquer que le milieu RPMI sans sérum permet de diminuer le taux de prolifération, des fibroblastes SSc et des témoins, ce qui est prévu étant donné l'absence de nutriments. Les différences de prolifération pour les fibroblastes des peaux lésionnelles et non-lésionnelles pour les deux milieux ne sont pas significativement différentes.

### **3. Expression de molécules du cytosquelette**

Avant de procéder aux immunobuvardages pour doser les niveaux d'expression des protéines apoptotiques, il était important de confirmer l'uniformité des quantités de protéines séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Pour ce faire, l'immunobuvardage anti-actine est couramment utilisé, étant donné que cette protéine est exprimée en grande quantité dans les cellules et à des niveaux similaires. Ainsi, il est possible de constater que les niveaux d'actine de tous les puits sont similaires (figure 7A). Une coloration au rouge Ponceau confirme également les quantités uniformes de protéines retrouvées dans chaque puits (Figure 7B).



**Figure 7 :** Immunoblots des protéines de l'actine (A), de la membrane de nitrocellulose colorée au rouge Ponceau (B) et de l' $\alpha$ -sma (C) de fibroblastes NHDF, de 5 volontaires sains (N1-N5) et des peaux lésionnelles et non-lésionnelles de 6 patients (A-F). L' $\alpha$ -sma est un marqueur spécifique des myofibroblastes.

Une autre protéine du cytosquelette, l' $\alpha$ -sma, fut analysée par immunobuvardage plusieurs fois pour tous les patients (figure 7C). Les niveaux d'expression d' $\alpha$ -sma variaient énormément entre les populations de fibroblastes. En effet, l' $\alpha$ -sma était sur-exprimée dans les fibroblastes des deux types de peau du patient C et dans les fibroblastes de la peau lésionnelle des patients A et E, si on les comparait aux témoins. Ainsi, l' $\alpha$ -sma était exprimée plus fortement dans les fibroblastes des peaux lésionnelles que non-lésionnelles pour les patients A, B et D comparativement aux patients C et F. On peut également remarquer que les témoins N1 et N5 exprimaient plus fortement l' $\alpha$ -sma comparativement aux autres témoins, NHDF, N2, N3 et N4.

#### **4. Expression de molécules apoptotiques**

Afin d'analyser l'expression de plusieurs protéines pro- et anti-apoptotiques, ainsi que leurs ARNm respectifs, des séries d'immunobuvardages et de RT-PCR ont été pratiquées. Les immunobuvardages pour détecter les niveaux d'expression des protéines apoptotiques ont été effectués plusieurs fois et les RT-PCR pour détecter les niveaux d'expression des ARNm correspondant ont été faits à deux reprises. L'expression de ces molécules apoptotiques a été comparée entre les patients, en fonction de la sévérité de la maladie, entre les échantillons de peaux, lésionnels vs non-lésionnels, et finalement en comparaison avec les témoins. Étant donné la rareté des échantillons, les immunobuvardages de tous les échantillons n'ont pas pu être faits simultanément. Ainsi,

les immunobuvardages effectués pour les protéines p53, Mcl-1 et c-IAP-1 (figure 8A, 9B et 9C) ont été faits en 2 occasions, où les 3 premiers témoins (NHDF, N1 et N2) étaient comparés aux trois premiers patients (A, B et C) et les trois autres témoins (N3, N4 et N5) aux trois autres patients (D, E et F). Les immunobuvardages effectués pour Bax et Flip-L (figure 9E et 10F) ont été faits en 3 occasions : les 2 premiers témoins (NHDF et N1) furent faits en même temps que les 3 premiers patients (A, B et C), N2 et N3 avec les patients D et E et finalement N5 avec le patient F.

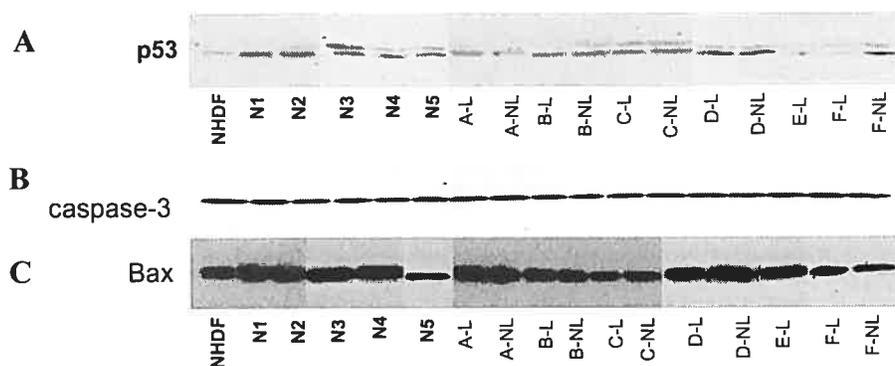
#### **4.1 Molécules pro-apoptotiques**

P53, une protéine pro-apoptotique, était sous-exprimée dans les fibroblastes des deux types de peau du patient A, dans les fibroblastes de peau lésionnelle des patients B, E et F et dans les fibroblastes de la peau non-lésionnelle du patient C, toujours en comparaison avec les témoins (figure 8A). Dans cette étude, d'autres protéines pro-apoptotiques ont été analysées dans les fibroblastes de la peau de patients, mais leur niveau d'expression ne semblait pas varier (figure 8B et 8C). C'est le cas de la caspase-3, qui semblait être exprimée à des niveaux très similaires entre les populations de fibroblastes SSc et les témoins. Enfin, les niveaux d'expression de Bax, une autre protéine pro-apoptotique de la famille des Bcl-2, étaient également similaires parmi toutes les populations de fibroblastes SSc et des témoins, malgré une faible variation entre les contrôles.

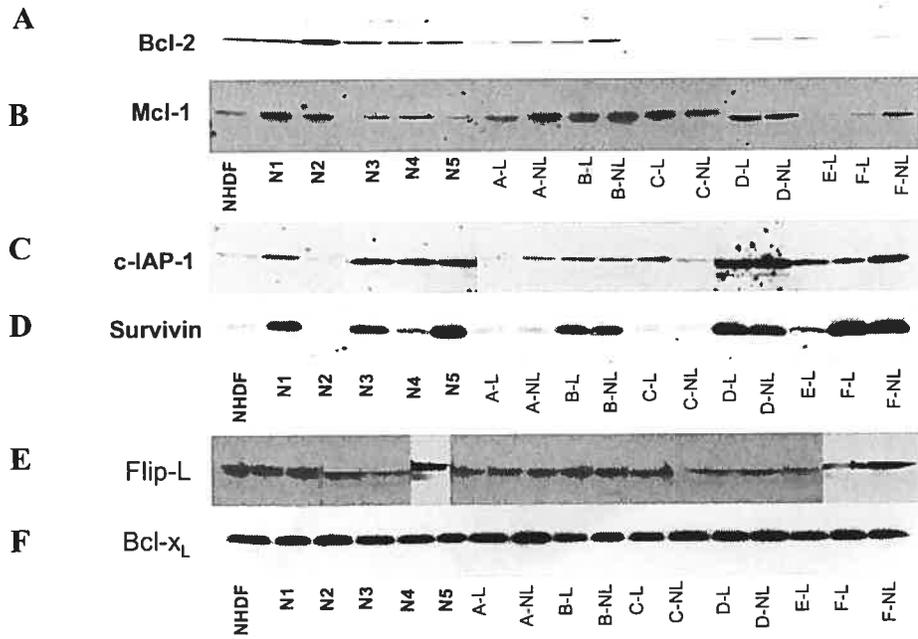
## 4.2. Molécules anti-apoptotiques

Les résultats obtenus démontrent une sous-expression de Bcl-2 dans plusieurs populations de fibroblastes SSc (figure 9A). La sous-expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 était remarquée dans la peau lésionnelle des patients A, D, F et dans les deux types de peau du patient C par rapport aux témoins. Il est à remarquer que l'expression de Bcl-2 était généralement plus faible dans les fibroblastes de la peau lésionnelle des patients que dans ceux de la peau non-lésionnelle. Dans la même famille, Mcl-1, aussi anti-apoptotique, était également sous-exprimé dans les fibroblastes de la peau lésionnelle des patients A, E, F et dans les fibroblastes de la peau non-lésionnelle du patient C par rapport aux autres populations SSc et aux témoins (figure 9B). Il est possible de remarquer que les niveaux d'expression des 3 premiers contrôles sont différents des 3 derniers étant donné que les immunobuvardages ont été faits séparément. Une autre famille de protéines inhibitrices d'apoptose, les IAP, démontrait également des niveaux d'expression variables parmi les populations de fibroblastes SSc. Plus spécifiquement, c-IAP-1 semblait être sous-exprimée dans les fibroblastes de la peau non-lésionnelle du patient C et dans ceux lésionnels des patients A, E et F par rapport aux autres patients et aux témoins (figure 9C). Les niveaux d'expression des contrôles varient également entre eux, étant donné que les immunobuvardages ont également été faits en deux occasions. Dans la même famille, survivin était sous-exprimée dans les fibroblastes des deux types de peaux des patients A et C et dans les fibroblastes de la peau lésionnelle du patient E (figure 9D). Il ne semble pas y avoir de différences marquantes d'expression de survivin entre les

peaux lésionnelles et non-lésionnelles. Cependant, il reste que la sous-expression de survivin était nettement caractéristique des patients les plus sévèrement atteints. Cette fois-ci l'immunobuvardage de la survivin a été fait en une occasion et il est possible de remarquer que les contrôles varient beaucoup entre eux.



**Figure 8 :** Immunoblots de lysats de fibroblastes NHDF, de 5 volontaires sains (N1-N5) et de peaux lésionnelles (L) et non-lésionnelles (NL) de 6 patients (A-F). Les protéines ciblées sont : A, p53 (bande inférieure) qui démontre des niveaux d'expression variable. B, caspase-3 et C, Bax qui sont exprimées de façon similaire parmi toutes les populations de fibroblastes.



**Figure 9 :** Immunoblots de lysats de fibroblastes NHDF, de 5 volontaires sains (N1-N5) et de 6 patients (A-F), contre les protéines Bcl-2 (A), Mcl-1 (B) c-IAP-1 (C), survivin (D), FlipL (E) et Bcl-x<sub>L</sub> (F).

D'autres protéines anti-apoptotiques ont été analysées sans démontrer de différence de niveau d'expression entre les populations de fibroblastes, tant SSc que témoins. Le premier exemple est celui de la protéine anti-apoptotique FlipL qui démontrait des niveaux d'expressions similaires entre les fibroblastes de SSc et des témoins (figure 9E). Finalement, dans la grande famille de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> aussi anti-apoptotique, était également exprimée à des niveaux très similaires dans les fibroblastes de patients et des témoins (figure 9F). En résumé, la sous-expression de 4 protéines anti-apoptotiques, Bcl-2, Mcl-1, c-IAP-1 et survivin est principalement remarquée dans les fibroblastes des patients les plus sévèrement atteints, tels les patients A, C, D et F, plus spécifiquement dans les fibroblastes lésionnels, sauf pour survivin. Il est possible de retrouver au Tableau III une évaluation sommaire des niveaux d'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques ainsi que de la protéine du cytosquelette  $\alpha$ -sma afin de mieux cerner l'influence de la sévérité de la maladie.

