

**Université de Montréal**

**Étude de l'effet de l'antibiothérapie et de l'anticoagulothérapie sur le développement de la  
sclérodermie expérimentale chez la souris**

**Par Philippe-Olivier Goulet**

Programme en Sciences biomédicales – 2<sup>e</sup> cycle, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de maîtrise en Sciences biomédicales option  
générale

Août 2016

© Philippe-Olivier Goulet, 2016

**Université de Montréal**

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'effet de l'antibiothérapie et de l'anticoagulothérapie sur le développement de la sclérodermie expérimentale chez la souris**

Présenté par :

**Philippe-Olivier Goulet**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr Hassan Fahmi**  
Président-rapporteur

**Dre Marika Sarfati**  
Directrice de recherche

**Dr Jean-Luc Senécal**  
Codirecteur de recherche

**Dre Alexandra Albert**  
Membre du jury

## Résumé

La sclérose systémique (SSc) est une maladie auto-immune chronique incurable caractérisée par une présentation clinique complexe et hétérogène. Notre laboratoire a développé un modèle murin de fibrose pulmonaire et cutanée qui est induit par l'immunisation répétitive avec des cellules dendritiques chargées avec des peptides de la topoisomérase I, et qui partage de nombreuses caractéristiques avec la SSc humaine. Premièrement, nous avons caractérisé la maladie expérimentale quant à sa persistance à long terme (**objectif 1**) et son caractère progressif (**objectif 2**). Une cascade de coagulation dérégulée est impliquée dans le développement de la fibrose dans la SSc. La thrombine, un médiateur clé de la coagulation, semble contribuer à ce processus. Deuxièmement, nous avons étudié l'efficacité d'un inhibiteur de la thrombine, i.e. dabigatran, dans ce modèle (**objectif 3**). Le microbiote intestinal semble jouer un rôle déterminant dans plusieurs pathologies, y compris les maladies auto-immunes. Troisièmement, nous avons évalué l'effet de la manipulation du microbiote des souris par l'administration de streptomycine (**objectif 4**).

Les souris immunisées développent une maladie persistante et la fibrose observée est précédée d'une phase inflammatoire. Le dabigatran aggrave la fibrose pulmonaire et cutanée lorsqu'administré durant la période inflammatoire et n'a aucun effet protecteur durant la phase fibrotique. La manipulation du microbiote par la streptomycine aggrave l'atteinte pulmonaire lorsque l'antibiothérapie est donnée en début de vie et exacerbe l'atteinte cutanée lorsqu'administrée à l'âge adulte.

Notre modèle expérimental représente donc un outil important pour évaluer différentes approches thérapeutiques pour la SSc de par sa persistance et son caractère progressif. En se basant sur nos résultats, le dabigatran ne semble pas constituer un choix thérapeutique adéquat pour traiter la fibrose chez les patients atteints de SSc. L'exposition à la streptomycine à certaines périodes de la vie affecte différenciellement le développement et les manifestations cliniques de la maladie expérimentale.

**Mots clés :** sclérose systémique, modèle murin, topoisomérase I, cellules dendritiques, inflammation, fibrose, thrombine, dabigatran, microbiote, streptomycine.

## Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is an incurable and chronic autoimmune disease characterized by a complex and heterogeneous clinical presentation. Our laboratory has developed a mouse model of lung and skin fibrosis that shares many features with human SSc, and is induced by repeated immunization with dendritic cells loaded with peptides of topoisomerase I. First, the long term persistence (**objective 1**) and progressive nature (**objective 2**) of this experimental disease model was characterized. A dysregulated coagulation cascade is implicated in the development of fibrosis in SSc. Thrombin, a key mediator of coagulation, appears to contribute to this process. Next, the efficacy of dabigatran, a thrombin inhibitor, to ameliorate lung and skin fibrosis was studied in this model (**objective 3**). Intestinal microbiota appears to play a key role in several diseases including autoimmune diseases. Finally, the effect of manipulating gut microbiota by administration of streptomycin on disease pathogenesis was evaluated in this model (**objective 4**).

Immunized mice developed persistent fibrosis that was preceded by an inflammatory phase. Dabigatran aggravated pulmonary and skin fibrosis when administered during the inflammatory period and was not protective when given during the fibrotic phase. Manipulation of intestinal microbiota by streptomycin aggravated lung fibrosis when it was given early in life and exacerbated skin disease when administered in adulthood.

Our model of experimental SSc with progressive and persistent disease represents an important tool to evaluate different therapeutic approaches for SSc. Furthermore, our results caution against the use of dabigatran as a therapeutic option to treat fibrosis in patients with SSc. Exposure to streptomycin for certain periods of life differentially affects the development and clinical manifestations of experimental SSc.

**Keywords:** systemic sclerosis, murine model, topoisomerase I, dendritic cells, inflammation, fibrosis, thrombin, dabigatran, microbiota, streptomycin.

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Introduction .....	1
La sclérose systémique .....	1
Prévalence .....	1
Classification .....	1
Manifestations cliniques.....	2
Causes de mortalité .....	2
Pathogenèse .....	2
Traitements.....	12
Pronostic de la SSc .....	13
Modèles expérimentaux de SSc.....	14
Modèles génétiques .....	14
Modèles inductibles.....	16
Ces modèles sont-ils adéquats ?.....	17
Modèle du laboratoire d'accueil.....	19
Objectifs de travail.....	20

Matériels et méthodes .....	22
Souris .....	22
Protocole d'immunisation .....	22
Préparation et administration du dabigatran.....	23
Préparation et administration de la streptomycine .....	23
Sacrifice.....	24
Sérum.....	24
Liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) .....	24
Explants de poumons.....	24
Mesure de cytokines et de chimiokines .....	24
TGF- $\beta$ .....	24
Quantification de l'expression de gènes par l'amplification en chaîne par polymérase en temps réel (qRT-PCR) .....	25
Histologie .....	25
Hématoxyline et éosine (H&E).....	26
Trichrome de Masson .....	26
$\alpha$ SMA .....	27
Épaississement du septum alvéolaire.....	27
Thrombine .....	27
Analyse de l'hydroxyproline .....	27
Analyse statistique.....	28
Résultats .....	29
Le modèle .....	29
Protocole d'immunisation .....	29
Objectif 1 : Évaluation de la persistance de la maladie dans le modèle expérimental de SSc.....	30
Atteinte cutanée .....	30

Atteinte pulmonaire .....	33
Objectif 2 : Caractérisation de l'infiltrat inflammatoire .....	35
Objectif 3 : Traitement par dabigatran .....	38
Protocole d'immunisation .....	38
Atteinte pulmonaire .....	39
Atteinte cutanée .....	42
Objectif 4 : Manipulation du microbiote intestinal par la streptomycine .....	43
Protocole d'immunisation .....	44
Atteinte pulmonaire .....	45
Atteinte cutanée .....	47
Discussion .....	51
Objectif 1 : Pertinence de l'évaluation de la persistance de la sclérodermie expérimentale .....	51
A. Observe-t-on une persistance de la maladie au niveau cutané dans notre modèle expérimental de SSc ? .....	51
B. La persistance au niveau cutané est-elle aussi observée au niveau pulmonaire dans notre modèle ? .....	51
C. Les modèles expérimentaux plus récemment décrits reproduisent-ils la SSc humaine ? .....	52
Objectif 2 : Caractérisation de l'infiltrat inflammatoire .....	54
A. La phase fibrotique est-elle précédée d'une phase inflammatoire ? .....	54
B. La cytokine TGF- $\beta$ joue-t-elle un rôle dans le modèle ? .....	56
Objectif 3 : Traitement par le dabigatran .....	58
A. Quelles sont les cibles directes et indirectes du dabigatran ? .....	58
B. Le traitement au dabigatran a-t-il un effet sur le développement de la maladie dans notre modèle expérimental ? .....	59
C. Comment expliquer l'effet paradoxal du dabigatran sur le modèle à l'étude ? .....	61
D. Le dabigatran est-il un nouvel agent thérapeutique potentiel pour la SSc humaine ? .....	63

Objectif 4 : Manipulation du microbiote intestinal par la streptomycine .....	64
A. Comment le microbiote intestinal peut-il influencer le développement des maladies auto-immunes ?.....	64
B. Les modifications du microbiote intestinal ont-elles un effet sur le développement de la SSc expérimentale ? .....	66
C. Comment la dysbiose modifie-t-elle l'atteinte cutanée ? .....	67
D. Peut-on expliquer l'effet d'une dysbiose induite par une exposition à la streptomycine sur la maladie expérimentale en analysant la composition du microbiote ? .....	68
E. Dans quelle mesure les microbiotes murins et humains sont-ils comparables ?.....	70
Conclusion générale et perspectives futures.....	71
Références bibliographiques .....	74



## Liste des tableaux

Tableau I. Tableau résumé illustrant la présentation des caractéristiques principales de la SSc dans les modèles murins génétiques de cette maladie .....	15
Tableau II. Tableau résumé illustrant la présentation des caractéristiques principales de la SSc dans les modèles murins inductibles de cette maladie.....	17
Tableau III. Tableau résumé illustrant la présentation des caractéristiques principales de la SSc dans les modèles murins récents de cette maladie .....	53

## Liste des figures

Figure 1. Schéma du protocole d'immunisation.....	29
Figure 2. Le protocole d'immunisation induit spécifiquement une fibrose cutanée, persistante et diffuse. ....	30
Figure 3. La fibrose cutanée persistante induite par le protocole d'immunisation est associée à l'absence d'infiltration cellulaire. ....	31
Figure 4. À long terme, le protocole d'immunisation induit au niveau cutané une augmentation spécifique des cellules $\alpha$ SMA+.....	32
Figure 5. Le protocole d'immunisation induit spécifiquement une fibrose pulmonaire persistante associée à la surexpression d' $\alpha$ SMA. ....	33
Figure 6. Le protocole d'immunisation induit un épaissement du septum alvéolaire spécifique à long terme. ....	34
Figure 7. La fibrose pulmonaire observée dans le modèle est précédée d'une phase inflammatoire caractérisée entre autres par une augmentation spécifique de l'IL-17A. ....	35
Figure 8. Le TGF- $\beta$ est présent, mais non spécifiquement régulé aux niveaux local et systémique dans notre modèle murin de SSc. ....	36
Figure 9. Schéma du protocole d'immunisation et de traitement au dabigatran.....	38
Figure 10. L'administration de dabigatran lors de la phase plus précoce de la maladie aggrave la fibrose pulmonaire chez les souris immunisées avec les « <i>TOPOIA DCs</i> ». ....	39
Figure 11. Le traitement au dabigatran n'influence pas les niveaux pulmonaires d'IL-17A à la semaine 12 chez les souris immunisées avec les « <i>TOPOIA DCs</i> ». ....	40
Figure 12. L'administration de dabigatran augmente la concentration de thrombine au niveau local à la semaine 10 dans notre modèle murin de SSc.....	41
Figure 13. L'administration de dabigatran lors de la phase plus précoce de la maladie aggrave la fibrose cutanée chez les souris immunisées avec les « <i>TOPOIA DCs</i> ». ....	42
Figure 14. Schéma du protocole d'immunisation et d'exposition à la streptomycine.....	44
Figure 15. L'exposition à la streptomycine lors des périodes <i>in utero</i> et néonatale aggrave la fibrose pulmonaire à la semaine 12 chez les souris immunisées avec les « <i>TOPOIA DCs</i> ». ....	45
Figure 16. L'exposition à la streptomycine n'influence pas les niveaux pulmonaires d'IL-17A à la semaine 10 chez les souris immunisées avec les « <i>TOPOIA DCs</i> ». ....	46

Figure 17. L'exposition à la streptomycine n'influence pas la fibrose cutanée à la semaine 12 dans notre modèle murin de SSc. ....47

Figure 18. Les expositions à vie, *in utero* et adulte à la streptomycine influencent l'inflammation cutanée à la semaine 12 chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* ». ....48

Figure 19. Le protocole d'immunisation engendre un profil d'expression génique particulier au niveau cutané et l'exposition à la streptomycine à l'âge adulte augmente plusieurs marqueurs inflammatoires, vasculaires et fibrotiques chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* ». ....49

## Liste des sigles et des abréviations

°C	degré Celsius
αSMA	<i>alpha smooth muscle actin</i> , alpha actine de muscle lisse
ADN	acide désoxyribonucléique
APC	<i>antigen-presenting cell</i> , cellule présentatrice d'antigène
APRIL	<i>A proliferation-inducing ligand</i> , ligand A induisant la prolifération
ARN	acide ribonucléique
AT <sub>1</sub> R	<i>angiotensin receptor type 1</i> , récepteur de type 1 de l'angiotensine
AutoAc	autoanticorps
BAFF	<i>B cell activating facteur</i> , facteur d'activation des lymphocytes B
BALF	<i>bronchoalveolar lavage fluid</i> , liquide de lavage broncho-alvéolaire
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i> , ligand d'une chimiokine de motif C-C
CD	clusters de différenciation
CFA	<i>Complete Freund's adjuvant</i> , adjuvant complet de Freund
CMHII	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
COL1A1	alpha-1 type I collagen, collagène de type I (chaîne alpha1)
COL5A1	alpha-1 type V collagen, collagène de type V (chaîne alpha1)
CRCHUM	Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i> , facteur de croissance du tissu conjonctif
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i> , ligand d'une chimiokine de motif C-X-C
DC	<i>dendritic cell</i> , cellule dendritique
dcSSc	<i>diffuse cutaneous systemic sclerosis</i> , sclérose systémique cutanée diffuse
Egr-1	<i>early growth response protein 1</i> , protéine 1 de réponse de croissance précoce
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
ET-1	endothéline-1
ET <sub>A</sub> R	<i>endothelin receptor type A</i> , récepteur de type A de l'endothéline
Fli-1	<i>friend leukemia integration 1 transcription factor</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
Fra-2	<i>fos-related antigen 2</i>

g	gramme
GM-CSF	<i>granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i> , facteur de stimulation des colonies de granulocytes-monocytes
GVHD	<i>graft-versus-host disease</i> , réaction du greffon contre l'hôte
H&E	hématoxyline et éosine
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HOCl	acide hypochloreux
HTAP	hypertension artérielle pulmonaire
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> , molécule 1 d'adhésion intercellulaire
IFN	interféron
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i> , facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline
IL	interleukine
ILC	<i>innate lymphoid cell</i> , cellule lymphoïde innée
ILD	<i>interstitial lung disease</i> , maladie pulmonaire interstitielle
IPF	<i>idiopathic pulmonary fibrosis</i> , fibrose pulmonaire idiopathique
it	intra-trachéal
KO	<i>knockout</i> , invalidation génique
L	litre
lcSSc	<i>limited cutaneous systemic sclerosis</i> , sclérose systémique cutanée limitée
LPS	lipopolysaccharide
µg	microgramme
µl	microlitre
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i> , protéine chimiotactique des monocytes
MEC	matrice extracellulaire
mg	milligramme
ml	millilitre
min	minute
MMF	mycophénolate mofétil
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> , métalloprotéinase matricielle
N/A	<i>not available</i> , non disponible

ND	non détecté
NLR	<i>NOD-like receptor</i> , récepteur de type NOD
nm	nanomètre
NO	<i>nitric oxide</i> , oxyde nitrique
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i> , inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
PAR	<i>protease activated receptor</i> , récepteur activé par les protéases
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , tampon phosphate salin
pDCs	<i>plasmacytoid dendritic cells</i> , cellules dendritiques plasmacytoïdes
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , facteur de croissance dérivé des plaquettes
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> , ligand-1 de la glycoprotéine sélectine P
RORC	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor C</i> , récepteur orphelin C relié au récepteur de l'acide rétinoïque
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , dérivés réactifs de l'oxygène
rpm	<i>revolution per minute</i> , tour par minute
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> , amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse
s	seconde
sc	sous-cutané
Scl-GVHD	<i>scleromatous-graft-versus-host disease</i> , réaction scléromateuse du greffon contre l'hôte
SFB	<i>segmented filamentous bacteria</i> , bactérie filamenteuse segmentée
Siglec	<i>sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin</i> , lectine de type immunoglobuline liant l'acide sialique
SIRP	signal regulatory protein, protéine régulatrice de signal
SSc	<i>systemic sclerosis</i> , sclérose systémique
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> , transducteur de signal et activateur de transcription
TCR	<i>T cell receptor</i> , récepteur du lymphocyte T
tg	<i>transgenic</i> , transgène
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i> , facteur de croissance transformant bêta
Th	<i>T helper</i> , T auxiliaire

TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i> , inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , récepteur de type Toll
TNF $\alpha$	<i>tumoral necrosis factor alpha</i> , facteur de nécrose tumorale alpha
TOPOI	topoisomérase I de l'ADN
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i> , activateur tissulaire du plasminogène
Tsk1	<i>Tight skin 1</i>
Tsk2	<i>Tight skin 2</i>
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i> , lymphopoïétine stromale thymique
Tweak-R	<i>Tweak-Receptor</i> , récepteur Tweak
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i> , activateur du plasminogène de type urokinase
uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i> , récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase
vWF	<i>von Willebrand factor</i> , facteur de von Willebrand
Wnt	<i>wingless integration site</i> , site d'intégration sans aile

## Remerciements

Je voudrais remercier sincèrement :

Dre Marika Sarfati pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet, pour m'avoir supervisé tout au long de mon expérience de recherche et surtout pour ses judicieux conseils ;

Les docteurs Jean-Luc Senécal, Guy Delespesse et Martial Koenig pour leur précieuses questions, analyses et perspectives concernant le projet ;

Dre Heena Mehta pour m'avoir accompagné et encadré tout au long du projet ;

Vinh Nguyen, Gemma Perez, Jade Desjardins et Shunya Mashiko pour leur grande aide concernant plusieurs techniques de laboratoire et leur travail sur le projet ;

Ainsi que tous les autres membres du laboratoire Sarfati pour leur accueil chaleureux et leur support tout au long de ma maîtrise.



# Introduction

L'objectif de cette introduction est de faire une revue non exhaustive de la littérature, notamment en présentant les concepts généraux de la pathogenèse de la sclérose systémique (SSc, sclérodermie). J'insisterai sur les aspects en lien avec le projet du laboratoire et introduirai par la suite ce dernier à travers la présentation des divers modèles murins de SSc connus avant le commencement de mon projet de maîtrise. Finalement, je présenterai mes objectifs de travail.

## La sclérose systémique

La SSc est une maladie complexe du tissu conjonctif d'origine inconnue, qui présente une atteinte au niveau de plusieurs organes et des manifestations cliniques hétérogènes (1).

### Prévalence

La SSc est une maladie rare, orpheline, que l'on retrouve principalement chez les femmes. La prévalence augmente chez les individus de plus de 45 ans. Plus globalement, la prévalence estimée en 2003 au Québec est de 443 cas par million (2). Les estimations pour les États-Unis, l'Australie, l'Argentine et certains pays européens sont dans la même gamme de valeurs, avec des données indiquant de 150 à 300 cas par million (3).

### Classification

Il existe deux formes de sclérose systémique : la forme limitée (lcSSc) et la forme diffuse (dcSSc). La forme limitée se manifeste par une fibrose cutanée limitée ainsi qu'une implication systémique minimale, tandis que la forme diffuse se présente par une atteinte cutanée diffuse et implique certains organes internes. Ces deux formes diffèrent au niveau de l'envergure de l'atteinte cutanée, des autoanticorps (AutoAc) auxquels elles sont associées, ainsi que de l'ampleur de l'atteinte des organes internes. Plus précisément, l'épaississement de la peau progresse plus lentement pour la lcSSc et se limite au visage, au cou, ainsi qu'aux extrémités (régions distales des membres supérieurs et inférieurs (i.e. distalement aux coudes et aux genoux)). Pour la dcSSc, l'épaississement de la peau progresse plus rapidement et est plus sévère et plus extensif. L'épaississement a lieu au niveau du tronc, ainsi qu'aux régions proximales par rapport aux genoux et aux coudes, en plus des parties plus distales (4).

## Manifestations cliniques

Outre la fibrose cutanée typique, la SSc présente un large spectre de manifestations cliniques permettant d'établir son diagnostic. Tout d'abord, il est possible d'observer des lésions au bout des doigts, telles que la sclérodactylie et des ulcérations pulpaire. Ensuite, au niveau pulmonaire, les manifestations caractéristiques sont l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), qui est plus fréquente dans la lcSSc, ainsi que la fibrose pulmonaire, qui cause une maladie pulmonaire interstitielle (ILD). Celle-ci est non seulement plus fréquemment observée mais aussi plus sévère dans la dcSSc (4).

La SSc implique aussi une production importante d'autoAc, notamment les autoAc anti-centromères qui sont caractéristiques de la lcSSc et les autoAc anti-topoisomérase I de l'ADN (TOPOI) et les autoAc anti-ARN polymérase III dans le cas de la dcSSc (1).

Les phénomènes vasculaires observés dans la SSc sont le phénomène de Raynaud, les télangiectasies, ainsi que la présence de capillaires anormaux dans les régions périunguéales (4). La dysmotilité des deux-tiers de l'œsophage est fréquente tant dans la lcSSc que dans la dcSSc.

En plus de ces critères permettant le diagnostic, il est possible d'observer particulièrement chez les patients atteints de dcSSc des frottements tendineux, une atteinte de l'intestin grêle et, chez environ 15% des malades, une crise rénale caractérisée par une insuffisance rénale aigüe associée à une crise hypertensive (1).

## Causes de mortalité

Les principales causes de mortalité liées à la SSc sont la fibrose pulmonaire induisant l'ILD ainsi que le HTAP. Elles représentent plus de 50% des décès liés à la SSc. La survie des patients est améliorée par les thérapies actuelles, notamment pour des conditions comme le HTAP, et les décès sont alors plus souvent de nature cardiaque (1, 5).

## Pathogenèse

Il n'y a présentement pas d'hypothèse conceptuelle expliquant tous les aspects de la pathogenèse de la SSc. Il est connu que la SSc se développe chez des individus avec une hérédité « permissive », c'est-à-dire que certains polymorphismes génétiques sont associés à des risques augmentés de développer la maladie (1). Les gènes touchés sont principalement liés à la réponse immunitaire, renforçant fortement l'idée de la contribution du système immunitaire (6, 7). Les voies de l'interféron (IFN) de type I et de l'interleukine-12 (IL-12) semblent particulièrement touchées. Par

exemple, le transducteur de signal et activateur de transcription 4 (STAT4) est un facteur de risque génétique. De plus, on observe des troubles de la régulation liés à plusieurs cellules immunitaires (8, 9). Pour des facteurs déclenchants qui s'avèrent à ce jour inconnus, la SSc se développe chez ces individus prédisposés. En effet, un élément déclencheur en particulier n'a toujours pas été identifié (5).

Les manifestations cliniques et pathologiques de la maladie sont le résultat de quatre processus distincts. La forme diffuse de la maladie (dcSSc) sera principalement abordée, étant donné son lien avec la présente étude.

- 1) Une vasculopathie fibroproliférative au niveau des vaisseaux de petit calibre.
- 2) Une importante inflammation.
- 3) Des anomalies des systèmes immunitaires inné et adaptatif menant à la production d'autoAc et à une auto-immunité cellulaire.
- 4) Une dysfonction des fibroblastes menant à la production excessive de collagène de type I et à une accumulation de différents constituants de la matrice extracellulaire (MEC) au niveau de la peau, des vaisseaux sanguins et des organes internes.

Il n'est pas encore clair si ces processus sont séparés ou liés du point de vue mécanistique, ni comment des interactions potentielles conduisent au développement de la maladie (1). Ces processus sont présents à des niveaux variables d'un patient à l'autre, faisant de la SSc une maladie très hétérogène (5).

De façon globale, les patients présentent généralement un épaissement cutané progressif et une fibrose de la peau suite à l'accumulation excessive de collagène de type I, d'où le nom de « sclérodermie ». Ce phénomène typique de la maladie peut être associé à une fibrose au niveau des organes internes et ce, à divers degrés chez différents patients. Des dysfonctions vasculaires sont aussi observées de façon courante, celles-ci précédant généralement la fibrose des organes de plusieurs années (10).

### *Vasculopathie*

---

Les premières manifestations cliniques de la SSc sont le plus fréquemment de nature vasculaire et sont caractérisées par une altération des processus de remodelage vasculaire et de néovascularisation (vasculogénèse défectueuse et angiogénèse suractivée). Le concept est que ces

manifestations sont une conséquence de lésions aux cellules endothéliales en lien avec un élément déclencheur qui est pour l'instant inconnu. Au niveau structurel, on observe une vasculopathie dite « *destructrice* », caractérisée par la perte de capillaires et menant alors à l'hypoxie tissulaire ainsi qu'à l'activation des fibroblastes du derme. Il existe aussi une seconde catégorie de vasculopathie dite « *proliférative oblitérante* », qui est caractérisée par une prolifération des cellules vasculaires menant à l'occlusion des artérioles et des petites artères lors de changements fibroprolifératifs. Cette seconde catégorie progresse avec le temps et devient évidente du point de vue clinique sous la forme de HTAP, d'ulcères digitaux ou de crise rénale. Au niveau fonctionnel, on observe une dysfonction endothéliale en lien avec la baisse de disponibilité de l'oxyde nitrique (NO), un système de coagulation et de fibrinolyse altéré favorisant la formation de dépôts intravasculaires de fibrine, ainsi qu'une expression aberrante de facteurs solubles et de molécules d'adhésion cellulaire (ex : molécule 1 d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1), E-sélectine, P-sélectine et facteur de von Willebrand (vWF)) menant à l'infiltration de cellules T auxiliaires 2 (Th2)/Th17, de mastocytes et de macrophages (11). Aussi, on observe une perte de l'équilibre entre les molécules vasoconstrictrices (augmentation d'endothéline-1 (ET-1)) et vasodilatatrices (diminution de NO), menant à une vasoconstriction. L'aspect vasculaire de la SSc est aussi caractérisé par une importante agrégation plaquettaire, cette dernière pouvant agir en lien direct avec les processus inflammatoires et fibrotiques de la maladie (12).

### ***Immunopathologie***

---

En plus de l'atteinte vasculaire, les patients atteints de SSc présentent des infiltrats périvasculaires de monocytes/macrophages et de lymphocytes B et T. Ces infiltrats surviennent de façon précoce et avant tout signe de fibrose, suggérant que l'activation des systèmes immunitaires inné et adaptatif joue un rôle central dans la pathogenèse de la SSc (13, 14).

### ***Immunité innée***

Lors de la reconnaissance des microorganismes pathogènes, le système immunitaire inné est la première ligne de défense. Celle-ci comprend divers mécanismes tels que la production de cytokines, l'activation de la cascade du complément, le déclenchement de l'inflammation et l'activation du système immunitaire adaptatif via la présentation antigénique (15).

La « théorie du danger » stipule que le système immunitaire inné répond bel et bien à des signaux de danger et non pas uniquement à des molécules du non-soi. Dans le cas de la SSc, des lésions à l'endothélium vasculaire, qui constituent une des premières insultes, pourraient mener au relargage

de signaux de danger (par exemple des protéines liées aux dommages et à la nécrose) et donc provoquer une réponse immunitaire innée. Cette réponse est médiée par divers récepteurs, notamment les récepteurs de type Toll (TLR) et les récepteurs de type NOD (NLR) (16).