### **4.3. ARNm de certaines protéines apoptotiques**

Les niveaux d'expression des ARNm de plusieurs protéines apoptotiques analysées en immunobuvardage ont été analysés par RT-PCR (figure 10). Une RT-PCR pour vérifier les niveaux d'ARNm de GAPDH a tout d'abord été effectuée afin de vérifier l'uniformité des ARNm analysés entre 4 populations de fibroblastes de peau de patients (A, B, C et G)

**Tableau III :** Évaluation sommaire des résultats d'immunoblots selon le niveau d'expression des protéines apoptotiques.

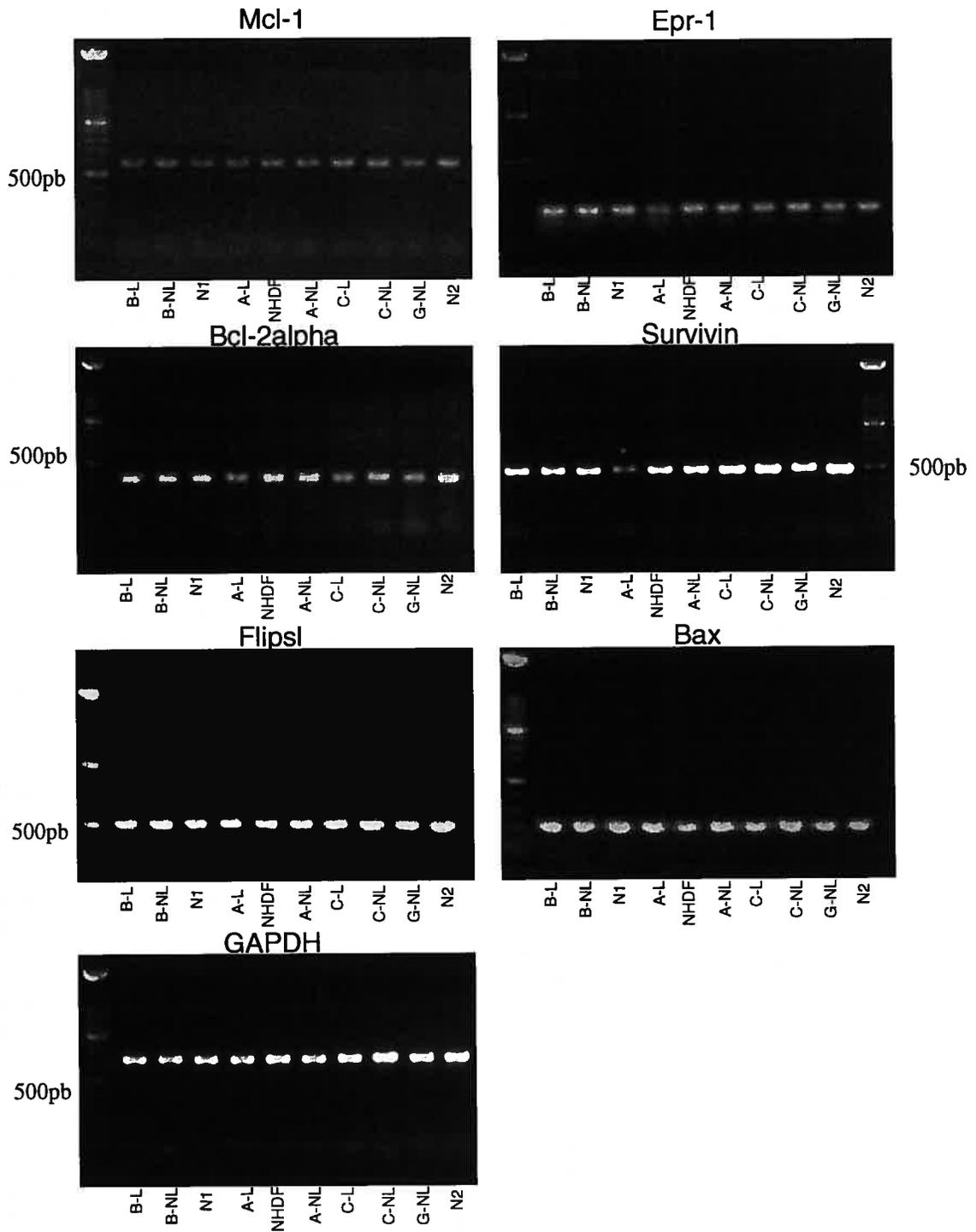
Atteinte de la maladie /Types de SSc		Patients	$\alpha$ -sma	Survivin	Bcl-2	Mcl-1	c-IAP-1	P53
Sévère	Diffuse précoce	A	+++	-	+	+	-	-
	Diffuse tardive	C	+++	-	-	+	-	+
	Diffuse très précoce (phase oedémateuse)	D	-	++	+	+	++	+
	Diffuse précoce	E	++	-	+	-	+	-
Non-sévère	Diffuse tardive	B	+	++	++	++	+	+
	Limitée tardive	F	-	+++	+	+	+	+

- : Niveau d'expression allant de nul à faible

+ : Niveau d'expression moyen

++ : Niveau d'expression fort

+++ : Niveau d'expression très fort

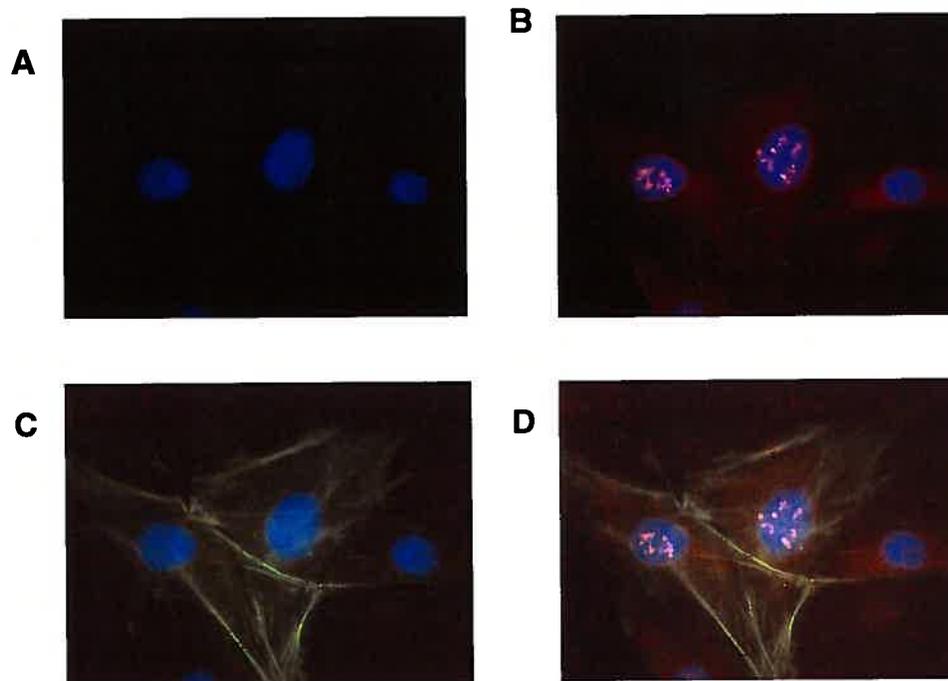


**Figure 10 :** RT-PCR effectuée à l'aide de cDNA fait à partir d'ARNm de lysats de fibroblastes de peaux lésionnelles (L) et non-lésionnelles (NL) à passage 6 de 4 patients (A, B, C et G) et de 2 volontaires sains (N1-N2) et NHDF.

et des témoins. Par la suite, les niveaux d'ARNm de Mcl-1, EPR-1, Bcl-2 $\alpha$ , survivin, Bax et FlipSL ont été analysés et aucune différence majeure n'était observée entre les populations de fibroblastes SSc et des témoins. L'ADNc de EPR-1 est connu pour être identique à celui de survivin, mais avec une orientation opposée et quelques différences de nucléotides. La seule différence marquée est observée pour l'ARNm de survivin dans les fibroblastes de la peau lésionnelle du patient A. Il semble également y avoir des différences pour l'expression de l'ARNm de Bcl-2 $\alpha$ , mais ces variations ne sont pas aussi significatives que celles de survivin.

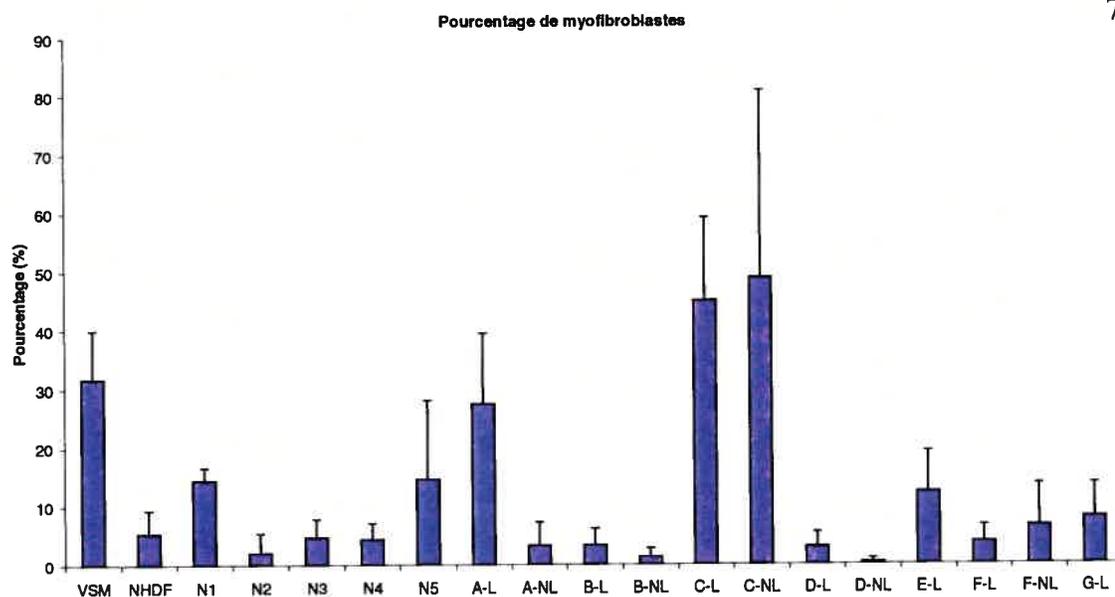
## **5. Immunofluorescence**

Par la suite, des études d'immunofluorescence ont été effectuées à l'aide d'un double marquage dirigé contre survivin et l' $\alpha$ -sma retrouvées dans les fibroblastes de patients afin de vérifier l'influence des myofibroblastes sur l'expression de survivin (figure 11 et 12). Ces expériences ont été faites à deux reprises afin de valider les résultats. L'analyse a été faite en 4 étapes : pourcentage de myofibroblastes retrouvés dans les populations de fibroblastes, pourcentage de survivin totale, i.e. dans les fibroblastes et les myofibroblastes, pourcentage de survivin retrouvée dans les fibroblastes seulement et pourcentage de survivin retrouvée dans les myofibroblastes présents dans les populations de fibroblastes originales. Il est possible de voir un exemple de ces images d'immunofluorescence pour la survivin et l' $\alpha$ -sma à la figure 11. On peut remarquer que les