Ces TLRs sont des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) et leur stimulation déclenche des voies de signalisation qui entraînent divers effets, notamment la production de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (16). Dans le cas de la SSc, la réponse des TLRs est aberrante et ceux-ci semblent impliqués de façon importante dans la pathogenèse de la maladie par leur stimulation des cellules immunes, des fibroblastes et des cellules endothéliales (7). Par exemple, la stimulation du TLR2 par l'amyloïde sérique A induit la sécrétion d'IL-6. Autre exemple, l'« *extra domain A* » de la fibronectine stimule le TLR4, ce qui augmente la signalisation du facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ). Élément intéressant, l'élévation du ligand 4 d'une chimiokine de motif C-X-C (CXCL4) observée chez les patients potentialiserait la réponse à l'activation de ces différents TLRs (16). Cette chimiokine sera abordée plus en détail ultérieurement.

Les NLRs peuvent aussi être particulièrement stimulés dans le cadre de la SSc et semblent y jouer un rôle critique. L'activation de ces récepteurs mène à l'activation de l'inflammasome, et résulte ainsi en l'activation de la caspase-1 et la sécrétion de médiateurs de la superfamille de l'IL-1, qui participent à l'activation lymphocytaire et l'inflammation (15, 16).

### *Signature interféron*

Dans la pathogenèse de la SSc, on accorderait un rôle à un événement déclencheur telle qu'une infection ou une toxine environnementale qui serait responsable de la survenue des processus caractérisant et menant à la SSc chez les individus à contexte génétique permissif (1). Le silice, le chlorure de vinyle et la bléomycine sont des exemples d'expositions environnementales ou occupationnelles ayant été étudiées (3). L'idée d'un élément déclencheur infectieux est notamment basée sur le fait qu'il existe une « signature interféron » chez les patients atteints de SSc (1), en plus de l'implication des gènes de l'IFN abordée précédemment. En effet, l'IFN de type I est un autre exemple de cytokine pouvant être produite en réponse aux TLRs. L'IFN de type I est produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et est un modulateur de la différenciation et de la prolifération des cellules immunitaires (15).

### *Types cellulaires*

Les cellules principales appartenant au système immunitaire inné et reconnues comme jouant un rôle dans la SSc sont les mastocytes, les cellules « *natural killer* » (NK), les macrophages et les cellules dendritiques (DCs). Les mastocytes agissent en tant que cellules sentinelles et sont localisés près des myofibroblastes du derme. Ils expriment une variété de TLRs et sécrètent plusieurs médiateurs immunologiques tels que le TGF- $\beta$ , l'IL-13, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), la protéine chimiotactique des monocytes 1 (MCP-1), l'IFN- $\alpha$  et l'ET-1. Quant aux macrophages activés, ils sont retrouvés généralement dans les régions périvasculaires du derme affecté chez les patients et sont des producteurs de MCP-1, de TGF- $\beta$ , de PDGF et de lectine 1 de type immunoglobuline liant l'acide sialique (Siglec-1) (15). Les DCs, qui nous intéressent particulièrement (voir la section Modèle du laboratoire), jouent un rôle clé dans le lien entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Ces cellules utilisent entre autres des PRR de surface ou intracellulaires pour reconnaître des antigènes appartenant à des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou aux dégâts cellulaires. Elles traitent ces antigènes et présentent l'information recueillie aux lymphocytes T dans un contexte de liaison de l'ensemble formé par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) et l'antigène, avec le récepteur des cellules T (TCR), puis de costimulation CD86/CD80 avec CD28. Elles sont ainsi considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes (APC). Cette présentation antigénique entraîne une sécrétion de cytokines par la DC qui participent à la prolifération et à la différenciation du lymphocyte T vers différentes voies : cellule Th1, Th2, Th17 ou T régulatrice (1).

Il a été démontré à maintes reprises que les DCs occupent une place cruciale dans la pathogenèse de la majorité des maladies auto-immunes (17). Dans le cas plus précis de la SSc, certaines données appuient l'idée d'un rôle pour les DCs dans la pathogenèse de la fibrose (18). Par exemple, il a été démontré que des DCs matures s'accumulent avec les lymphocytes T dans les tissus des poumons de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (IPF) (19). De plus, dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine, une accumulation des DCs CD11c<sup>+</sup> a été démontrée et ce, en colocalisation avec des lymphocytes T activés (20). Les DCs CD11c<sup>bright</sup> ont quant à elles été identifiées en colocalisation avec les myofibroblastes dans le derme profond (18). Toutes ces découvertes et observations font de la DC un médiateur potentiel important dans la SSc. Cette dernière possède un rôle central dans mon projet de recherche.

## ***Réponse immunitaire acquise***

Il a été démontré que le système immunitaire adaptatif joue un rôle primordial dans la pathogenèse de la SSc, c'est-à-dire via les effecteurs cellulaires immuns et les médiateurs humoraux. Dans le contexte de cette maladie, le système immunitaire adaptatif est caractérisé par de profondes altérations.

- 1) **La réponse immunitaire aberrante observée dans la SSc est caractérisée par un infiltrat inflammatoire constitué entre autres de lymphocytes T que l'on retrouve dans les tissus fibrotiques et dans le sang et qui présentent un répertoire oligoclonal du TCR, un élément qui suggère une réponse conduite par l'antigène (possiblement autoantigène) (21).** L'autoantigène responsable de l'initiation de cette réponse immunitaire de lymphocytes T est inconnu. Plusieurs antigènes sont candidats, notamment la protéine TOPOI puisque cette dernière peut être relarguée par les cellules endothéliales apoptotiques (22). Cette dernière joue un rôle central dans notre étude.
  
- 2) **Il existe dans la SSc une expansion préférentielle des lymphocytes T de type Th2 produisant des cytokines pro-fibrotiques telles que l'IL-4 et l'IL-13. Cette phase pro-fibrotique est précédée d'une phase inflammatoire caractérisée par des réponses Th1 et Th17.** Les lymphocytes T activés dominent les infiltrats inflammatoires dans la peau et les tissus atteints dans la SSc. Ces lymphocytes T produisent une multitude de cytokines et ces dernières sont considérées comme ayant un impact majeur sur les cellules endothéliales et la fonction des fibroblastes et donc, des effets possibles sur la promotion ou l'inhibition de la vasculopathie et de la synthèse excessive de collagène. La composition des cytokines dans l'environnement des cellules T a aussi une importance dans la différenciation des cellules T CD4+ vers un profil Th1, Th2 ou Th17 (23, 24).

Les patients atteints de SSc présentent une prédominance en cellules de type Th2. Les lymphocytes T de phénotype Th2 sécrètent des cytokines qui promeuvent la fibrose telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13 et MCP-1 (15). Certaines de ces cytokines sont en lien avec la présente étude : l'IL-13 et l'IL-6.

Les niveaux d'IL-13 sont particulièrement élevés dans le sérum de patients atteints de SSc. Cette cytokine joue un rôle important dans le processus de fibrose de la peau et des

organes internes. Elle stimule la prolifération et la différenciation des fibroblastes, en addition à l'induction de l'expression du collagène I et d'autres gènes liés à la fibrose, notamment l'alpha actine de muscle lisse ( $\alpha$ SMA). L'IL-13 peut aussi activer différents types cellulaires comme les macrophages, qui sécrètent alors le facteur de croissance 1 qui ressemble à l'insuline (IGF-1). Ce facteur protège les myofibroblastes de l'apoptose (24, 25). Quant à l'IL-6, elle est produite par un grand nombre de types cellulaires impliqués dans la pathogenèse de la SSc, incluant les monocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les lymphocytes B et T. L'IL-6 est exprimée dans la peau affectée chez les patients atteints de dcSSc et a des effets profibrotiques. Les concentrations dans le sérum sont corrélées avec l'épaississement de la peau et l'évolution de la maladie à long-terme (5, 26).

Cette expansion préférentielle des lymphocytes T de type Th2 (pro-fibrotiques) est précédée d'une phase inflammatoire caractérisée par des réponses Th1 et Th17 (24). Couvrons d'abord le type Th1. Ce groupe englobe des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires, tels que l'IFN- $\gamma$ , le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ) et le CXCL10.

Contrairement aux cytokines appartenant à la réponse de type Th2, l'IFN- $\gamma$  présente des effets inhibiteurs sur la synthèse de collagène, notamment par l'inhibition de l'expression de gènes pro-collagène ou par la régulation de l'équilibre des métalloprotéinases matricielles (MMP) et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP) (15, 23). De plus, de hauts niveaux sériques d'IFN- $\gamma$  ont été associés au HTAP chez les patients atteints de SSc (27). Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire ayant un rôle central dans la réponse aux infections et dans la pathogenèse de plusieurs maladies immunitaires systémiques. Les niveaux sériques de TNF $\alpha$  sont élevés chez les patients atteints de SSc et sont associés avec le développement de la fibrose pulmonaire et du HTAP (15, 28). Plusieurs études ont montré que CXCL10, une chimiokine inductible par les IFNs, pourrait jouer un rôle dans les processus auto-immuns chez les patients atteints de SSc. On considère cette chimiokine comme anti-fibrotique et anti-angiogénique. On en retrouve des niveaux élevés dans le sérum des patients et ces valeurs élevées sont associées avec un phénotype clinique plus sévère (atteinte pulmonaire et rénale). Le CXCL10 permettrait ainsi une certaine stratification des patients selon le risque d'atteinte d'organes-cibles. On retrouve le CXCL10 plus tôt dans la maladie, appuyant le principe que la phase inflammatoire de type Th1 précède le développement d'une réponse Th2 (23, 29).



Dans certaines situations, les cellules T naïves peuvent aussi initier un programme de différenciation vers les cellules Th17, des cellules productrices d'IL-17A et d'IL-22, entre autres. Les proportions de cellules de type Th17 et d'IL-17A sont élevées chez les patients atteints de SSc, que ce soit au niveau sanguin ou aux sites atteints et ce, particulièrement lors des phases plus précoces de la maladie (23). Il a aussi été démontré que le nombre de ces cellules est associé à la sévérité de la maladie (30). Ces cellules Th17 sont importantes pour la conduite et la perpétuation de l'inflammation et des dommages tissulaires dans les maladies auto-immunes. Un déséquilibre entre les cellules Th17 et les cellules T régulatrices en faveur des cellules Th17 pourrait impliquer une activation non contrôlée du système immunitaire et l'apparition subséquente d'une auto-immunité (7). Chez l'humain, les résultats des études concernant les effets de l'IL-17A sont assez controversés, mais le consensus actuel est que l'IL-17A exerce des activités anti-fibrotiques et pro-inflammatoires (23).

Plusieurs autres cytokines et chimiokines sont soupçonnées de jouer un rôle dans le contexte de la SSc. Certaines ont des rôles ayant été démontrés et peuvent même servir de marqueur comme le CXCL4, mais beaucoup sont qualifiées de médiatrices potentielles et leur rôle exact dans ce contexte reste à clarifier, par exemple l'éotaxine.

Récemment, le CXCL4 a été identifié comme étant un marqueur prédictif de la progression vers une atteinte pulmonaire chez les patients atteints de SSc. En effet, il a été démontré que la chimiokine CXCL4 est la protéine prédominante sécrétée par les pDCs dans la SSc. Chez les patients atteints de SSc, les niveaux de CXCL4 sont élevés et corrélés avec la présence et la progression de complications, notamment la fibrose pulmonaire et le HTAP dans la dcSSc (31). De plus, le CXCL4 est connu pour avoir des effets sur l'angiogenèse, pour réguler à la hausse la production d'IL-4 et d'IL-13 et pour inhiber l'expression d'IFN- $\gamma$  (15). Tous ces éléments font donc du CXCL4 un élément clé à mesurer dans l'évaluation de la maladie. Le TGF- $\beta$ , l'IL-4 et l'IL-17A stimulent les cellules des muscles lisses des voies respiratoires humaines pour produire l'éotaxine. Étant donné l'atteinte pulmonaire caractéristique et la présence démontrée de ces différentes cytokines, un rôle pour l'éotaxine dans la dcSSc est soupçonné (32-34).

**3) Les cellules T régulatrices présentent une fonction déficiente ou possiblement redirigée vers un phénotype Th2, ce qui favorise la fibrose.** Ces cellules T régulatrices jouent un rôle dans le maintien de la tolérance et dans la prévention de l'auto-immunité. Elles peuvent limiter des réponses immunitaires potentiellement dangereuses en produisant des cytokines immunosuppressives, en inhibant les lymphocytes T ou les APCs via des molécules de surface, ou en exprimant des enzymes qui conduiront à des effets anti-prolifératifs (23). Dans le cas de la SSc, très peu est connu sur leur phénotype ou leurs fonctions aux sites atteints. Toutefois, la transdifférenciation pathologique de ces cellules T régulatrices en cellules produisant des cytokines inflammatoires est un concept émergent expliquant leur rôle potentiel dans l'auto-immunité. À ce sujet, il a été démontré que les cellules T régulatrices de la peau des patients atteints de SSc produisent des quantités importantes d'IL-4 et d'IL-13. De plus, dans le sang, ces cellules contiennent une plus grande proportion de récepteurs associés au *homing* de cellules Th2 au niveau de la peau (35).

**4) On observe une réponse humorale exagérée qui favorise possiblement la fibrogenèse.** Dans le contexte de la SSc, on observe une infiltration importante en lymphocytes B au niveau de la peau et des poumons des patients atteints, ainsi qu'une régulation positive des gènes liés aux lymphocytes B au niveau cutané. De plus, un déséquilibre de l'homéostasie et de la fonction des lymphocytes B pourrait contribuer non seulement à l'amplification des processus inflammatoires, mais aussi fibrotiques dans le contexte de cette maladie. En effet, le ligand A induisant la prolifération (APRIL) et le facteur d'activation des lymphocytes B (BAFF) sont importants pour l'homéostasie des lymphocytes B et sont davantage élevés dans le sérum des patients. Ils sont aussi associés avec des manifestations cliniques spécifiques telles que l'étendue de l'atteinte cutanée (BAFF) et la présence de fibrose pulmonaire (APRIL) (23). L'hypergammaglobulinémie polyclonale observée et la présence d'autoAc hautement spécifiques démontrent que les lymphocytes B sont eux aussi activés dans le contexte de la SSc (36). Tel qu'il a été mentionné précédemment, la présence (et la concentration) de ces autoAc spécifiques est corrélée avec l'évolution clinique de la maladie. De plus, ils sont présents très tôt dans le processus pathologique. Cela suggère que ces autoAc pourraient bel et bien jouer un rôle dans la pathophysiologie de la SSc (37, 38). Certains ont été identifiés comme étant des autoAc fonctionnels et même pathogéniques, c'est-à-dire qu'ils participent aux dommages spécifiques à certains organes (39). Par exemple, les anti-TOPOI sont associés

à la fibrose pulmonaire et non à la crise rénale. D'ailleurs, ces autoAc peuvent se lier directement aux fibroblastes (38). Les différents autoAc, tels que les anti-TOPOI représentent ainsi des marqueurs pronostics importants pour la SSc (40).