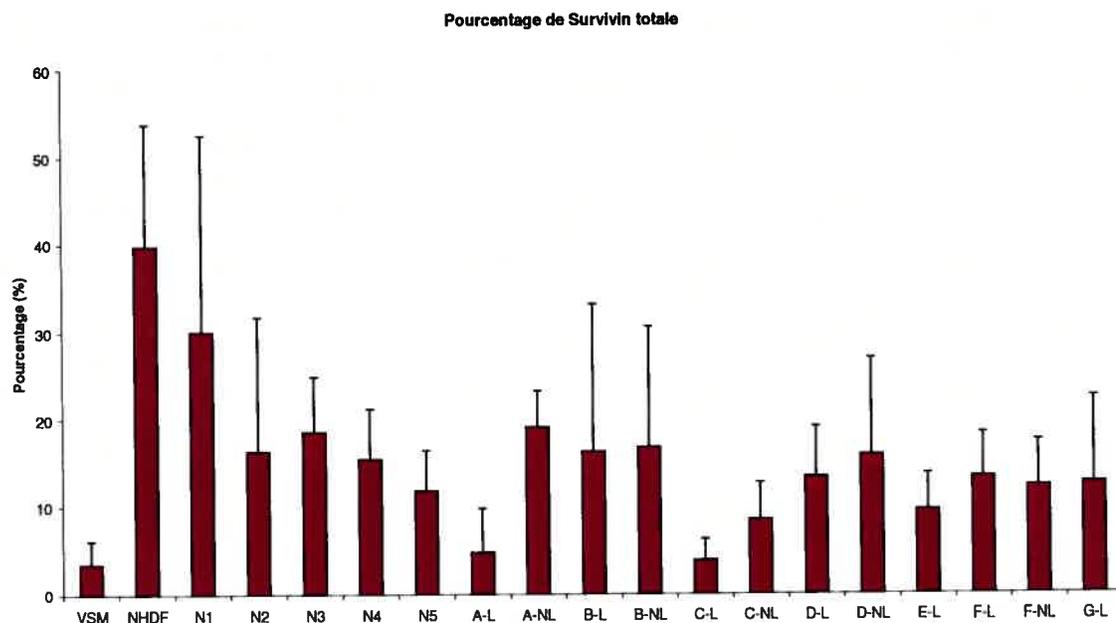


**Figure 11 :** Exemple d'immunofluorescence effectuée à l'aide d'un double marquage dirigé contre les protéines survivin et  $\alpha$ -sma de fibroblastes du témoin N1. Les photos ont été prises à un grossissement de 100X. En A, les conjugués-Alexa et -FITC seul, en B, survivin (rouge), en C, l' $\alpha$ -sma (vert) et en D, la superposition de B et C. En bleu, les noyaux colorés au Hoechst # 33258.

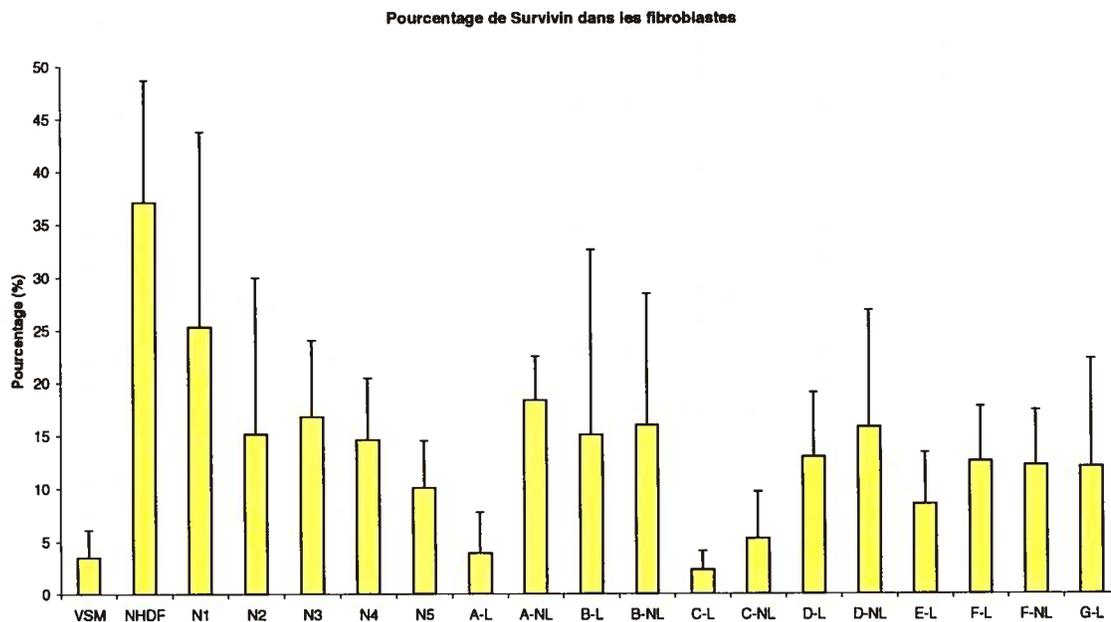
A



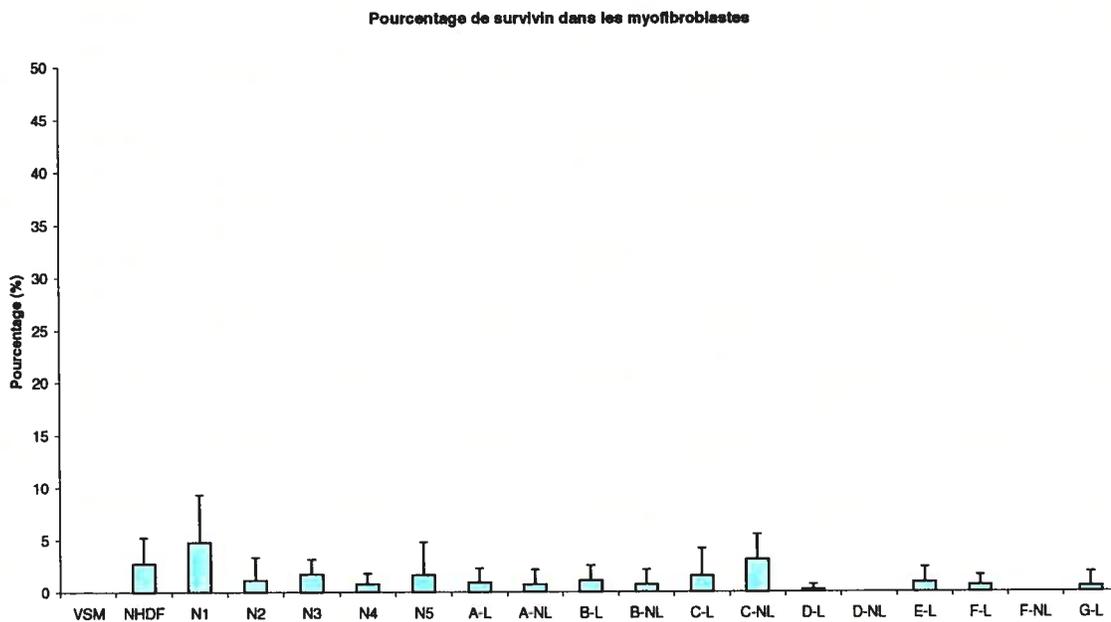
B



C



D



**Figure 12 :** Résultats après un double marquage dirigé contre la Survivin et l' $\alpha$ -sma par immunofluorescence sur des lames de VSM, de fibroblastes NHDF, de 5 volontaires sains (N1-N5) et de peaux lésionnelles (L) et non-lésionnelles (NL) de 7 patients (A-G). A) Pourcentage de myofibroblastes dans les populations de fibroblastes, B) Pourcentage de Survivin dans les populations de fibroblastes sans discrimination de fibroblastes ou myofibroblastes, C) Pourcentage de Survivin dans les fibroblastes seulement et D) Pourcentage de Survivin dans les myofibroblastes.

populations de fibroblastes des patients contenant le plus fort pourcentage de myofibroblastes étaient ceux issus de la peau lésionnelle des patients A et E et des deux types de peau du patient C comparativement aux témoins (figure 12A). Les VSM étaient des cellules musculaires lisses vasculaires exprimant fortement l' $\alpha$ -sma et servaient donc de contrôle positif. Ces résultats représentent bien les résultats observés par immunobuvardages (figure 7C). De plus, il existe la même tendance à retrouver plus d' $\alpha$ -sma dans les fibroblastes de peau lésionnelle que non-lésionnelle. Lorsqu'on regarde les pourcentages de cellules avec survivin dans les populations de fibroblastes de peau de patients, on remarque que les pourcentages trouvés étaient similaires aux témoins pour la majorité des populations cellulaires, sauf pour celles de la peau lésionnelle du patient A et des deux types de peau du patient C, qui étaient plus faibles (figure 12B). Les fibroblastes de la peau lésionnelle du patient E semblent également avoir un plus faible pourcentage de survivin comparativement aux autres populations cellulaires des patients et des témoins (figure 12B). Deux observations supplémentaires ont pu être faites : 1) les populations cellulaires des peaux lésionnelles tendaient à avoir un plus faible pourcentage de survivin comparativement aux peaux non-lésionnelles, 2) et les pourcentages de survivin les plus élevés, se rapprochant des témoins, chez les populations de SSc étaient retrouvés dans les fibroblastes de peau non-lésionnelle et chez les patients les moins sévèrement atteints, comme les patients B, D, F et G. Maintenant, en analysant spécifiquement le pourcentage de survivin retrouvée dans les fibroblastes et les myofibroblastes séparément, il est possible

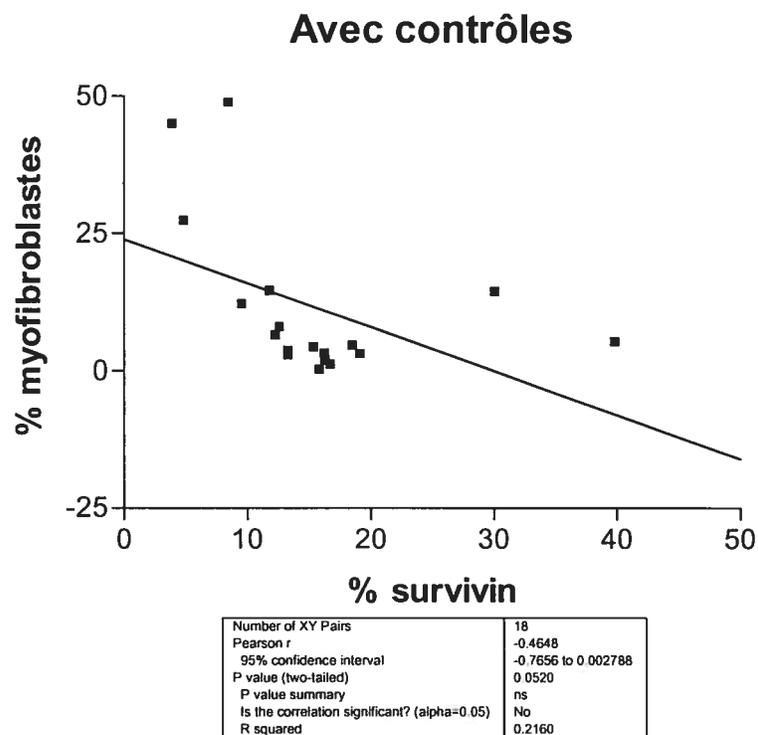
de remarquer que ce sont les fibroblastes qui exprimaient majoritairement la survivin et très peu les myofibroblastes (figure 12C et D).

## 6. Études de corrélation

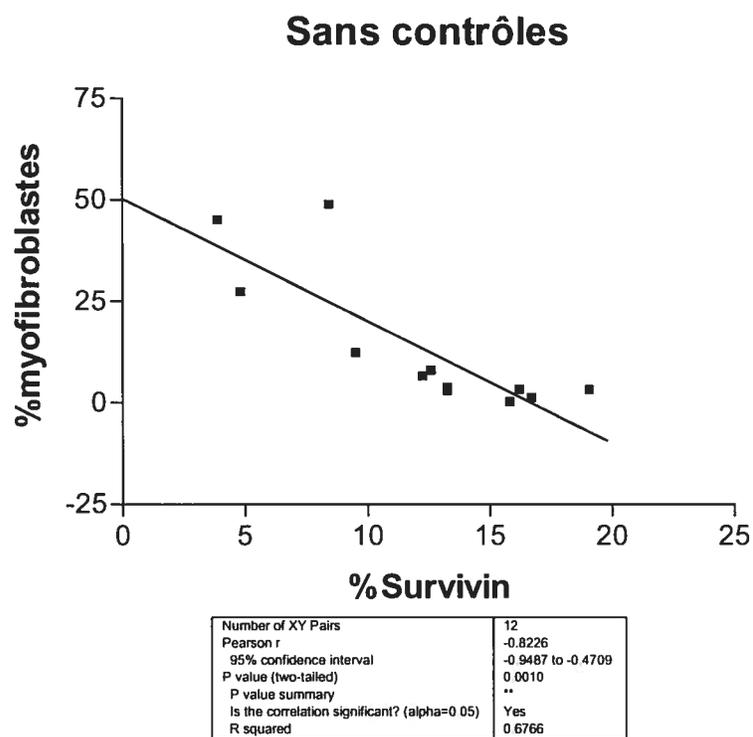
Dès les premières expériences, les immunobuvardages de fibroblastes traités au nocodazole 24 h permettaient de constater une certaine corrélation entre la sur-expression de l' $\alpha$ -sma et la sous-expression de survivin, et inversement, pour les patients A et B. Cette corrélation pouvait se faire avec l'étude de prolifération au nocodazole, où les populations à plus faible pourcentage en G<sub>2</sub>/M exprimaient plus de myofibroblastes et moins de survivin, et inversement. Cette corrélation tend à se maintenir pour tous les patients et témoins en analysant les immunobuvardages d' $\alpha$ -sma et de survivin (figure 7C, 9D et tableau III). Ainsi, après avoir effectué une étude de double marquage par immunofluorescence (figure 12), une étude de corrélation a été faite (figure 13). Dans un premier temps, l'étude de corrélation selon la méthode de Pearson a été faite en prenant en compte les témoins. La corrélation s'avère non-significative avec un P de 0,0520 et un R<sup>2</sup> de 0,2160. Toutefois, en éliminant les témoins, la corrélation devient très significative, avec un P de 0,0010 et un R<sup>2</sup> de 0,6766. Ainsi, cette corrélation qui tend à démontrer la relation inverse entre la présence de myofibroblastes et l'expression de survivin est très significative lorsque les témoins sont mis de côté et que seuls les patients SSc sont tenus en compte, suggérant un phénomène associé spécifiquement à la maladie. La corrélation tend à nous indiquer que plus il y a de

myofibroblastes, moins l'expression de survivin est détectée dans les populations de fibroblastes.

Après avoir constaté l'influence des myofibroblastes sur l'expression de survivin, une autre étude de corrélation a été tentée pour voir si la présence des myofibroblastes pouvait influencer significativement l'expression de Bcl-2 (figure 14). L'étude de corrélation a été faite en mesurant la densité des bandes obtenues par les immunobuvardages de Bcl-2 et d' $\alpha$ -sma. Les corrélations avec (P=0,1182; R<sup>2</sup>=0,1548) ou sans témoins (P=0,1577; R<sup>2</sup>=0,2088) s'avèrent non-significatives, mais il semble tout de même y avoir une tendance où la forte présence de myofibroblastes semble corrélérer avec une sous-expression de Bcl-2, surtout chez les patients sévèrement atteints de la maladie, comme les patients A, C et E (figure 7C, 9A et tableau III).



A



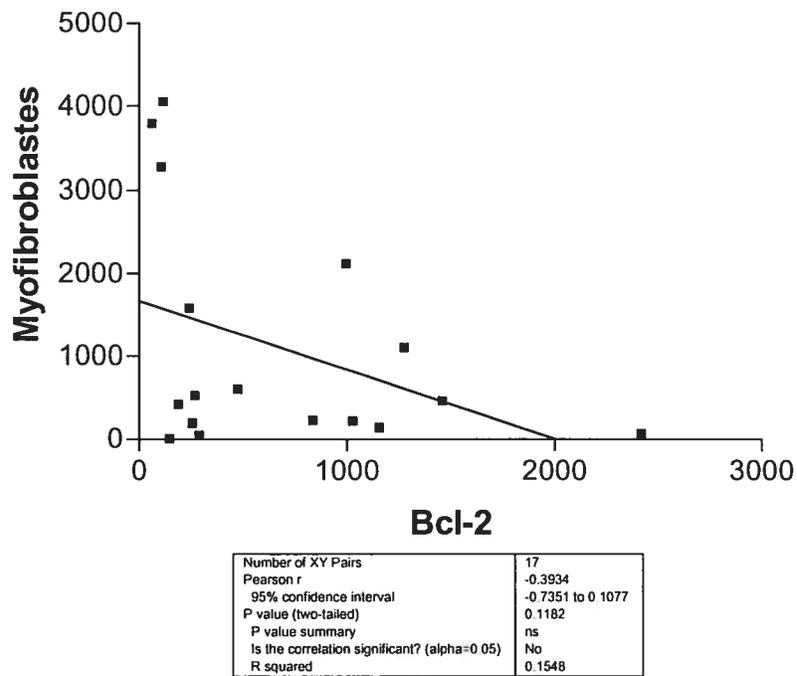
B

**Figure 13 :** Étude de corrélation avec (A) et sans contrôles (B) entre le pourcentage de Survivin et de myofibroblastes suite à un test d'immunofluorescence de double marquage dirigé contre ces protéines sur des lysats de fibroblastes de 7 patients SSc, 5 volontaires sains, NHDF et VSM.

A

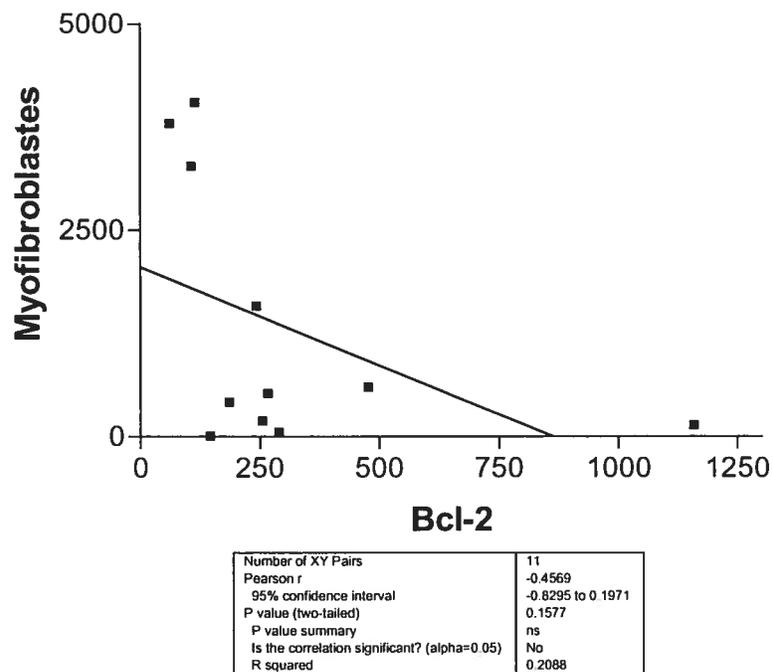
## Avec contrôles

85



B

## Sans contrôles



**Figure 14** : Étude de corrélation avec (A) et sans contrôles (B) entre l'expression de Bcl-2 et de myofibroblastes après immunoblot fait sur des lysats de fibroblastes de 6 patients SSc (A-F), 5 volontaires sains et NHDF. Les valeurs sont en fonction de l'aire sous la courbe.

## **Discussion**

Les biopsies effectuées sur les peaux de plusieurs patients SSc et de volontaires sains ont permis d'effectuer une série d'expériences sur les fibroblastes, une fois isolés par le LOEX de Québec. Cette étude a été faite à l'aide de 7 patients SSc et de 5 volontaires sains. De ces patients, 4 étaient sévèrement atteints de la SSc. Des échantillons de peau lésionnelle et non-lésionnelle ont été prélevés sur chaque patient, sauf pour les patients E et G, à cause de complications diverses. Ainsi, le patient E n'a pu fournir qu'une biopsie de peau lésionnelle et le patient G qu'une biopsie de peau non-lésionnelle. Il est également important de mentionner que l'état de la maladie du patient C était très sévère. D'un point de vue clinique, trouver une partie de peau non-lésionnelle sur ce patient a été plutôt difficile. Ainsi, les fibroblastes de la peau non-lésionnelle du patient C pourraient être considérés comme ceux d'une peau lésionnelle. De plus, il est intéressant de noter que l'état de la maladie du patient D était à un stade très précoce (oedémateuse), précédant la sclérose cutanée, et potentiellement réversible.