Il est encore incertain si l'activation des voies effectrices immunitaires est aux commandes de la pathogenèse de la maladie ou si elle représente plutôt une tentative déficiente de limiter ou même de renverser la déposition excessive de MEC et la vasculopathie progressive, mais plusieurs arguments positionnent le système immunitaire au cœur de la pathogenèse de la maladie (23).

### *Processus de fibrose*

---

La fibrose est un processus de cicatrisation pathologique constituant un élément caractéristique de la pathogenèse de la SSc. Elle est définie comme étant un dépôt excessif de composants de la MEC (incluant les divers types de collagènes, par exemple COL1 et COL5) en conséquence à l'activation de fibroblastes en myofibroblastes, ainsi qu'à leur prolifération. Ces derniers en sont donc les effecteurs clés (41, 42). Dans le contexte de la SSc, la fibrose remplace graduellement le stade inflammatoire vasculaire et perturbe ultimement l'architecture des tissus affectés. Elle constitue la cause des principaux symptômes de la maladie (43).

Les réactions inflammatoires semblent contribuer de façon importante aux processus fibrotiques. En effet, le microenvironnement cellulaire et le milieu de cytokines dans les tissus des patients atteints de SSc affectent les fonctions des fibroblastes (production de collagène, de facteurs de croissance et de cytokines) ainsi que leur différenciation en myofibroblastes contractiles. Cela mène à une cicatrisation dérégulée et à la fibrose. Cette communication (« *cross-talk* ») entre les fibroblastes, les cellules du système immunitaire inné et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pourrait jouer un rôle critique dans l'initiation, la perpétuation et possiblement la résolution de la fibrose (44-46). Cela souligne l'interrelation des processus inflammatoires et fibrotiques dans la pathogenèse de la SSc. Le principe émergent des différentes études sur le sujet et sur plusieurs autres maladies fibrotiques est que l'inflammation précède la fibrose et que, sans cette inflammation, la fibrogenèse serait compromise (« *No inflammation, no fibrosis* ») (43, 47).

Il existe une panoplie de voies de signalisation pouvant mener à la fibrose observée chez les patients atteints de SSc (48). Les cytokines TGF- $\beta$  (produite par une majorité de types cellulaires) et IL-4/IL-13 (produites par les cellules Th2), ayant été abordées plus tôt, sont des stimulateurs importants de la synthèse de collagène. En addition à cela, plusieurs autres cytokines et chimiokines ont été

mesurées dans les tissus en processus de fibrose chez les patients atteints de SSc et pourraient ainsi y jouer un rôle. On y retrouve notamment l'IL-6, le PDGF, l'IL-1, l'IL-17, l'IL-5, le MCP-1 et le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) (1, 24). Plus récemment, le récepteur Tweak (Tweak-R, aussi Tnfrsf12a) a été identifié comme une nouvelle cible potentielle dont l'expression est élevée dans la peau des patients atteints de SSc en phase fibroproliférative (49).

Plusieurs facteurs de transcription, dont le gène de la protéine 1 de réponse de croissance précoce (Egr-1), semblent aussi jouer un rôle important dans la fibrose de la SSc. L'expression de ce gène peut être induite par le TGF- $\beta$ , l'IL-13 et divers signaux extracellulaires liés à la SSc telles que la thrombine et l'hypoxie (1, 50). Une expression diminuée du *Friend leukemia integration factor 1* (Fli-1) pourrait aussi être impliquée (42).

Les processus vasculaires abordés précédemment participent potentiellement au développement de la fibrose, notamment via l'ET-1 et possiblement le *Fos-related antigen 2* (Fra-2) (1). De plus, ils contribuent aux processus de fibrose en contrôlant l'infiltration de lymphocytes Th2 et Th17 via l'expression altérée de molécules d'adhésion cellulaire, ou bien en induisant la transition endothélio-mésenchymateuse (11). D'un point de vue intéressant, l'augmentation du remodelage de la MEC résulte en une augmentation de la rigidité de cette dernière et ce processus pourrait être suffisant pour faire persister la fibrose caractéristique de la SSc via une boucle autocrine (42). Cela représente un élément additionnel de l'équation fibrotique.

Ce résumé simplifié de la pathogenèse de la SSc montre à quel point les processus vasculaires, immuns et fibrotiques sont entrelacés. Il en reste beaucoup à déterminer, non seulement concernant l'étiologie ou l'interrelation des différents processus pathologiques, mais aussi concernant l'optimisation de la classification des patients pour tenter de déchiffrer l'hétérogénéité et la complexité de la SSc.

## Traitements

La pathophysiologie complexe de la maladie rend l'approche thérapeutique difficile non seulement au niveau du choix de l'agent pharmacologique, mais aussi au niveau du moment adéquat de l'intervention. Les traitements présentement utilisés pour la SSc ciblent un organe ou un processus pathologique en particulier mais aucun d'entre eux n'est curatif. Ils permettent la gestion des manifestations symptomatiques. Le contexte actuel de traitement individualisé permet de cibler différents processus pathogéniques mais, en général, de manière non spécifique, tels que

l'inflammation, les dérèglements immunitaires, les complications vasculaires et/ou la fibrose. On utilise à ces fins divers classes de médicaments tels que les immunosuppresseurs (dont le mycophénolate mofétil (MMF)), les vasodilatateurs, les antagonistes du récepteur de l'endothéline et les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5. Un bon nombre de thérapies potentielles pour la SSc sont en émergence, mais ne ciblent encore une fois généralement qu'un seul aspect de la pathophysiologie (51). À l'heure actuelle, il n'y a pas de traitement anti-fibrotique prouvé vraiment efficace. Bien qu'il soit maintenant possible de faire un dépistage précoce de la SSc chez les personnes atteintes de phénomène de Raynaud isolé (10), il n'y a pas encore de moyen d'empêcher le développement de la maladie.

### **Pronostic de la SSc**

La SSc étant une maladie incurable, le pronostic vital est réservé. Dans la dcSSc, l'espérance de vie 10 ans après le diagnostic est seulement de ~ 60%. Dans la lcSSc, elle est de 80-85%. L'évolution lente de la lcSSc est trompeuse, car souvent elle se complique tardivement de HTAP, qui est une cause de mortalité. Chez les malades qui survivent, la SSc implique beaucoup de morbidité à cause des manifestations ischémiques et fibrotiques, tant au niveau cutané qu'au niveau des organes internes. Par exemple, les ulcères digitaux ischémiques sont extrêmement douloureux et très lents à guérir, et peuvent conduire à une nécrose avec perte de la partie distale des doigts. Au niveau des organes internes, l'ILD, l'atteinte de l'intestin grêle, l'atteinte myocardique et l'atteinte œsophagienne sont des causes importantes de morbidité (52).

## Modèles expérimentaux de SSc

Dans un contexte thérapeutique décevant et devant le besoin majeur de percées thérapeutiques en SSc, la recherche fondamentale est essentielle. En médecine, les modèles animaux revêtent une importance primordiale pour étudier et mieux comprendre les différentes étapes de la pathogenèse des maladies. Ainsi, plusieurs modèles expérimentaux ont été développés chez la souris et sont utilisés de manière complémentaire avec les données *in vitro* ou *ex vivo* d'échantillons de patients, pour tenter de clarifier les mécanismes impliqués dans le développement de la SSc et de trouver de nouvelles cibles ou principes pour un meilleur traitement (53).

## Modèles génétiques

Les modèles murins génétiques englobent plusieurs aspects de la SSc, mais il faut souligner que la pathophysiologie de cette maladie ne s'explique pas seulement par la génétique.

Les souris *tight skin-1* (Tsk1) ont été le premier modèle murin décrit pour la SSc. Ces souris sont hétérozygotes pour une mutation dominante sur le gène de la fibrilline-1, une protéine de la MEC et composante majeure des microfibrilles. Elles présentent des anomalies de la peau semblables à celles des patients atteints de SSc. Elles développent divers désordres immunologiques caractéristiques de la maladie chez l'humain, notamment la production d'autoAc anti-TOPOI. Le modèle de souris *tight skin-2* (Tsk2) a ensuite été développé, ce dernier utilisant une mutation au niveau du procollagène III. Ces souris présentent plusieurs caractéristiques de la maladie chez l'humain, notamment de la peau serrée, de la fibrose, des anomalies de la MEC et des autoAc antinucléaires. Toutefois, contrairement aux souris Tsk1, les souris Tsk2 présentent une infiltration importante de cellules mononucléaires dans le derme et dans le septum du tissu adipeux (54, 55). Même s'ils sont imparfaits par rapport à la SSc humaine, ces modèles ont permis d'étudier plusieurs phénomènes, notamment la fibrose cutanée et certains dérèglements immunologiques. Ils ont ainsi servi de plateforme à l'étude d'un grand nombre de molécules thérapeutiques anti-fibrotiques, immunomodulatrices et vasculaires.

Un autre modèle génétique pour la SSc a été développé à partir de souris MRL/lpr. Ces dernières présentent une maladie auto-immune systémique ressemblant au lupus érythémateux disséminé. L'effet de la perte du récepteur pour l'IFN- $\gamma$  a été évalué chez ces souris, et cet ensemble constitue un modèle assez complet présentant une fibrose généralisée, une vasculopathie proliférative et des autoAc (56).

Les souris transgéniques (tg) au niveau des fibroblastes sont elles aussi des modèles génétiques, plutôt axés sur le rôle de TGF- $\beta$ . La souris TBRI<sup>CA</sup> Cre-ER porte un transgène constitutivement actif inductible et montre de la fibrose cutanée, une vasculopathie des petits vaisseaux et des dysfonctionnements pulmonaires et rénaux (57). La souris transgénique TBRII $\Delta$ K-fib montre une hyperactivité de TGF- $\beta$  et présente de la fibrose cutanée et pulmonaire, une cardiopathie fibrotique et un remodelage vasculaire systémique (58).

Il existe aussi un modèle de souris transgéniques pour Fra-2, un facteur de transcription jouant un rôle de médiateur en aval de TGF- $\beta$  et PDGF. Ces souris présentent deux des caractéristiques principales de la maladie, c'est-à-dire la vasculopathie et la fibrose cutanée et pulmonaire. Toutefois, on n'observe pas de dérégulation auto-immune (59).

**Tableau I. Tableau résumé illustrant la présentation des caractéristiques principales de la SSc dans les modèles murins génétiques de cette maladie**

	Fibrose	Inflammation	AutoAc	Vasculopathie
Tsk1	✓	✓	✓	
Tsk2	✓	✓	✓	
MRL/lpr sans récepteur pour IFN $\gamma$	✓		✓	✓
TBRI <sup>CA</sup> Cre-ER	✓			✓
TBRII $\Delta$ K-fib	✓			✓
Fra2 Tg	✓			✓
Calvéoline-1 KO	✓	✓		
Mutation Fli1				✓
Relaxine KO	✓			
Wnt-10b Tg	✓			

Les souris déficientes (knock-out, KO) pour la cavéoline-1 constituent un autre modèle murin pour la SSc. Ces dernières présentent un phénotype cutané semblable à celui observé dans la SSc, plus particulièrement au niveau du diamètre des fibres de collagène, de la rigidité tissulaire et une infiltration de cellules mononuclées (60).

Il existe des souris mutantes pour Fli1, un régulateur de transformation cellulaire et de la production de MEC. Ce modèle présente plus spécifiquement les caractéristiques principales du phénotype vasculaire cutané observé chez les patients (61).

D'autres modèles illustrent spécifiquement l'aspect fibrotique de la maladie. Il y a tout d'abord les souris déficientes pour le gène de la relaxine qui présentent une fibrose généralisée, mais cela est en réponse à des mécanismes autres que ceux impliqués dans la SSc chez l'humain (62). Dans cette même catégorie, on retrouve les souris transgéniques pour Wnt-10b, développées à partir du fait que la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est régulée à la hausse au niveau cutané chez l'humain. Ces souris transgéniques ne présentent toutefois qu'une fibrose cutanée, en parallèle à une perte de tissu adipeux sous-cutané (53, 63).

### Modèles inductibles

Les modèles inductibles présentent généralement les aspects fibrotiques et immunitaires de la SSc. La fibrose pulmonaire et cutanée induite par la bléomycine (voie sous-cutanée) est un modèle largement répandu dans les études scientifiques sur la SSc. Les souris traitées à la bléomycine présente de la fibrose pulmonaire et cutanée, de même que divers autoAc antinucléaires (64). Ce modèle est très facilement reproductible et largement utilisé. L'administration intratrachéale de bléomycine est aussi utilisée pour la modélisation de la fibrose pulmonaire. Toutefois, son utilité en tant que modèle de fibrose pulmonaire idiopathique est débattue, notamment à cause de la réversibilité partielle de la fibrose avec le temps. Il faut aussi souligner le grand nombre de résultats décevants au niveau clinique pour des molécules ayant précédemment eu un succès thérapeutique dans ce modèle murin (65).

Ensuite, il y a les souris traitées avec du chlorure de vinyle (66) et le modèle induit via l'angiotensine II (67) qui présentent une infiltration de cellules mononuclées et de la fibrose au niveau cutané.