### **1. Études de prolifération cellulaire**

Dans la SSc, la tendance qu'ont les fibroblastes à persister et à proliférer augmente les risques de fibrose. En effet, le stade tardif de la maladie est généralement caractérisé par une prolifération des fibroblastes et une sécrétion excessive de collagène (Vaishnay & *al*, 1997). À l'inverse, nos premiers résultats de prolifération cellulaire ont démontré que

les fibroblastes traités au nocodazole du patient A (25,5% de cellules en G<sub>2</sub>/M) et du patient B (38,5% en G<sub>2</sub>/M) proliféraient moins rapidement que ceux des témoins (environ 50% en G<sub>2</sub>/M) (figure 5). La sévérité de la maladie pourrait influencer la prolifération, car les fibroblastes du patient A, atteint plus sévèrement, prolifèrent moins rapidement que ceux du patient B et des témoins, après 24 heures de traitement au nocodazole. Le nocodazole, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, permet d'arrêter les cellules en G<sub>2</sub>/M et donc d'évaluer le taux de prolifération dans les populations de fibroblastes SSc. Le nocodazole est normalement utilisé pour synchroniser les cellules. Il permet d'accumuler des cellules mitotiques en G<sub>2</sub>/M et, lorsqu'on le retire du milieu, les cellules poursuivent leur progression dans le cycle (Zieve & al, 1980). Or, il est connu que le cycle cellulaire prend en moyenne 24 h pour se compléter (Alberts & al, 2002). Ainsi, les cellules qui prolifèrent moins rapidement ne devraient pas se retrouver en phase G<sub>2</sub>/M, mais bien en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

Une autre étude de prolifération cellulaire a permis de mesurer l'incorporation de BrdU, avec tous les patients (A-G) et tous les témoins (N1-N5 et NHDF). Les résultats obtenus appuient ceux du nocodazole, car les fibroblastes des patients prolifèrent moins rapidement que ceux des témoins en absence ou en présence de sérum (figure 6). Seule la différence de prolifération dans le milieu avec sérum a été statistiquement significative.

Aucune différence de prolifération n'est observée entre les fibroblastes des peaux lésionnelles et non-lésionnelles pour les deux types d'expériences.

Les cytokines qui stimulent la prolifération sont souvent associées à l'expression de molécules de survie comme Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, dans le but de bloquer les voies apoptotiques (Vaishnay & al, 1997). La plupart des expériences effectuées jusqu'à maintenant ont utilisé des fibroblastes SSc stimulés par l'ajout de certaines molécules, telles que le TGF- $\beta$ . Nos résultats n'ont pas su démontrer une augmentation de la prolifération des fibroblastes des patients, mais plutôt une diminution de celle-ci par rapport à celle des volontaires sains (figure 5 et 6). L'absence de plusieurs cytokines, sur-exprimées *in vivo*, est peut-être la cause du faible taux de prolifération des fibroblastes SSc que nous avons observés *in vitro*. Les niveaux d'expression de Bcl-2 des fibroblastes des patients les plus sévèrement atteints ont été effectivement très faibles, les mêmes dont les fibroblastes ont démontré des problèmes de prolifération (figure 9A). Le patient A, sévèrement atteint, est un très bon exemple. La comparaison des résultats d'immunobuvardage pour Bcl-2 (figure 9A) et de la prolifération cellulaire après le traitement au nocodazole (figure 5) des fibroblastes de ce patient permet d'observer que tous deux sont faibles. Il en est de même pour les fibroblastes des patients C et E, également sévèrement atteints, qui ont démontré une prolifération plus ralentie que les autres et une sous-expression de Bcl-2 (Annexes I et figure 9A). Ces résultats semblent donc suggérer que les faibles taux de prolifération des

fibroblastes SSc, particulièrement ceux des patients sévèrement atteints, puissent être associés à l'absence ou à la faible présence de molécules stimulatrices *in vitro* représentatives de la sous-expression de Bcl-2.

## 2. Expression de l' $\alpha$ -sma

La SSc est une maladie auto-immune caractérisée par une fibrose progressive de plusieurs tissus et organes, tels que la peau, les poumons, le tractus gastro-intestinal, le système musculosquelettique, le cœur et les reins (Grodzicky & Elkon, 2000). Ce sont les fibroblastes qui régulent ce procédé et leur prolifération, activation et mort dépendent de plusieurs facteurs exogènes et endogènes. La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, i.e. en fibroblastes activés, est une étape cruciale dans la fibrose, car les myofibroblastes synthétisent de grandes quantités de protéines de l'ECM et régulent les éléments contractiles qui génèrent la force nécessaire à la fermeture des blessures et des plaies, dans une peau normale (Kirk & Mayes, 1999 ; Kissin & Korn, 2002).

Un premier immunobuvardage anti- $\alpha$ -sma, un marqueur spécifique des myofibroblastes, a permis de remarquer que les fibroblastes de 3 patients sévèrement atteints, les patients A, C et E, ont généralement sur-exprimé l' $\alpha$ -sma (figure 7C). De plus, les fibroblastes des peaux lésionnelles de quelques patients, les patients A, B et D, ont sur-

exprimé l' $\alpha$ -sma, comparativement aux peaux non-lésionnelles. Il est difficile de conclure pour le patient E qui n'a pu fournir d'échantillon de peau non-lésionnelle. De plus, le patient C a sur-exprimé l' $\alpha$ -sma dans les deux échantillons de peaux, contrairement au patient F. En considérant les fibroblastes de la peau non-lésionnelle du patient C comme ceux d'une peau lésionnelle, il est possible de conclure que tous les patients, sauf le patient F, ont exprimé plus fortement l' $\alpha$ -sma dans la peau lésionnelle que non-lésionnelle. L'étude en immunofluorescence a également permis d'analyser les niveaux d' $\alpha$ -sma et ces résultats confirment ceux obtenus en immunobuvardages (figure 7C et 12A).

Les patients les plus sévèrement atteints par la maladie ont donc démontré une sur-expression de l' $\alpha$ -sma par rapport aux témoins et aux autres populations de fibroblastes. Dans les tests de prolifération utilisant l'inhibiteur de microtubules, nocodazole, et l'incorporation du BrdU, les fibroblastes des patients A, C et E ont été ceux qui proliféraient le moins rapidement et qui sur-exprimaient l' $\alpha$ -sma dans leur peau lésionnelle (figure 5, 7C et Annexe I).

La pureté des cellules isolées par le LOEX était de plus de 98%. La pureté des populations de cellules a été déterminée par immunofluorescence à l'aide de marqueurs spécifiques des différents types cellulaires. L' $\alpha$ -sma a permis de vérifier la pureté des

péricytes, aussi caractérisés par ce marqueur. Le marquage à la kératine AE3 identifiait les kératinocytes. Finalement la pureté des fibroblastes a été calculée comme la portion de cellules négatives pour le facteur VIII et les autres marqueurs mentionnés précédemment. La culture originale de ces fibroblastes isolés des biopsies est donc presque pure en fibroblastes. La différenciation de ces fibroblastes en myofibroblastes observée est caractéristique de la SSc (Yamamoto & Nishioka, 2002)

L'expression de l' $\alpha$ -sma varie légèrement entre les témoins, surtout pour les patients N1 et N5 qui l'expriment plus fortement. Il a déjà été démontré *qu'in vitro*, plus de 50% des fibroblastes SSc étaient positifs pour l' $\alpha$ -sma et que moins de 10% des fibroblastes normaux l'étaient (Yamamoto & Nishioka, 2002). Il est donc possible d'observer des myofibroblastes dans les populations témoins. Morphologiquement, les populations de fibroblastes de ces témoins ne ressemblaient en rien à celles des patients. Elles semblaient normales comparativement aux cellules parfois énormes de certains patients, surtout celles des patients A et C. De plus, la coloration au FITC de l' $\alpha$ -sma, dans la technique d'immunofluorescence, des fibroblastes des témoins N1 et N5, n'était jamais aussi bien définie et lumineuse que celle des fibroblastes des patients. C'est-à-dire que la fluorescence marquant l' $\alpha$ -sma présente dans ces cellules était d'une intensité et d'une précision beaucoup moins importante, suggérant une différenciation moins bien définie.

Certaines cellules *in vivo* démontrent des similitudes morphologiques aux myofibroblastes, sans pour autant exprimer l' $\alpha$ -sma. Ces cellules représentent un autre type de myofibroblastes, les proto-myofibroblastes. La distinction entre les fibroblastes et les proto-myofibroblastes est particulièrement claire *in vivo*, mais en culture sur un substrat de plastique et en présence de sérum de veau foetal, pratiquement tous les fibroblastes acquièrent des aspects de proto-myofibroblastes : fibres de stress, sites d'adhésion focale et fibrilles de fibronectine. Les proto-myofibroblastes peuvent être stimulés à exprimer l' $\alpha$ -sma pour devenir des myofibroblastes en réponse à certains facteurs (Tomasek & al, 2002). Les cellules en culture semblent donc adopter des caractéristiques spécifiques des proto-myofibroblastes. L'hétérogénéité des fibroblastes dans une population pourrait suggérer la susceptibilité de certains fibroblastes à se différencier en myofibroblastes en passant par un stade de proto-myofibroblastes. On pourrait alors supposer qu'une sous-population des fibroblastes des témoins N1 et N5 s'est engagée à se différencier en myofibroblastes en demeurant au stade de proto-myofibroblastes. Ces myofibroblastes, ou autres cellules similaires aux myofibroblastes, des témoins N1 et N5, étaient vraiment différents de ceux des patients, tant morphologiquement que par l'intensité du signal observé en immunofluorescence.

### **3. Expression de molécules apoptotiques**

#### **3.1. Bcl-2**

La sous-expression de Bcl-2 est remarquée dans les fibroblastes de la peau lésionnelle des patients A, D, F et les deux échantillons de peau du patient C, par rapport aux témoins (figure 9A). La sous-expression de Bcl-2 est majoritairement retrouvée dans les fibroblastes de 3 patients atteints sévèrement par la SSc, les patients A, D et C. Bcl-2 est également sous-exprimée dans les fibroblastes des peaux lésionnelles et non dans ceux des peaux non-lésionnelles pour la plupart des populations de fibroblastes SSc, sauf celles du patient C qui a sous-exprimé Bcl-2 dans ces deux échantillons de peau. Cette observation est encore plus marquante lorsque l'on considère la peau non-lésionnelle du patient C comme une peau lésionnelle. Ainsi, Bcl-2 est sous-exprimée dans tous les fibroblastes des peaux lésionnelles.