Certains modèles présentent de la fibrose de la peau et des poumons, ainsi que des autoAc anti-TOPOI. C'est le cas des souris injectées avec de l'acide hypochloreux (HOCl) (68). Cela souligne le rôle des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans la pathophysiologie de la SSc. Le modèle immunologique des souris immunisées avec la TOPOI (+ adjuvant complet de Freund (CFA)) présente aussi ces différents éléments (69). Ce dernier se développe via le système immunitaire, un élément en lien avec la présente étude. Le CFA est utilisé comme 2<sup>e</sup> élément déclencheur (le 1<sup>er</sup> étant la protéine TOPOI) et semble être un élément clé pour diriger la réponse immunitaire vers un milieu pro-fibrotique



permissif. En effet, l'immunisation de souris avec seulement la protéine TOPOI induit le développement d'auto-immunité, mais pas le développement de caractéristiques pathologiques semblables à la SSc (23).

Une production d'autoAc anti-TOPOI ainsi qu'une fibrose et une inflammation généralisées sont observées dans le modèle de la SSc induite par la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD). Ce modèle est généré par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. Dans ce cas-ci, la réaction est dite « scléromateuse » (Scl-GVHD), puisqu'elle ressemble beaucoup à la sclérodémie du point de vue inflammatoire et fibrotique. Ce modèle est lui aussi immunologique, c'est-à-dire qu'il est basé sur l'activation des cellules immunitaires. Cette activation mènera au développement de la fibrose (70). Tout comme le modèle de souris immunisées avec l'émulsion de TOPOI et de CFA, ce modèle constitue une plateforme intéressante pour l'étude de thérapies anti-inflammatoires et immunosuppressives.

**Tableau II. Tableau résumé illustrant la présentation des caractéristiques principales de la SSc dans les modèles murins inductibles de cette maladie**

	Fibrose	Inflammation	AutoAc	Vasculopathie
Bléomycine	✓	✓	✓	
Chlorure de vinyle	✓	✓		
Angiotensine II	✓	✓		
HOCl	✓		✓	
TOPOI+CFA	✓		✓	
Scl-GVHD	✓	✓	✓	

Les souris injectées à la bléomycine, celles injectées au HOCl et celles présentant le Scl-GVHD ont servi de modèles pour l'étude d'un bon nombre d'agents thérapeutiques anti-fibrotiques et immunomodulateurs. Ces études multiples ont montré plusieurs résultats très prometteurs (53).

### Ces modèles sont-ils adéquats ?

Les modèles présentés (Tableaux I et II) ont des forces et des faiblesses, mais peuvent nous aider à étudier certains aspects ou éléments de la pathophysiologie de la SSc. Par exemple, ils ont démontré le rôle de différentes protéines et de facteurs de transcription dans le développement de la

fibrose et nous ont aidé à comprendre comment la fibrose, l'atteinte vasculaire et l'inflammation collaborent pour créer les phénotypes variés observés dans la SSc (53, 71). Toutefois, ces modèles ne semblent pas adéquats ou assez complets par rapport à la complexité pathogénique de la SSc humaine pour les phases pré-cliniques. En effet, la transition des traitements du laboratoire à la clinique est décevante : plusieurs thérapies prometteuses chez la souris se sont avérées inefficaces chez l'humain (72).

En résumé, les différents modèles murins présentent une ou plusieurs caractéristiques de la pathophysiologie de la SSc, mais il n'en existe aucun qui récapitule toutes les caractéristiques principales et le caractère progressif (53). Il serait donc nécessaire de mettre au point un modèle nouveau, plus complet, qui reflète mieux la pathogénèse de la SSc humaine. Un tel modèle permettrait de mettre à l'essai des approches thérapeutiques nouvelles pour le traitement de cette maladie incurable qu'est la SSc (71, 72). Le modèle animal idéal devrait présenter toutes les caractéristiques principales de la maladie, notamment l'atteinte vasculaire, l'auto-immunité avec la production d'autoAc et la fibrose progressive (73).

## Modèle du laboratoire d'accueil

Dans un contexte de recherche d'un modèle plus physiologique et plus proche de la maladie humaine, l'équipe du laboratoire d'accueil a développé un nouveau modèle murin de SSc. Il s'agit d'un modèle à évolution progressive, présentant plusieurs aspects de la dcSSc et ayant comme acteur principal le système immunitaire, notamment la DC et des peptides du soi.

Notre modèle consiste à immuniser les souris de façon hebdomadaire sur un total de quatre semaines et ce, avec des DCs chargées avec le peptide TOPOIA ou avec le peptide TOPOIB, les deux faisant partie de la protéine TOPOI (voies sous-cutanée (sc) et intratrachéale (it)). Les groupes sont comparés à des souris immunisées avec des DCs non chargées. Les souris sont ensuite immunisées avec le même type de DCs cinq semaines plus tard, puis avec une émulsion de CFA et du peptide deux autres semaines plus tard (voir Protocole d'immunisation à la section Matériels et méthodes pour plus de détails / **figure 1**). L'apogée de la fibrose apparaît autour de deux semaines suivant la dernière immunisation. À ce moment (semaine 12), on observe une fibrose pulmonaire et cutanée chez les souris immunisées avec les DCs chargées avec le peptide TOPOIA. On observe cependant une fibrose cutanée et une réponse en autoAc anti-TOPOI chez celles immunisées avec les DCs chargées avec le peptide TOPOIB. Huit semaines après la dernière immunisation (semaine 18), on observe une fibrose cutanée diffuse et une réponse en autoAc anti-TOPOI chez les deux groupes en comparaison aux souris contrôles. Avant l'immunisation avec le CFA et le peptide (semaine 10), on observe de l'inflammation pulmonaire périvasculaire, péribronchiale et parenchymale chez les souris immunisées avec les DCs chargées avec TOPOIA. Chez ce même groupe, on observe aussi une élévation transitoire des comptes cellulaires du lavage bronchoalvéolaire et de la production de CXCL4 (manuscrit en révision mineure), un biomarqueur précoce de la dcSSc (31). Il est important de mentionner que ce modèle expérimental de la SSc présente des aspects systémiques, notamment la fibrose. En effet, cette dernière est observée dans les poumons, même lorsque les immunisations sont effectuées seulement au niveau sous-cutané ou intrapéritonéal (manuscrit en révision). Ce modèle immunologique est construit à la manière d'un vaccin. Les premières immunisations représentent une sorte de « *priming* » ou d'amorce. Puis, l'immunisation identique cinq semaines plus tard et celle comprenant le CFA et le peptide sont qualifiées de « *boosts* », ou stimulations (**figure 1**).

## Objectifs de travail

Plusieurs des modèles connus dans le domaine présentent une guérison spontanée qui s'avère très limitante au niveau de la mise à l'épreuve d'agents thérapeutiques (71). **Ainsi, le 1<sup>er</sup> objectif était d'évaluer la persistance à long terme du modèle.** Un modèle présentant une persistance à long terme permettrait d'avoir une plus grande fenêtre pour intervenir avec différentes thérapies et permettrait aussi d'évaluer véritablement ces traitements potentiels, en éliminant l'option d'une guérison spontanée.

Étant donné l'aspect progressif du développement de ce modèle murin, et en lien avec le principe que l'inflammation précède la fibrose dans un contexte immunologique (47), **le 2<sup>e</sup> objectif était de caractériser l'infiltrat inflammatoire précédant la survenue de la fibrose.** Étudier les cytokines impliquées dans le développement du modèle permettrait d'en savoir plus sur la pathogenèse de cette maladie expérimentale, mais aussi d'identifier certaines cibles thérapeutiques préventives potentielles, puis d'intervenir ou de manipuler le modèle.

**Le 3<sup>e</sup> objectif était d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un inhibiteur sélectif de la thrombine, le dabigatran, sur le modèle expérimental de SSc chez la souris et ce, à différents stades de la maladie afin de ralentir sa progression, voire même d'induire sa régression.** Le système de coagulation (cascade de coagulation + agrégation plaquettaire) et le système immunitaire sont deux des principaux systèmes de défense de l'hôte et plusieurs évidences démontrent qu'ils interagissent à travers divers processus, notamment le développement et la progression de la fibrose pulmonaire (12, 74). Une étude réalisée sur le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et montrant que les souris déficientes en fibrine (protéine filamenteuse formant le caillot sanguin et issue de la conversion du fibrinogène par la thrombine) ne sont pas protégées mène à croire que les événements impliqués dans la fibrose observée se situent plutôt en amont de la cascade de coagulation (75). Cette étude souligne l'intérêt d'investiguer la thrombine, qui est le facteur primaire dans la voie menant à la formation de fibrine (74).

**Le 4<sup>e</sup> objectif était d'évaluer l'effet de la manipulation du microbiote intestinal sur l'évolution de la SSc induite chez la souris et ce, par l'administration d'un antibiotique, la streptomycine.** Les bactéries commensales qui composent le microbiote intestinal (l'ensemble des micro-organismes vivant dans l'intestin) ont toujours été associées à la production de nutriments essentiels et à la défense de l'hôte contre différents pathogènes, mais il est aussi connu qu'il existe un

effet important du microbiote sur le développement, notamment celui du système immunitaire (76). Il y a des données grandissantes accordant un rôle au microbiote dans le développement des maladies auto-immunes, par exemple pour l'arthrite rhumatoïde (77) ou le diabète (78), mais ce phénomène n'est pas exploré dans la SSc.

## Matériels et méthodes

### Souris

Des souris syngéniques de type Balb/c nées au CRCHUM ont été utilisées (50% mâles, 50% femelles). Les souris ont été logées dans des installations exemptes de pathogènes spécifiques et ce, tout au long des expériences. Toutes les procédures ont été acceptées par le comité institutionnel de protection des animaux du CRCHUM.

### Protocole d'immunisation

Les peptides TOPOIA (SQIEADFRLNDSHKHKD) et TOPOIB (LKRRIMPEDIIINCS) ont été synthétisés au *Sheldon Biotechnology Centre* de l'Université McGill. Les DCs utilisées pour l'immunisation ont été préparées en effectuant le *flushing* de la moelle osseuse fémorale des souris avec du milieu de culture (RPMI complet (Wisent) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Wisent), 1% de pénicilline-streptomycine (Wisent), 0,1% de 2-mercaptoéthanol (Gibco) et 1% d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) (Gibco)). Les cellules ainsi récoltées ont été mises en culture avec le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-monocytes (GM-CSF, 1 µl/ml) (PeproTech), puis nourries à chaque 2-3 jours avec du milieu de culture et du GM-CSF (2 µl/ml), permettant une différenciation de ces cellules en monocytes. Au 11<sup>e</sup> jour suivant la mise en culture, ces derniers ont été chargés avec le peptide respectif (10 µg/ml) ou aucun peptide, puis maturés le lendemain matin avec du lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) d'*Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich) pendant 4 h tel que décrit dans (79). Cette procédure a permis la génération d'une population homogène de DCs CD11c+CD11b+CD103-SIRPα+CMHII+ et exprimant les marqueurs d'activation CD40 et CD86, tel que montré dans (80).

Lorsqu'elles ont atteint l'âge de 5-6 semaines, les souris ont été immunisées de façon hebdomadaire avec des DCs chargées avec TOPOIA (« TOPOIA DCs ») ou TOPOIB (« TOPOIB DCs ») via les voies sous-cutanée (sc, 100 µl, 0,1x10<sup>6</sup> cellules) et intratrachéale (it, 80 µl, 0,1x10<sup>6</sup> cellules) et ce, pour quatre semaines. Par la suite, les souris ont eu une pause de cinq semaines, puis une stimulation avec les mêmes DCs et via les mêmes voies (« DC boost »). Lors des différentes immunisations de DCs, les souris ont aussi reçu une injection sous-cutanée de 100 mg de papaine activée (Calbiochem) tout prêt du site d'injection des DCs. La papaine (0,5 mg/ml dans du tampon phosphate salin (PBS, 1X, pH 7.2)) a été activée par de la L-cystéine (157,4 mg/ml dans PBS 1X) (Sigma-Aldrich) à 37 °C pendant 30

min. Par la suite, deux semaines après la stimulation en DCs chargées avec le peptide respectif (« *DC boost* »), les souris ont reçu une injection sous-cutanée (200 µl) d'une émulsion 1:1 de CFA (MP Biomedicals) et du peptide en question (100 mg). Les souris contrôles ont reçu quatre immunisations de DCs préparées de la même façon (maturation par LPS pendant 4 h) mais non chargées, dites « *unpulsed DCs* » (sc+it, même quantités). Elles ont elles aussi reçu une stimulation (« *DC boost* ») de « *unpulsed DCs* » (sc+it, même quantités), puis une injection sous-cutanée (200 µl) d'une émulsion 1:1 de CFA et de PBS (« *CFA boost* »), tout cela en parallèle aux groupes de souris immunisées avec des DCs chargées. Le protocole d'immunisation est illustré à la **figure 1**.

### Préparation et administration du dabigatran

L'étéxilate de dabigatran (Pradaxa® de Boehringer Ingelheim) a été envoyé à ENVIGO pour son incorporation dans la nourriture des souris à une concentration de 10 mg/g. Cette concentration a été rapportée comme résultant en des niveaux plasmatiques adéquats chez la souris sur le plan clinique, sans pour autant causer de saignement (81, 82). La diète spéciale a été administrée aux souris pour des périodes déterminées. Le traitement dit « précoce » a été donné du jour après la seconde immunisation (semaine 1) jusqu'au jour du « *DC boost* » (semaine 8). Le traitement dit « tardif » a plutôt été donné de la semaine 7 jusqu'au jour du sacrifice (semaine 12) (voir **figure 9**).