Dans la SSc, quelques auteurs ont suggéré que Bcl-2 est sur-exprimé dans les fibroblastes résistants à l'apoptose (Grodzicky & Elkon, 2000). Des résultats préliminaires de résistance à l'apoptose et de prolifération ont déjà été faits au laboratoire sur certaines populations de fibroblastes de patients. Les résultats ont démontré une diminution de la prolifération et une augmentation du taux d'apoptose après un traitement anti-Fas comparativement aux témoins. La prolifération a été mesurée par l'incorporation de BrdU et l'apoptose par immunofluorescence après une coloration au Hoescht/PI. Ces résultats

contraires à certaines études sont en accord avec la sous-expression de Bcl-2 retrouvée dans les différentes populations de fibroblastes SSc. Ces résultats préliminaires ne peuvent que témoigner de la grande complexité de la SSc.

Bcl-2 est capable de faire entrer en quiescence, phase  $G_0/G_1$ , des cellules (Greider & *al*, 2002). Il est bien connu que l'adhésion des cellules épithéliales et EC à la matrice est nécessaire pour leur survie. Contrairement aux cellules épithéliales et EC, les fibroblastes n'entrent pas en apoptose lorsque l'adhésion à la matrice cellulaire est perdue. Les cellules entrent plutôt en phase  $G_0/G_1$  du cycle cellulaire et diminuent la synthèse protéique (Kissin & Korn, 2002). C'est ce qui semble se passer avec les fibroblastes des patients sévèrement atteints. Mis à part la sur-expression de l' $\alpha$ -sma, les autres protéines apoptotiques sont sous-exprimées, et non-sur-exprimées, dans les fibroblastes SSc sévèrement atteints, ce qui est caractéristique des cellules en quiescence (figure 8A et 9A-D). Le fait que Bcl-2 soit sous-exprimée suggère que d'autres protéines puissent être responsables de l'arrêt des cellules en quiescence, telles que Bcl-x<sub>L</sub>. Il est possible d'envisager que ce phénomène soit caractéristique de la SSc, étant donné que les cellules normales en quiescence devraient la sur-exprimer. La prolifération cellulaire ralentie des fibroblastes ou sous-groupes de fibroblastes de certains patients suggère leur entrée en quiescence ou phase  $G_0/G_1$  (figure 5). De plus, ces populations de fibroblastes démontrent effectivement beaucoup plus de difficulté à atteindre la pleine confluence en culture.

La sous-expression de Bcl-2 est majoritairement caractéristique des patients sévèrement atteints. Les cellules de ces mêmes patients sont également celles ayant des problèmes de prolifération et de sur-expression de l' $\alpha$ -sma. La sur-expression de l' $\alpha$ -sma n'est cependant pas corrélée de façon significative avec la sous-expression de Bcl-2 (figure 14). En ne tenant compte que des patients A et C, l'évidence de cette corrélation s'observe (figure 5, 7C, 9A et Annexe I). Le recrutement d'autres patients est nécessaire avant d'expliquer chez les fibroblastes SSc, que la sous-expression de Bcl-2 soit corrélée à un ralentissement de la prolifération et à une sur-expression de l' $\alpha$ -sma.

### **3.2. Survivin**

Aucune étude de l'expression de la survivin chez des patients SSc n'a été faite jusqu'à ce jour. Cette protéine est sur-exprimée dans différents cancers humains. Plusieurs auteurs suggèrent que les fibroblastes SSc prolifèrent plus rapidement lors du stade tardif de la maladie, comparativement au fibroblastes normaux. Ces fibroblastes seraient également résistants à l'apoptose. Ainsi, ces différentes études de prolifération et d'apoptose effectuées sur des fibroblastes SSc justifiaient l'intérêt qu'on devait porter à survivin, une protéine anti-apoptotique et régulatrice du cycle cellulaire.

Les immunobuvardages effectués ont démontré que survivin est sous-exprimée dans les fibroblastes des deux échantillons de peau des patients A et C et dans ceux lésionnels du patient E (figure 9D). Il est difficile de conclure à cause de l'absence de la peau non-lésionnelle du patient E, mais la sous-expression de survivin n'a pas semblé varier entre les fibroblastes des deux échantillons de peau. Comme Bcl-2, l'expression de survivin aurait dû être élevée dans la majorité des fibroblastes de SSc, si l'on tient compte de plusieurs études démontrant l'augmentation de la prolifération des fibroblastes tard dans la SSc. Tout comme pour Bcl-2, de nombreuses études démontent la sur-expression de survivin dans plusieurs cancers humains (Zhao & al, 2000 ; Reed, 2001). Les résultats ont démontré, encore une fois, la sous-expression d'une protéine, survivin, chez les patients sévèrement atteints, tels que les patients A, C et E. Les autres patients moins sévèrement atteints exprimaient tous plus fortement survivin, mais à des niveaux similaires à ceux des témoins. Les résultats d'immunofluorescence sont très représentatifs de ceux de l'immunobuvardage anti-survivin, sauf pour la peau non-lésionnelle du patient A qui sous-exprime la survivin en immunobuvardage et l'exprime normalement en immunofluorescence (figure 9D, 12B-C).

La survivin est aussi une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et est principalement exprimée dans la phase G<sub>2</sub>/M du cycle cellulaire (O'Connor & al, 1999 ; Reed, 2001). Ainsi il est normal que les cellules qui ne prolifèrent presque pas, en

quiescence ou en phase  $G_0/G_1$ , probablement comme celles des patients A, C et E, sous-expriment survivin. Ces populations de fibroblastes de patients sévèrement atteints sont effectivement les populations ayant les pourcentages les plus élevés de myofibroblastes (figure 12A). La corrélation entre la forte présence de myofibroblastes et la sous-expression de survivin lors des expériences a été significative (figure 13). De plus, ces études d'immunofluorescence ont permis de démontrer que survivin est principalement exprimée par les fibroblastes et non par les myofibroblastes (figure 12C et D). Ces résultats suggèrent que la sévérité de la maladie soit associée à une sous-expression de survivin dans les populations de fibroblastes de patients contenant beaucoup de myofibroblastes. De plus, cette corrélation entre l' $\alpha$ -sma et survivin s'ajoute à la prolifération ralentie de celles de patients sévèrement atteints par la maladie.

À l'aide des techniques de RT-PCR, les niveaux d'ARNm de certaines protéines apoptotiques, testées en immunobuvardages, ont été analysés. Aucune différence majeure n'est observée mise à part une légère sous-expression de l'ARNm de survivin dans les fibroblastes de la peau lésionnelle du patient A. Ces résultats suggéraient que les variations de l'expression de certaines protéines apoptotiques n'étaient pas dues à des variations transcriptionnelles mais plutôt traductionnelles (figure 10). Ainsi, après plusieurs analyses RT-PCR, les recherches se sont concentrées sur la détection des niveaux d'expression protéique. Lorsque des ARNm sont transcrits, ils ne sont pas nécessairement traduits. La

cellule peut sélectionner quels ARNm sont traduits par les ribosomes, déstabiliser certains ARNm pour favoriser leur dégradation ou inactivation et finalement activer, inactiver, dégrader ou compartimenter les protéines spécifiques produites (Alberts & *al*, 2002). Il existe donc plusieurs points de contrôle à l'intérieur de la cellule pouvant réguler la traduction des ARNm exprimés normalement.

L'expression de survivin varie également dans les populations de témoins. Les témoins N1 et N5, en plus du témoin N3, ont exprimé fortement survivin. Les témoins N2, N4 et NHDF ont exprimé peu ou pas la protéine. Contrairement aux patients SSc, la forte expression d' $\alpha$ -sma ne corrèle pas avec la sous-expression de survivin. Les patients N1 et N5, qui ont exprimé fortement l' $\alpha$ -sma, ont également sur-exprimé survivin, ce qui n'est pas le cas des patients A, C et E. Cette protéine apoptotique qui régule également la division cellulaire, est principalement exprimée en phase G<sub>2</sub>/M du cycle cellulaire, ce qui en fait un indicateur des cellules en prolifération (Reed, 2001). La forte expression d' $\alpha$ -sma pour les fibroblastes des témoins N1 et N5 n'empêcherait donc pas leur prolifération normale.

La sous-expression de survivin corrèle bien avec la prolifération ralentie observée (figure 5, 6 et 9D) et la présence importante de myofibroblastes. L'expression de survivin

diminue rapidement dans la phase G1 et est indécélable dans les cellules quiescentes (Zhao & al, 2000 ; Li & al, 1998). La corrélation entre la présence accrue de myofibroblastes et la sous-expression de survivin est significative seulement dans les populations de fibroblastes SSc. Cette corrélation est non-significative lorsque les résultats de l'immunofluorescence des témoins sont inclus dans l'étude de corrélation, suggérant un phénomène typique de la SSc. La sous-expression, autant dans la peau lésionnelle que non-lésionnelle, de survivin serait peut-être une caractéristique importante des patients SSc diffus atteints sévèrement, car 3 des 4 patients sévèrement atteints sous-expriment survivin.

### **3.3. Autres protéines apoptotiques**

D'autres immunobuvardages ont également été effectués afin d'analyser les niveaux d'expression d'autres protéines apoptotiques dans les fibroblastes de patients. Toutes les fluctuations des niveaux d'expression de Mcl-1, c-IAP-1 et p53, ont été une sous-expression dans les fibroblastes de peau de patients, tout comme pour Bcl-2 et survivin (figure 8A, 9B et C). De façon générale, la sous-expression des protéines apoptotiques est remarquée chez les patients sévèrement atteints de la maladie, et plus particulièrement les patients A et C qui expriment fortement l' $\alpha$ -sma. Plus marquant encore, la sous-expression des différentes protéines apoptotiques est observée principalement, sinon exclusivement, dans les fibroblastes des peaux lésionnelles des patients. Cette observation est permise, en tenant compte de l'exception de la sous-expression de survivin dans la peau non-lésionnelle

du patient A et en considérant la peau non-lésionnelle du patient C, très sévèrement atteinte, comme une peau lésionnelle. Il est bien de rappeler que ce sont les fibroblastes des peaux lésionnelles des différentes populations de fibroblastes, incluant ceux de la peau non-lésionnelle du patient C, qui ont sur-exprimé l' $\alpha$ -sma et non ceux non-lésionnels (figure 7C).

La sous-expression des quelques protéines apoptotiques Bcl-2, survivin, Mcl-1, c-IAP-1 et p53 est peut-être la conséquence de l'entrée en quiescence de la cellule, qui diminue sa synthèse en protéines (Kissin & Korn, 2002). Bcl-2 est capable d'entraîner les cellules en quiescence (Greider & *al*, 2002). Les résultats d'immunobuvardages qui ont démontré une sous-expression de Bcl-2 indiquent que l'intervention ou l'absence d'un ou d'autres facteurs, comme le TGF- $\beta$ , pourrait causer cette quiescence. La sous-expression des différentes protéines apoptotiques est analysée dans des fibroblastes SSc issus de biopsies cutanées. Or ces biopsies ne reflètent qu'un moment précis dans le cours de la maladie. La sous-expression des différentes protéines est remarquée principalement chez les patients sévèrement atteints. Ces 4 patients sévèrement atteints souffrent d'une SSc diffuse, dont 3 sont précoces et l'autre tardive. Les 2 autres patients faiblement atteints sont quant à eux atteints de la forme diffuse tardive. Il est donc possible d'envisager que l'expression de certaines protéines apoptotiques puisse varier avec l'évolution de la maladie, en prenant en considération que la phase précoce de la maladie soit associée avec

la sous-expression de certaines protéines apoptotiques, telles que Bcl-2, survivin, Mcl-1, c-IAP-1 et p53.

La validité des résultats obtenus est accrue par le fait que les niveaux d'expression de plusieurs autres protéines apoptotiques, FlipL, Bcl-x<sub>L</sub>, la caspase-3 et Bax, n'ont pas varié. Il aurait été intéressant de vérifier les niveaux d'expression de Flips, étant donné que de récentes études la considère comme étant la principale protéine inhibitrice de l'apoptose en empêchant l'activation de la pro-caspase-8 et -10 (Djerbi & *al*, 1999). FlipL n'exercerait ses effets anti-apoptotiques qu'une fois sur-exprimée favorisant ainsi l'apoptose à des niveaux normaux (Chang & *al*, 2002). Plusieurs études mentionnent que les membres de la famille des Bcl-2 s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent pour médier leurs effets apoptotiques. Ces protéines peuvent se lier, entre elle, de plusieurs manières et former des canaux ioniques dans la membrane mitochondriale qui permettent de relâcher le cytochrome c lorsque son potentiel est perturbé (Hetts, 1998). Ainsi, l'hétérodimère Bcl-2-Bax régule le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie lorsque Bax est sur-exprimée ou lorsque Bcl-2 est sous-exprimée (Dietrich, 1997 ; Santiago & *al*, 2001). Nos résultats démontrent une sous-expression de Bcl-2 chez les patients. Des études ont démontré qu'il n'y avait pas d'augmentation de l'apoptose spontanée dans les fibroblastes, SSc et normaux, en prolifération et en quiescence après avoir inhibé l'expression de Bcl-2, favorisant un ratio Bax-Bcl-2 élevé (Santiago & *al*, 2001). La sous-expression de Bcl-2 ne

semble pas encourager l'apoptose dans les différentes populations de fibroblastes SSc, car les cellules ont proliféré, à des rythmes différents, jusqu'à la pleine confluence. Bax et Bcl- $x_L$  peuvent également se lier l'une à l'autre pour réguler l'apoptose (Dietrich, 1997). Les résultats obtenus pour ces deux protéines n'ont démontré aucune différence parmi les populations de fibroblastes, suggérant une réponse ne favorisant pas de réponses pro- ou anti-apoptotiques. L'hétérodimère Bax-Bcl-2 n'est sûrement pas le seul à réguler l'apoptose, car plusieurs hétérodimères et homodimères peuvent contrer ou encourager ce phénomène (Hetts, 1998).

Enfin, des variations des niveaux d'expression de certaines protéines apoptotiques sont également remarquées parmi les contrôles, principalement les protéines survivin, Mcl-1, c-IAP-1 et Bax, une protéine exprimée de façon similaire parmi toutes les lignées cellulaires. L'hétérogénéité observée parmi les contrôles provient du fait que les immunobuvardages ont été faits en 2 et 3 occasions, contrairement à survivin. D'une membrane à l'autre, les temps d'exposition pour dévoiler la réaction de chimioluminescence varient. Cette variable explique pourquoi certaines bandes sont plus marquées que d'autres, ce qui est le cas de Bax, par exemple. La variation des niveaux d'expression des autres protéines dans les contrôles ne reflète que l'hétérogénéité rencontrée dans la population normale (Tomasek & *al*, 2002). Ainsi, certains contrôles varient, mais ces variations ne sont pas caractéristiques de la maladie. En étudiant plus précisément les

variations de d'autres protéines il est possible d'établir quelles variations sont typiques de la maladie, comme la sous-expression de survivin et la sur-expression de l' $\alpha$ -sma.

## Conclusion et perspectives

La SSc est une maladie débilitante des tissus conjonctifs d'origine inconnue. Cette maladie a un pic d'incidence entre 20 et 25 ans, les années les plus productives d'une vie où les responsabilités professionnelles et familiales sont très importantes. Les coûts directs et indirects sont estimés à 1,5 milliards aux Etats-Unis (Wilson, 1997). Ainsi, l'objectif principal de cette étude était de vérifier les niveaux d'expression de plusieurs protéines pro- et anti-apoptotiques dans les fibroblastes de derme de personnes SSc. L'hypothèse de travail supposait que les fibroblastes SSc exprimaient des différences de niveaux d'expression de certaines protéines apoptotiques clés. Cette étude a démontré en effet, à partir de fibroblastes de patients atteints de SSc, l'implication possible de plusieurs protéines pro- et anti-apoptotiques dans la physiopathologie de la SSc. Cette étude est une première en son genre, car les biopsies de peau lésionnelle et non-lésionnelle de patients de différentes catégories, limitée et diffuse et allant de précoce à tardive, ont permis de comparer les résultats selon la sévérité de la maladie et le type de peau, lésionnelle et non-lésionnelle, par rapport à ceux de volontaires sains. La prolifération des fibroblastes des patients est moindre que celle des témoins. La sur-expression de l' $\alpha$ -sma, un marqueur spécifique des myofibroblastes, est principalement retrouvée chez les fibroblastes des patients sévèrement atteints, soit les patients A, C et E. La présence accrue de myofibroblastes est également remarquée majoritairement dans les fibroblastes de la peau lésionnelle, si on estime la peau non-lésionnelle du patient C comme une peau lésionnelle. En effet, tous les patients, sauf le patient F, ont sur-exprimé l' $\alpha$ -sma dans les fibroblastes

lésionnels. La protéine anti-apoptotique Bcl-2 est sous-exprimée chez presque tous les patients, également sévèrement atteints, soit les patients A, C et D. En considérant encore une fois la peau non-lésionnelle du patient C comme lésionnelle, Bcl-2 est exclusivement sous-exprimée dans les fibroblastes des peaux lésionnelles des patients. La survivin, une protéine inhibitrice de l'apoptose et régulatrice du cycle cellulaire, est également sous-exprimée dans les fibroblastes de presque tous les patients sévèrement atteints, soit les patients A, C et E. Cette fois-ci les deux échantillons de peau des patients A et C ont sous-exprimé survivin. La sous-expression de survivin dans les fibroblastes des peaux non-lésionnelles est peut-être un événement précoce chez les patients SSc diffus atteints sévèrement, car 3 des 4 patients sévèrement atteints ont sous-exprimé survivin. D'autres protéines apoptotiques, telles que Mcl-1, c-IAP-1 et p53 sont également sous-exprimées. Les fibroblastes lésionnels sous-exprimaient majoritairement ces protéines, en considérant la peau non-lésionnelle du patient C comme lésionnelle.

La prolifération cellulaire ralentie et la sous-expression de plusieurs protéines apoptotiques, principalement survivin, tendent à être corrélées avec la sur-expression de l' $\alpha$ -sma. En augmentant le nombre de patients, la corrélation entre l'augmentation de l' $\alpha$ -sma et la sous-expression de Bcl-2 pourrait devenir significative. Les études de prolifération permettent de suggérer que les forts pourcentages de myofibroblastes, dans les populations de fibroblastes SSc, puissent être responsables du

faible taux de prolifération des fibroblastes SSc. Ces forts pourcentages de myofibroblastes sont également corrélés de façon significative avec la sous-expression de survivin dans les différentes populations de fibroblastes SSc. Les variations des résultats sont principalement observées chez les patients diffus sévères, à partir de biopsies de peau d'un temps précis de leur maladie. Ces résultats suggèrent une sous-expression des protéines apoptotiques, et plus particulièrement survivin, chez les patients SSc diffus sévèrement atteints.

Les recherches sur cette maladie encore méconnue n'en sont qu'à leur début. Le volet apoptotique des fibroblastes dans la SSc est un chaînon important de cette maladie aux origines inconnues. Ainsi, les résultats obtenus ouvrent la voie à des recherches futures. Le recrutement d'autres patients diffus précoces sévèrement atteints pourraient venir appuyer les premiers résultats d'une sous-expression de survivin et rendre encore plus convaincant cet événement typique survenant chez les patients diffus sévères. De plus, l'augmentation du nombre de patients pourrait rendre significative la corrélation entre la sous-expression de Bcl-2 et la présence accrue de myofibroblastes. D'autres expériences, comme l'ajout de cytokines, telles que le TGF- $\beta$ , l'endothéline-1 et le TNF- $\alpha$ , aux fibroblastes SSc en culture permettraient de vérifier les effets sur la prolifération et l'apoptose. Ces mêmes études testées sur les populations de fibroblastes légèrement atteints par la SSc, permettraient de trouver une ou des molécules responsables ou caractéristiques de la sévérité de la maladie. Des études de transfection pourraient

également être effectuées dans les fibroblastes des patients sous-exprimant survivin et Bcl-2 afin de cibler une protéine capable de renverser la sévérité de la maladie. La complexité de la SSc entraîne un nombre grandissant d'études qui permettront un jour la découverte de traitements plus ciblés, plus efficaces et moins toxiques.

## Bibliographie

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. Cellular and molecular immunology. 2<sup>nd</sup> edition. USA. 1994. 457p.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. 4<sup>e</sup> edition. Garland Science. USA. 2002. 463p.
- Altman R.D., Medsger T.A. Jr, Bloch D.A., Michel B.A. Predictors of survival in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1991 ; 34(4) : 403-13.
- Black A.F., Berthod F., L'Heureux N., Germain L., Auger F.A. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J* 1998 ; 12(13) : 1331-1340.
- Bossy-Wetzel E., Green D.R. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J. Biol. Chem.* 1999 ; 274(25) : 17484-90.
- 49B) Budd R.C. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J. Clin. Invest.* 2002 ; 109(4) : 437-41.
- Chattopadhyay A., Chiang C.W., Yang E. BAD/BCL-[X(L)] heterodimerization leads to bypass of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest. *Oncogene.* 2001 ; 20(33) : 4507-18.
- Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 1997 ; 326 ( Pt 1) : 1-16.
- Dietrich J.B. Apoptosis and anti-apoptosis genes in the Bcl-2 family *Arch. Physiol. Biochem.* 1997 ; 105(2) : 125-35.
- Giodini A., Kallio M.J., Wall N.R., Gorbsky G.J., Tognin S., Marchisio P.C., Symons M., Altieri D.C. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res.* 2002 1 ; 62(9) : 2462-7.