### Préparation et administration de la streptomycine

La streptomycine (SteriMax) a été administrée dans l'eau consommée aux couples reproducteurs, puis aux souriceaux sevrés et ce, pour toute la durée de l'expérience (exposition à vie). Elle a été donnée à une dose quotidienne jugée pertinente sur le plan clinique (200 mg/L) (83). L'eau a été changée à tous les 2-3 jours pour s'assurer de la stabilité du produit actif. D'autres types d'expositions ont aussi été évalués, c'est-à-dire l'exposition *in utero* (administration aux couples reproducteurs et aux souriceaux sevrés jusqu'à une semaine avant la première immunisation) et l'exposition adulte (d'une semaine avant la première immunisation jusqu'à la fin de l'expérience) (voir **figure 14**).

## Sacrifice

Les souris ont été sacrifiées à différents points temporels (semaines 10, 12 et 18, **figure 1**).

## Sérum

Le sang a été prélevé dans la veine jugulaire externe et collecté dans des eppendorfs, puis ces derniers ont été centrifugés (7000 rpm, 15 min). Le surnageant a alors été prélevé, puis conservé à -20 °C.

## Liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF)

Le BALF été prélevé par des lavages broncho-alvéolaires, dont un de 6 ml et trois de 5 ml. Le liquide ainsi récolté a été conservé à -20 °C.

## Explants de poumons

Le lobe moyen droit des poumons de souris a été prélevé dans 4 ml d'une solution de chlorure de sodium à 0.9% (Baxter), puis coupé en 4-5 morceaux avant d'être transféré dans une plaque de 24 puits dans 1 ml de milieu de culture puis incubé 24 h à 37 °C. Par la suite, il a été collecté puis conservé à -20 °C.

## Mesure de cytokines et de chimiokines

À partir des kits (DuoSet) de la compagnie R&D Systems, la méthode immuno-enzymatique ELISA a été utilisée pour quantifier la présence des cytokines et chimiokines CXCL4, CXCL10, IL-6, IL-17, TNF $\alpha$  et éotaxine dans l'explant de poumons et le BALF des souris. L'IL-5 a aussi été étudiée, en utilisant un kit de la compagnie BD Biosciences. L'analyse a été effectuée en utilisant une courbe standard exponentielle, puis en interpolant les valeurs à partir de la courbe standard à l'aide de la fonction de régression exponentielle (*One phase decay*) du logiciel Prism 6 (Graphpad).

## TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  (1, 2 et 3) a été mesuré dans le BALF, l'explant de poumons et le sérum des souris à partir du *TGF- $\beta$  3-plex Discovery Assay* de Eve Technologies (Calgary, Alberta).



## Quantification de l'expression de gènes par l'amplification en chaîne par polymérase en temps réel (qRT-PCR)

L'isolation de l'ARNm des échantillons de peau a été réalisée à partir du *RNeasy® Fibrous Tissue Kit* (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. Ce protocole a permis l'obtention de 20 µl d'ARN. Les concentrations en ARN des échantillons (ng/µl) ont été déterminées au NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). La transcription inverse (RT) a été réalisée à partir du *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific). Plus précisément, l'ARN isolé des échantillons de peau a été mélangé avec du tampon RT (10X), une amorce complémentaire aléatoire RT (10X), un mélange de dNTP (mélange des 4 désoxyribonucléotides) (25X, 100 mM), l'enzyme transcriptase inverse MultiScribe® (50 U/µl), ainsi que de l'eau exempte d'ARNase. En utilisant le thermocycleur *T Gradient* (Biometra), le mélange a été incubé à 25 °C pendant 10 min, à 37 °C pendant 120 min et à 85 °C pendant 5 min, permettant ainsi l'obtention d'ADN complémentaire. Ce dernier a été amplifié à l'aide du RT-PCR pour quantifier l'expression des différents gènes à l'étude. De l'eau sans ARNase, le mélange « *TaqMan* » comprenant l'amorce oligonucléotidique complémentaire et la sonde associée (0,5 µl par échantillon), ainsi que le *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (5 µl par échantillon) (Thermo Fisher Scientific) ont été ajoutés à l'ADN complémentaire des différents échantillons. Le test de réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été réalisé avec 100 ng d'ADN complémentaire par échantillon. À partir de la machine *QuantStudio® 7 Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific), les échantillons ont tout d'abord été incubés à une température montante (1.9 °C/s de 25 °C à 95 °C), puis à 95 °C pour 20 s. Ensuite, les échantillons ont traversé 40 cycles du programme de température suivant : 1 s à 95 °C, une période de diminution de 1.6 °C/s jusqu'à 60 °C, 20 s à 60 °C, une période de remontée à 1.9 °C/s jusqu'à 95 °C et ainsi de suite. Le gène de maintenance *Hprt* a été utilisé et les gènes d'intérêt *Col1a1*, *Col5a1*, *Il4*, *Il5*, *Il6*, *Il13*, *Il17*, *Il22*, *Il33*, *Acta2* (αSMA), *Tgfb*, *Ifng*, *Rorc*, *Foxp3*, *Tslp*, *Mmp12*, *Vwf*, *Tnfrsf12a* (Tweak-R) et *Serpine1* (PAI-1) ont été analysés. Les données d'expression relative ont été multipliées par 1000 pour permettre une meilleure représentation graphique.

## Histologie

Au moment du sacrifice, le lobe gauche des souris a été gonflé avec une solution 1:1 du composé d'OCT (Tissue-Tek) et de sucrose 30%, puis congelé rapidement dans cette même solution à l'aide de glace sèche et d'isopropanol pour cryomicrotomie future. De plus, des prélèvements de peau (épiderme, derme et hypoderme) ont été effectués, puis les tissus prélevés ont eux aussi été gelés.

dans du OCT après leur transfert dans un gradient de sucrose (15%, 30%, puis OCT). Les tissus ont été coupés au microtome (5 µm), fixés par acétone (lames trempées pendant 1 min), puis colorés par les colorations d'hématoxyline et éosine (H&E), de trichrome de Masson, ainsi que pour αSMA (voir sections suivantes). Suite aux différentes colorations, les lames ont été numérisées avec un microscope VS-110 (objectif 20x, 0,75 d'ouverture numérique, résolution de 0,3225 µm) (Olympus). Les images ont été analysées grâce au logiciel OlyVIA (Olympus) et capturées avec CorelPAINT.

### Hématoxyline et éosine (H&E)

La coloration H&E permet de visualiser l'inflammation, plus particulièrement les noyaux cellulaires (bleu), ainsi que les cytoplasmes et la MEC (gradient de rose). Une fois les cryosections (lames) séchées, un cercle a été tracé autour d'elles grâce au crayon PAP. L'hématoxyline de Mayer (0,1%) (Electron Microscopy Sciences) a été ajoutée (1 ml) aux cryosections pour 15 min. Les lames ont alors été placées dans l'eau du robinet (alcalin) pendant 10 min pour permettre la coloration des noyaux en bleu, puis brièvement rincées à l'eau distillée. Les lames ont alors été trempées à douze reprises dans une solution d'éosine acidifiée (0,5%) (Sigma-Aldrich). Elles ont par la suite été rincées à l'eau distillée encore une fois, mais ce à trois reprises. Les cryosections ont alors été déshydratées progressivement à partir de solutions d'éthanol en les trempant dix fois dans l'éthanol à 50%, dix fois dans le 70%, 30 s dans le 90%, 1 min dans le 100%, puis dans le xylène jusqu'à leur montage en utilisant l'Entellan® (EMD Millipore). Les lames ont finalement été séchées pendant la nuit avant observation au microscope.

### Trichrome de Masson

La coloration trichrome de Masson permet de visualiser la fibrose, plus particulièrement le collagène (bleu), la kératine et les fibres musculaires (rouge), les cytoplasmes (rose), ainsi que les noyaux cellulaires (noir). Une fois les cryosections (lames) séchées, elles ont été re-fixées dans la solution de Bouin (Electron Microscopy Sciences) pendant la nuit pour améliorer la qualité de la coloration, suivi d'un rinçage de 10 min à l'eau du robinet. L'hématoxyline ferrique de Weigert (Electron Microscopy Sciences) a été ajoutée (1 ml) aux cryosections pendant 15 min, puis les lames ont été rincées à l'eau du robinet (alcalin) pendant 10 min pour colorer les noyaux en noir. Suite à un bref rinçage à l'eau distillée, les lames ont été placées dans une solution de *Biebrich scarlet-acid fuchsin* (Electron Microscopy Sciences) pendant 15 min pour colorer les muscles, le cytoplasme et la kératine en

rouge, puis elles ont été rincées encore une fois à l'eau distillée. Un mélange des acides phosphomolybdique et phosphotungstique (Electron Microscopy Sciences) a alors été ajouté aux cryosections (1 ml), suivi de l'ajout du bleu d'aniline (Electron Microscopy Sciences) (1 ml), le tout permettant la coloration du collagène en bleu. Les lames ont été trempées dans l'acide acétique (1%) pour permettre la différenciation. Les cryosections ont alors été déshydratées en trempant les lames à deux reprises dans l'éthanol à 95%, deux fois dans 100%, puis dans le xylène, avant d'être montées avec l'Entellan® (EMD Millipore). Les lames ont finalement été séchées pendant la nuit avant observation au microscope.

### **αSMA**

La coloration pour αSMA (anticorps de lapin anti-αSMA de souris, 1/200, Abcam ab5694) a été réalisée à la plateforme de pathologie moléculaire du CRCHUM. Elle a été effectuée sur la plateforme BenchMark XT (Ventana) en utilisant le kit *iView DAB Open* et un anticorps secondaire polyclonal anti-lapin (1/500, Dako E0432). Ensuite, à partir des numérisations de ces lames, l'aire positive pour αSMA a été quantifiée grâce au logiciel ImageJ.

### **Épaississement du septum alvéolaire**

À partir des numérisations des tissus colorés au trichrome de Masson, dix mesures de l'épaisseur du septum alvéolaire ont été prises et ce, dans trois aires d'analyse différentes pour chaque image, grâce au logiciel ImageJ.

### **Thrombine**

La thrombine a été mesurée dans les explants de poumons à la semaine 10 et ce, à partir du kit *Thrombin Activity Fluorometric Assay* (BioVision) et en utilisant le lecteur de plaques multi-mode VICTOR<sup>3</sup>V (PerkinElmer).

### **Analyse de l'hydroxyproline**

Aux différents points de cinétique (sacrifices), des biopsies de 6 mm de diamètre de peau rasée ont été prélevées chez les souris près du site d'injection. Le lobe pulmonaire crânien droit et le rein droit des souris ont aussi été prélevés. Les tissus ont été congelés rapidement sur glace sèche, puis conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation pour la quantification du collagène. Après avoir pesé les tissus, ces derniers ont été hydrolysés dans 2 ml d'acide chlorhydrique 6 N à 99 °C pendant 6 jours (tubes de verre bouchonnés). Les hydrolysats ont alors été séchés complètement à 110 °C pendant la

nuit. Suite à cela, 2 ml d'H<sub>2</sub>O (1 ml pour les poumons) ont été ajoutés aux tissus et le tout a été homogénéisé. À ce niveau, les hydrolysats de peau et de poumons sont prêts pour le reste de l'expérience, tandis que ceux des reins ont été laissés à température pièce jusqu'au lendemain, où ils ont alors été filtrés (70 µm). Une solution standard a été préparée en diluant le standard d'hydroxyproline (10 mg/ml) avec H<sub>2</sub>O (duplicata), pour une concentration initiale de 1280 µg/ml. Cette concentration a alors été diluée par un facteur 2, et cela à 6 reprises, pour un total de 7 tubes à concentrations décroissantes et un 8<sup>e</sup> étant le zéro. Un total de 200 µl de chaque échantillon a été ajouté dans des eppendorfs (duplicata), puis 500 µl de réactif de Chloramine-T<sup>1</sup> y ont été ajoutés pour oxyder l'hydroxyproline libre présente dans les échantillons, lors d'une incubation de 30 min à la température de la pièce. Ensuite, 500 µl de solution d'Ehrlich (diméthylaminobenzaldéhyde) (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés aux eppendorfs pour une incubation de 30 min à 65 °C, ce qui a engendré une réaction avec le produit d'oxydation et donc la coloration observée. Les échantillons ont alors été transférés dans des cuvettes et l'absorbance a été lue à 555 nm au spectrophotomètre Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Biosciences). Cette dernière a été utilisée pour interpoler les valeurs d'hydroxyproline correspondantes à partir de la fonction de régression linéaire du logiciel Prism 6 (GraphPad). Ces valeurs ont été calculées en µg d'hydroxyproline par mg de tissu.

<sup>1</sup> Chloramine-T (10 ml) : 0.14 g de poudre de Chloramine-T (Sigma-Aldrich), 1 ml de 2-propanol, 1 ml de H<sub>2</sub>O et après un mélange délicat, 8 ml de tampon au citrate<sup>2</sup> pH 6.0.

<sup>2</sup> Tampon au citrate (pH 6.0, 200 ml) : 9.23 g acide citrique anhydre, 14.5 g acétate de sodium anhydre, 6.8 g d'hydroxyde de sodium, 2.4 ml d'acide acétique glacial, dissous dans 200 ml H<sub>2</sub>O, pH ajusté à 6.0, le tout conservé à 4 °C.