- Greider C., Chattopadhyay A., Parkhurst C., Yang E. BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene*. 2002 7 ; 21(51) : 7765-75.
- Grodzicky T., Elkon K.B. Apoptosis in rheumatic diseases. *Am. J. Med.* 2000 ; 108(1) : 73-82.
- Hamamdzic D., Kasman L.M., LeRoy E.C. The role of infectious agents in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2002 ; 14(6) : 694-8.
- Harvey G.R., McHugh N.J. Serologic abnormalities in systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1999 ; 11(6) : 495-502.
- Hetts S.W. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*. 1998 ; 279(4) : 300-7.
- Hou Q., Cymbalyuk E., Hsu S.-C., Xu M., Hsu Y.-T. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2 : Roles in cytochrome c release and Bax regulation. *Apoptosis*. 2003 ; 8 : 617-629.
- Hu L., Codgell D.E., Jia Y.J., Hamilton S.R., Zhang W. Monitoring of cDNA microarray with common primer target and hybridization specificity with selected targets. *BioTechniques*. 2002 ; 32 : 528-534.
- Janeway C.A. et Travers P. *Immunobiologie*. 2<sup>e</sup> édition. Belgique. De Boeck Université. 1997. 582 p.
- Jelaska A., Korn J.H. Role of apoptosis and transforming growth factor beta-1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000 ; 43(10) : 2230-9.

- Jimenez S.A., Hitraya E., Varga J. Pathogenesis of scleroderma. *Collagen. Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1996 ; 22(4) : 647-74.
- Kissin E., Korn J.H. Apoptosis and myofibroblasts in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2002 ; 4(2) : 129-35.
- Kissin E.Y, Korn J.H. Fibrosis in scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2003 ; 29(2) : 351-69.
- Kirk T.Z., Mayes M.D. IL-1 rescues scleroderma myofibroblasts from serum-starvation-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 5; 255(1) : 129-32.
- Kuan N.K., Passaro E. Jr. Apoptosis: programmed cell death. *Arch. Surg.* 1998 ; 133(7) : 773-5.
- Leonardo A.D., Khan S.H., Linke S.P., Greco V., Seidita G., Wahl G.M. DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res.* 1997 ; 57(6) : 1013-9.
- LeRoy E.V. Systemic sclerosis : A vascular perspective. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1996 ; 22(4) : 675-693.
- Li F., Ambrosini G., Chu E.Y., Plescia J., Tognin S., Marchisio P.C., Altieri D.C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* 1998 ; 396(6711) : 580-4.
- Liu H. Perlman H. Pagliari L.J. Pope R.M. Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages: Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)- $\kappa$ -B, Bad, or caspase activation. *J. Exp. Med.* 2001 ; 2 : 113-125.

- Marsden V.S., O'Connor L., O'Reilly L.A., Silke J., Metcalf D., Ekert P.G., Huang D.C., Cecconi F., Kuida K., Tomaselli K.J., Roy S., Nicholson D.W., Vaux D.L., Bouillet P., Adams J.M., Strasser A. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*. 2002 ; 419(6907) : 634-7.
- Mayes M.D. Scleroderma epidemiology. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2003 ; 29(2) : 239-54.
- Merkel P.A., Herlyn K., Martin R.W., Anderson J.J., Mayes M.D., Bell P., Korn J.H., Simms R.W., Csuka M.E., Medsger T.A. Jr, Rothfield N.F., Ellman M.H., Collier D.H., Weinstein A., Furst D.E., Jimenez S.A., White B., Seibold J.R., Wigley F.M. Scleroderma Clinical Trials Consortium. Measuring disease activity and functional status in patients with scleroderma and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum.* 2002 ; 46(9) : 2410-20.
- McSweeney P.A., Nash R.A., Sullivan K.M., Storek J., Crofford L.J., Dansey R., Mayes M.D., McDonagh K.T., Nelson J.L., Gooley T.A., Holmberg L.A., Chen C.S., Wener M.H., Ryan K., Sunderhaus J., Russell K., Rambharose J., Storb R, Furst D.E.. High-dose immunosuppressive therapy for severe systemic sclerosis: initial outcomes. *Blood*. 2002 ; 100(5) : 1602-10.
- Moulin V., Auger F.A., Garrel D., Germain L. Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns*. 2000 ; 26(1) : 3-12.
- Nechushtan A., Smith C.L., Hsu Y.-T., Youle R.J. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO*. 1999 ; 19(9) : 2330-2341.
- Nelson J.L. Microchimerism and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1998 ; 10(6) : 564-71.

- Nomura M., Shimizu S., Sugiyama T., Narita M., Ito T., Matsuda H., Tsujimoto Y. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* 2003 ; 278(3) : 2058-65.
- O'Connor D.S., Schechner J.S., Adida C., Mesri M., Rothermel A.L., Li F., Nath A.K., Pober J.S., Altieri D.C. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 2000 ; 156(2) : 393-8.
- Oltvai Z.N., Korsmeyer S.J. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell.* 1994 ; 79(2) : 189-92.
- Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993 ; 74(4) : 609-19.
- Pouliot R., Robert M., Germain L., Noel-Hudson M., Lindenbaum A., Juhasz J. et al. Influence of endothelial cells on structure, biochemistry and functionality of epidermis reconstructed on synthetic porous membrane. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 1998 ; 11(4-5) : 193-206.
- R&D Systems-making the discoveries of today, your research tools tomorrow. *Cytokine bulletin.* Summer 2002 : p.2.
- Reed J.C. The Survivin saga goes in vivo. *J. Clin. Invest.* 2001 ; 108(7) : 965-9.
- Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 1997 ; 16(23) : 6914-25.
- Rutella S., Rumi C., Pierelli L., Morosetti R., Sica S., Bonanno G., Scambia G., Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor perturbs lymphocyte mitochondrial function and inhibits cell cycle progression. *Exp. Hematol.* 2000 ; 28(6) : 612-25.

- Saltzman A., Munro R., Searfoss G., Franks C., Jaye M., Ivashchenko Y. Transforming growth factor-beta-mediated apoptosis in the Ramos B-lymphoma cell line is accompanied by caspase activation and Bcl-XL downregulation. *Exp. Cell. Res.* 1998 ; 242(1) : 244-54.
- Santiago B., Galindo M., Rivero M., Pablos J.L. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2001 ; 44(7) : 1667-76.
- Sato S. Abnormalities of adhesion molecules and chemokines in scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1999 ; 11(6) : 503-7.
- Schuler M., Green D.R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 2001 ; 29(Pt 6) : 684-8.
- Schultz D.R., Harrington W.J. Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.* 2003 ; 32(6) : 345-69.
- Sharief M.K. Increased cellular expression of the caspase inhibitor FLIP in intrathecal lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2000 ; 111(1-2) : 203-9.
- Shitashige M., Toi M., Yano T., Shibata M., Matsuo Y., Shibasaki F. Dissociation of Bax from a Bcl-2/Bax heterodimer triggered by phosphorylation of serine 70 of Bcl-2. *J. Biochem. (Tokyo).* 2001 ; 130(6) : 741-8.
- Silman A.J. Scleroderma-demographics and survival. *J. Rheumatol. Suppl.* 1997 ; 48:58-61.
- Steen V. Sclérodemie et grossesse. *The Beacon.* 1995 ; Vol. 3. 4p.

- Steen V.D. Occupational scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1999 ; 11(6) : 490-4.
- Strehlow D., Korn J.H. Biology of the scleroderma fibroblast. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1998; 10(6) : 572-8.
- Systemic sclerosis and related syndromes. In : Schumacher H.R Jr., Klipper J.H., Koopman W.J., editor. *Primer on the Rheumatic Diseases*. Atlanta : The Arthritis Foundation. 1993 : 118-127.
- Thallinger C., Wolschek M.F., Wacheck V., Maierhofer H., Gunsberg P., Polterauer P., Pehamberger H., Monia B.P., Selzer E., Wolff K., Jansen B. Mcl-1 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in a SCID mouse xenotransplantation model. *J. Invest. Dermatol.* 2003 ; 120(6) : 1081-6.
- Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002 ; 3(5) : 349-63.
- Vaishnav A.K., McNally J.D., Elkon K.B. Apoptosis in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 1997 ; 40(11) : 1917-27.
- Wang J., Chen H., Seth A., McCulloch C.A. Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003 ; 285: H1871-H1881.
- White B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1996 ; 22(4) : 695-708.
- Wilson L. Cost-of-illness of scleroderma : the case for rare diseases. *Semin. Arthritis Rheum.* 1997 ; 27(2) : 73-84

- Xu Q., Reed J.C. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell.* 1998 ; 1(3) : 337-46.
- Yamaguchi H., Inokuchi K., Tarusawa M., Dan K. Mutation of bcl-x gene in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol.* 2002 ; 69 : 74-76.
- Yamamoto T., Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. V: Increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin. Immunol.* 2002 ; 102(1) : 77-83.
- Zhang H., Shi X., Zhang Q.J., Hampong M., Paddon H., Wahyuningsih D., Pelech S. Nocodazole-induced p53-dependent c-Jun N-terminal kinase activation reduces apoptosis in human colon carcinoma HCT116 cells. *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277(46) : 43648-58.
- Zhang H.Y., Phan S.H. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999 ; 21(6) : 658-65.
- Zhao J., Tenev T., Martins L.M., Downward J., Lemoine N.R. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sci.* 2000 ; 113 Pt 2 3 :4363-71.
- Zhou X., Tan F.K., Xiong M., Milewicz D.M., Feghali C.A., Fritzler M.J., Reveille J.D., Arnett F.C., Zhou X., Tan F.K., Xiong M., Milewicz D.M., Feghali C.A., Fritzler M.J., Reveille J.D. et Arnett F.C. Systemic sclerosis (scleroderma): specific autoantigen genes are selectively overexpressed in scleroderma fibroblasts. *J. Immunol.* 2001 ; 167(12) : 7126-33.

- Zieve G.W., Turnbull D., Mullins J.M., McIntosh J.R. Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp. Cell Res.* 1980 ; 126(2) : 397-405.
- Zong W.-X., Lindsten T., Ross A.J., MacGregor G.R., Thompson C.B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Gen Dev.* 2001; 15 : 1481-1486

## Annexe I

### Données brutes du test de prolifération mesurant l'incorporation de BrdU

Population de fibroblastes	Milieu DMEM 10% sérum		Milieu RPMI sans sérum	
	Absorbance (450 nm)	Écart-type	Absorbance (450 nm)	Écart-type
N1	0,095	0,036	0,054	0,022
N2	0,982	0,071	0,283	0,025
N3	0,895	0,058	0,148	0,084
N4	0,216	0,055	0,000	0,000
N5	0,139	0,213	0,015	0,016
NHDF	0,600	0,179	0,232	0,076
A-L	0,120	0,026	0,018	0,011
A-NL	0,132	0,043	0,009	0,005
B-L	0,063	0,014	0,009	0,006
B-NL	0,476	0,186	0,360	0,220
C-L	0,215	0,067	0,089	0,024
C-NL	0,019	0,017	0,000	0,000
G-NL	0,031	0,012	0,034	0,012
D-L	0,079	0,026	0,042	0,014
D-NL	0,061	0,026	0,032	0,024
E-L	0,096	0,051	0,001	0,002
F-L	0,566	0,111	0,040	0,023
F-NL	0,194	0,083	0,011	0,009