## Analyse statistique

Le logiciel Prism 6 (Graphpad) a été utilisé pour comparer les moyennes des groupes par le test de t de Student non apparié. Une valeur-p inférieure à 0.05 a été considérée comme significative (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

# Résultats

## Le modèle

### Protocole d'immunisation

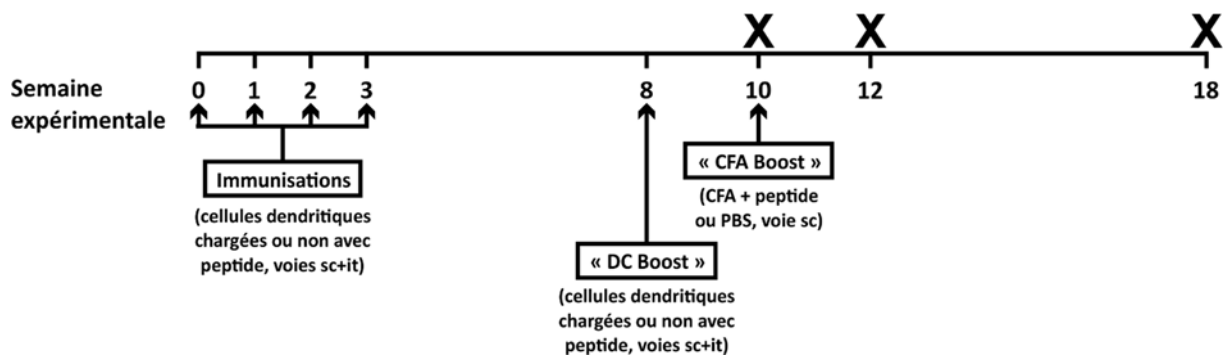


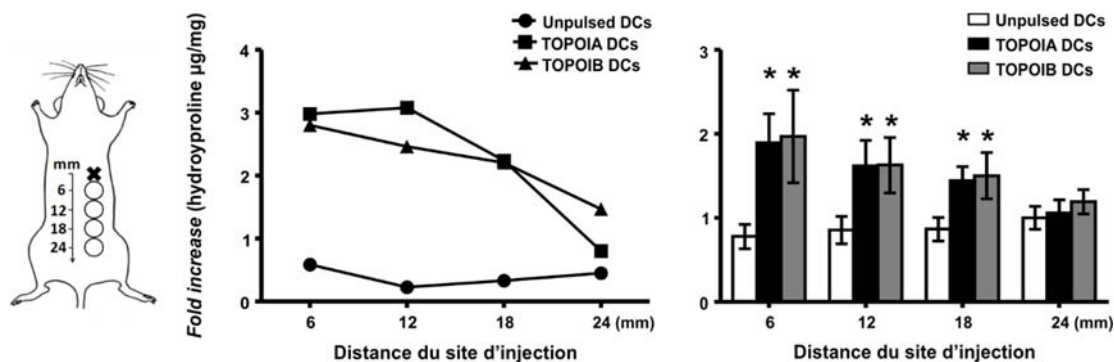
Figure 1. Schéma du protocole d'immunisation.

Les X indiquent les différents sacrifices.

## Objectif 1 : Évaluation de la persistance de la maladie dans le modèle expérimental de SSc

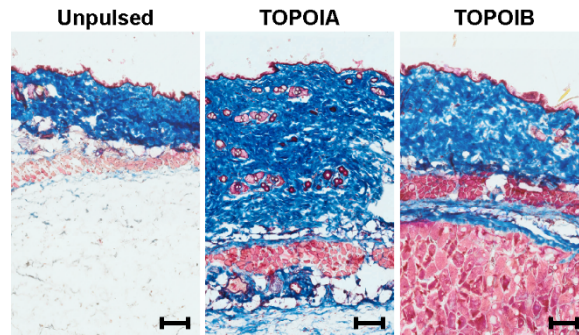
### Atteinte cutanée

Les modèles murins de SSc présentent généralement une rémission spontanée et des lésions se limitant au site d'injection. Par exemple, la fibrose induite par la bléomycine, qui est largement utilisée comme modèle de SSc, présente une fibrose cutanée pour un temps limité et sur un radius très petit, facteurs limitant son utilisation (84). Nous voulions évaluer la persistance et l'aspect diffus de l'atteinte cutanée caractérisant notre modèle pour le comparer à la maladie chez l'humain, qui est chronique et systémique. Ainsi, huit semaines après la dernière immunisation, nous avons quantifié la fibrose cutanée et ce, à différentes distances du point d'immunisation.



**Figure 2. Le protocole d'immunisation induit spécifiquement une fibrose cutanée, persistante et diffuse.**

À la semaine 18, le collagène a été quantifié par la mesure de l'hydroxyproline dans des échantillons de peau prélevés à des distances de 6, 12, 18 et 24 mm du site d'injection (X sur le schéma) tel que montré sur le schéma de gauche. Le graphique de gauche présente les données d'une souris représentative pour chaque groupe. Pour le graphique de droite, \*  $p < 0.05$  en comparaison à « *Unpulsed DCs* » jusqu'à une distance de 18 mm du site d'injection. Les moyennes des groupes ont été comparées par le test de t de Student non apparié. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne de deux expériences indépendantes comprenant un total de  $n=6$  « *Unpulsed DCs* »,  $n=8$  « *TOPOIA DCs* » et  $n=7$  « *TOPOIB DCs* ».

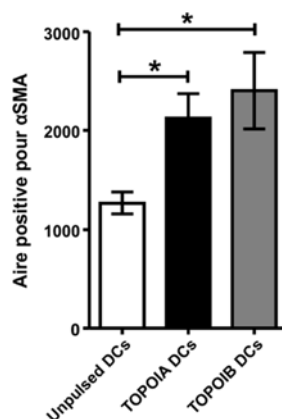


**Figure 3. La fibrose cutanée persistante induite par le protocole d'immunisation est associée à l'absence d'infiltration cellulaire.**

À la semaine 18, des cryosections de peau (5 µm) ont été examinées pour évaluer la déposition de collagène par la coloration de trichrome de Masson, telle que visualisée en bleu. L'échelle graphique mesure 100 µm.

Tel que démontré à la **figure 2**, on observe à la semaine 18 une fibrose cutanée diffuse, c'est-à-dire jusqu'à une distance de 18 mm du site d'injection chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » et chez celles immunisées avec les « *TOPOIB DCs* ». À la **figure 3**, des cryosections de peau de souris à la semaine 18 corroborent les observations liées à la **figure 2**, en montrant une production de collagène augmentée chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » et chez celles immunisées avec les « *TOPOIB DCs* ». Les images présentées sont représentatives des différents groupes. À ce point temporel plus tardif, on observe une fibrose importante et l'absence d'infiltration cellulaire.

Ensuite, pour renforcer notre analyse de la fibrose cutanée qui persiste à long terme chez les souris, nous avons étudié les myofibroblastes, effecteurs clés des processus de fibrose. L' $\alpha$ SMA, un marqueur spécifique à ces derniers, a donc été mesuré au niveau de la peau des souris.



**Figure 4.** À long terme, le protocole d'immunisation induit au niveau cutané une augmentation spécifique des cellules  $\alpha$ SMA+.

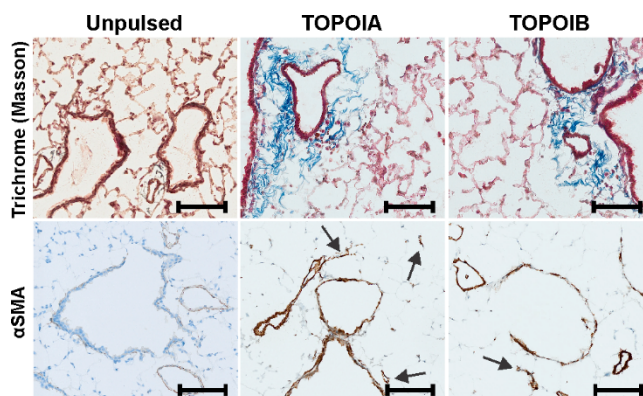
À la semaine 18, des cryosections de peau (5  $\mu$ m) ont été examinées pour l'expression d' $\alpha$ SMA dans le derme. \*  $p=0.0155$  pour « TOPOIA DCs » et \*  $p=0.0179$  pour « TOPOIB DCs » en comparaison avec « Unpulsed DCs ». Les moyennes des groupes ont été comparées par le test de t de Student non apparié. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne de deux expériences indépendantes comprenant un total de  $n=6$  « Unpulsed DCs »,  $n=8$  « TOPOIA DCs » et  $n=7$  « TOPOIB DCs ».

À la **figure 4**, on observe une augmentation significative des cellules positives pour  $\alpha$ SMA chez le groupe de souris « TOPOIA DCs » et chez le groupe « TOPOIB DCs » en comparaison avec le groupe « unpulsed DCs ».



## Atteinte pulmonaire

Une des caractéristiques principales de notre modèle est l'importante fibrose pulmonaire à la semaine 12. En lien avec le manque de persistance des modèles murins de SSc, nous avons évalué la persistance de cette fibrose pulmonaire par l'analyse de coupes histologiques pour des marqueurs de fibrose à la semaine 18.

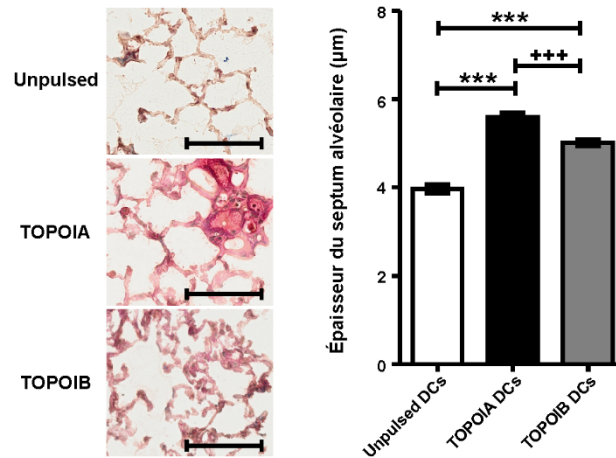


**Figure 5. Le protocole d'immunisation induit spécifiquement une fibrose pulmonaire persistante associée à la surexpression d' $\alpha$ SMA.**

À la semaine 18, des cryosections de poumons (5  $\mu$ m) ont été examinées pour la déposition de collagène avec la coloration trichrome de Masson, puis pour la présence de myofibroblastes par immunohistochimie pour  $\alpha$ SMA. Les flèches indiquent des cellules positives pour  $\alpha$ SMA dans le parenchyme. L'échelle graphique mesure 100  $\mu$ m.

À la **figure 5**, on observe que les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » et celles immunisées avec les « *TOPOIB DCs* » présentent une fibrose pulmonaire (coloration bleue au trichrome de Masson) qui persiste jusqu'à la semaine 18. Il est important de noter l'absence d'infiltrats cellulaires péribronchiaux et périvasculaires. À ce point temporel tardif, les régions entourant les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins sont colorées de façon intense pour  $\alpha$ SMA (coloration brunâtre), un marqueur de myofibroblastes et ce, chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* », tandis que c'est plutôt une coloration au niveau périvasculaire qui prédomine chez les souris immunisées avec les « *TOPOIB DCs* ». Ces deux groupes présentent une augmentation des cellules positives pour  $\alpha$ SMA dans le parenchyme (flèches).

Lors de l'analyse des coupes histologiques, nous avons observé un épaissement du septum alvéolaire. Cet épaissement pouvant être dû à la déposition de constituants de la MEC et autres causes pathologiques (85, 86), nous avons décidé de le quantifier.



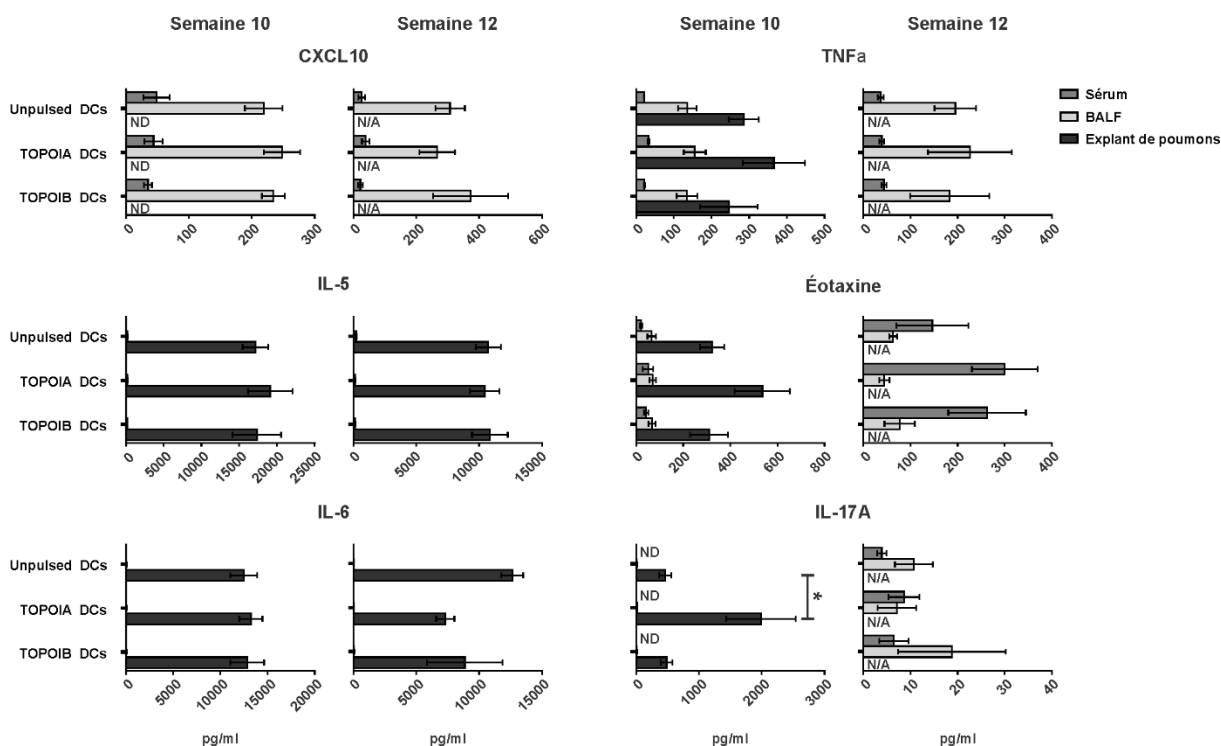
**Figure 6. Le protocole d'immunisation induit un épaissement du septum alvéolaire spécifique à long terme.**

À la semaine 18, des cryosections de poumons (5 μm) colorées au trichrome de Masson ont été examinées pour l'épaissement du septum alvéolaire. L'échelle graphique mesure 100 μm. \*\*\*, +++  $p \leq 0.0001$  et  $p \leq 0.0005$  en comparaison à « *Unpulsed DCs* » et « *TOPOIB DCs* », respectivement. Les moyennes des groupes ont été comparées par le test de t de Student non apparié. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne de deux expériences indépendantes comprenant un total de n=6 « *Unpulsed DCs* », n=8 « *TOPOIA DCs* » et n=7 « *TOPOIB DCs* ».

Comme on le voit dans la **figure 6**, l'épaisseur du septum alvéolaire est augmentée chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » en comparaison aux deux autres groupes, et est augmentée chez les souris immunisées avec les « *TOPOIB DCs* », en comparaison à celles immunisées avec les « *unpulsed DCs* ».

## Objectif 2 : Caractérisation de l'infiltrat inflammatoire

Il a récemment été proposé que le développement de la fibrose est le résultat de la résolution d'une réponse inflammatoire aberrante (47). Afin de déterminer si la fibrose observée à la semaine 12 (manuscrit en révision) et persistant jusqu'à la semaine 18 dans notre modèle était précédée d'inflammation, les signes d'inflammation pulmonaire ont donc été étudiés à la semaine 12 ainsi qu'à un point tempore précédant le développement de la maladie (semaine 10) et ce, en analysant entre autres le profil de cytokines aux niveaux local et systémique. Pour avoir une idée générale de l'infiltrat inflammatoire présent et en accord avec la littérature sur le sujet, des cytokines de type Th1 (CXCL10, TNF $\alpha$ ), Th2 (IL-5, IL-6, éotaxine) et Th17 (IL-17A) ont été étudiées.

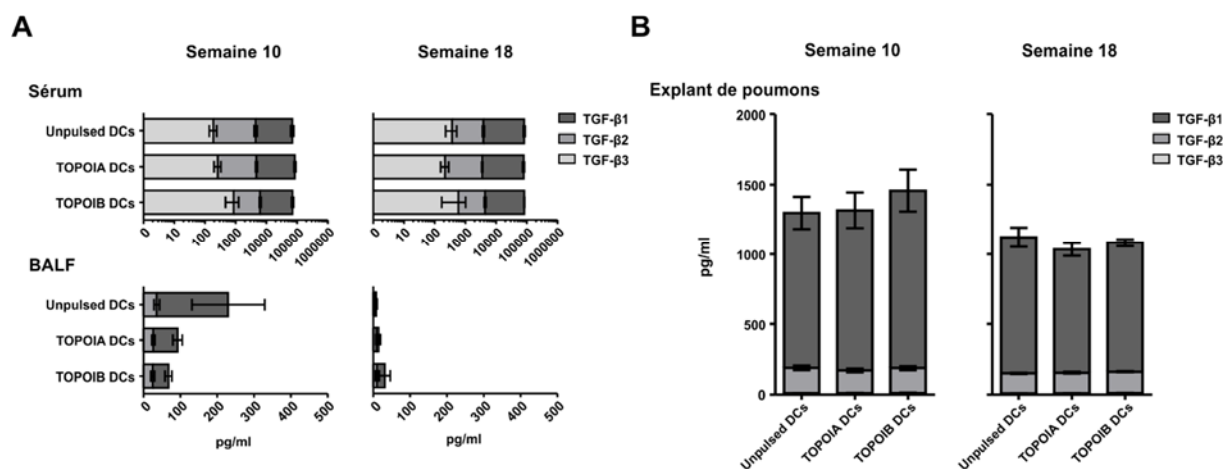


**Figure 7. La fibrose pulmonaire observée dans le modèle est précédée d'une phase inflammatoire caractérisée entre autres par une augmentation spécifique de l'IL-17A.**

Aux semaines 10 et 12, les quantités de cytokines CXCL10, IL-6, IL-5, TNF $\alpha$ , éotaxine et IL-17A ont été mesurées dans le sérum, le BALF et l'explant de poumons. \* p = 0.0208 en comparant à « *unpulsed DCs* ». Les moyennes des groupes ont été comparées par le test de t de Student non apparié. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne de 2 (sérum) ou 3 (explants de poumons et BALF) expériences indépendantes comprenant un total de n=6 ou 9 « *Unpulsed DCs* », n=6 ou 14 « *TOPOIA DCs* » et n=6 ou 9 « *TOPOIB DCs* ». ND = *Not Detectable*, N/A = *Not Available*.

Différentes cytokines ont été mesurées localement (BALF, explants de poumons) et au niveau systémique (sérum) aux semaines 10 et 12. Comme on le voit à la **figure 7**, les différents groupes de souris n'ont présenté aucune différence significative pour la production de CXCL10, d'IL-6, d'IL-5, de TNF $\alpha$  et d'éotaxine lors de la phase inflammatoire (semaine 10). Par contre, la production d'IL-17A à la semaine 10 dans les cultures d'explants de poumons était augmentée de façon significative chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* ». Une tendance à la hausse de la production d'éotaxine était aussi observée. L'IL-6 ne présentait aucune différence à la semaine 10, mais semblait diminuée chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » en comparaison à celles immunisées avec les « *unpulsed DCs* » à la semaine 12.

Le TGF- $\beta$  est une cytokine clé des processus fibrotiques, notamment ceux caractérisant la SSc. De plus, le TGF- $\beta$  est associé à la régulation de l'expression d' $\alpha$ SMA (87, 88) et notre modèle présente une expression pulmonaire et cutanée augmentée d' $\alpha$ SMA (**figures 4 et 5**). Ainsi, nous avons évalué les taux des trois isoformes du TGF- $\beta$  aux niveaux local et systémique dans notre modèle murin.



**Figure 8. Le TGF- $\beta$  est présent, mais non spécifiquement régulé aux niveaux local et systémique dans notre modèle murin de SSc.**

Aux semaines 10 et 18, l'expression protéique de TGF- $\beta$ 1, 2 et 3 a été mesurée dans (A) le sérum, le BALF et (B) l'explant pulmonaire. Les moyennes des groupes ont été comparées par le test de t de Student non apparié. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne de deux expériences indépendantes comprenant un total de n=7 « *Unpulsed DCs* », n=9 « *TOPOIA DCs* » et n=6 « *TOPOIB DCs* ».

Aucune augmentation différentielle pour les trois isoformes de TGF- $\beta$  actif n'a été observée dans notre modèle à la semaine 10 et ce, localement ou au niveau systémique. De plus, aucune

régulation temporelle de TGF- $\beta$  n'a été observée à la semaine 12 (**données non présentées**). Pour ce qui est de la semaine 18, on observe une régulation à la baisse en comparaison aux semaines 10 et 12 et ce, dans le BALF et l'explant de poumons.

### Objectif 3 : Traitement par dabigatran

Il est important de mentionner que pour les sections correspondant aux objectifs 3 et 4, l'étude s'est concentrée sur le groupe de souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* », car nos résultats précédents, dont ceux présentés aux sections 1 et 2, ont montré que la plupart des caractéristiques pathologiques observées sont soit significativement plus marquées avec ce groupe, ou même spécifiques à ce groupe en comparaison avec « *TOPOIB DCs* » (manuscrit en révision). Les souris immunisées aux « *TOPOIA DCs* » et présentant la maladie expérimentale sont donc utilisées comme groupe-cible spécifique pour les objectifs 3 et 4.

En plus de son rôle dans la coagulation, la thrombine engendre un bon nombre d'effets pro-inflammatoires et fibroprolifératifs, entre autres via le récepteur activé par les protéases 1 (PAR-1) (74). Après administration orale, l'étéxilate de dabigatran est converti en sa forme active, le dabigatran. Ce dernier est un inhibiteur direct, compétitif et réversible du site actif de la thrombine (89) et pourrait en ce sens représenter une alternative pour moduler les processus vasculaires et inflammatoires de la SSc. L'hypothèse est d'agir lors de la phase inflammatoire, en lien avec le principe que l'inflammation précède la fibrose et que la fibrogenèse pourrait être compromise par une profonde suppression de cette inflammation (5). De plus, il est connu que la microangiopathie accompagnée de dommages endothéliaux et d'inflammation périvasculaire sont des phénomènes précoces chez les patients atteints de SSc (73), ce qui augmente l'intérêt d'évaluer diverses méthodes de traitement à différentes phases de la maladie expérimentale.

#### Protocole d'immunisation

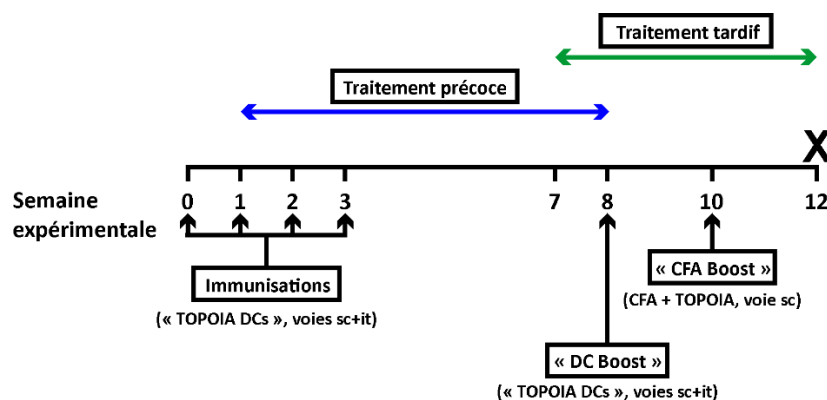
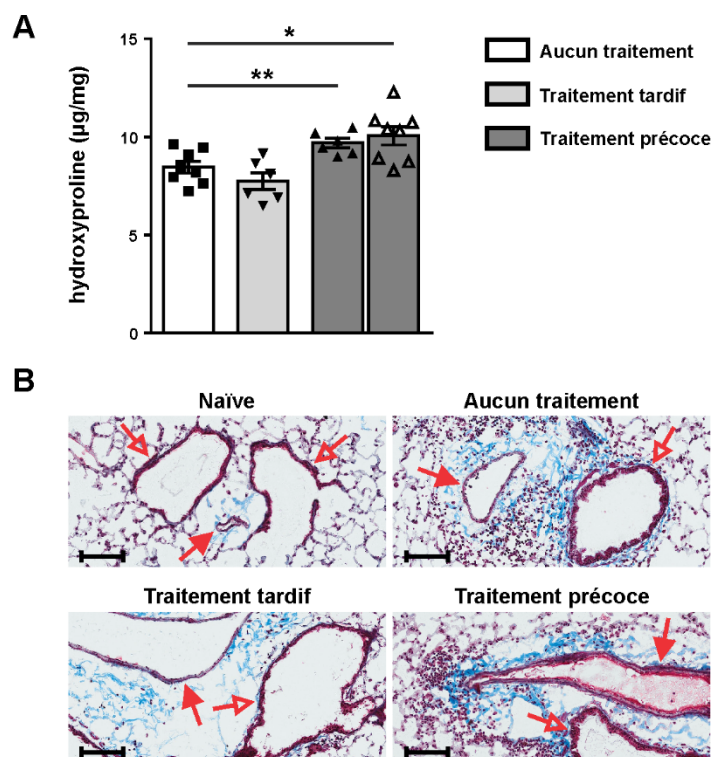


Figure 9. Schéma du protocole d'immunisation et de traitement au dabigatran.

Le X indique le sacrifice (semaine 12).

## Atteinte pulmonaire

Tel que mentionné, la fibrose pulmonaire est une des caractéristiques principales de notre modèle. Il était donc indiqué de la quantifier pour évaluer l'effet du traitement au dabigatran dans notre modèle murin de SSc.

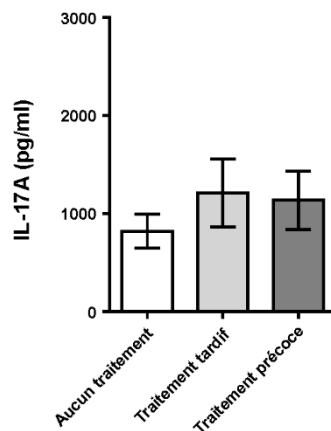


**Figure 10. L'administration de dabigatran lors de la phase plus précoce de la maladie aggrave la fibrose pulmonaire chez les souris immunisées avec les « TOPOIA DCs ».**

La déposition de collagène dans des échantillons de poumons prélevés à la semaine 12 chez des souris mâles et femelles a été examinée par la mesure de l'hydroxyproline et la coloration de trichrome de Masson. (A) \*\*  $p=0.0081$ , \*  $p=0.0145$ . Les symboles vides représentent les souris immunisées avec les « TOPOIA DCs » qui cohabitent dans la même cage que des souris immunisées avec les « unpulsed DCs ». Les moyennes des groupes ont été comparées par le test de t de Student non apparié. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne de deux expériences indépendantes comprenant un total de  $n=8$  « Aucun traitement »,  $n=6$  « Traitement tardif » et  $n=6$  ou  $8$  « Traitement précoce » (souris en cages séparées ou en cohabitation). (B) Les flèches pleines désignent les vaisseaux sanguins et les flèches vides désignent les bronches. L'échelle graphique mesure 100  $\mu\text{m}$ . Une cryosection de poumons de souris naïve (souris n'ayant subi aucune manipulation) est présentée pour servir de référence.

Les souris traitées au dabigatran pendant la phase inflammatoire (traitement précoce) développent une fibrose pulmonaire plus importante, tel que démontré par les niveaux d'hydroxyproline augmentés (**figure 10A**). Il est important de mentionner que cette augmentation a lieu pour les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » qui cohabitent avec celles immunisées avec les « *unpulsed DCs* » (symboles vides), comme pour les souris élevées en cages séparées (symboles pleins), car cela démontre que cette aggravation n'est pas due à un « effet cage ». Les souris traitées durant la phase fibrotique de la maladie (traitement tardif) ne présentent aucune différence avec les souris non traitées. Par l'analyse des coupes histologiques, on observe de l'inflammation et de la fibrose périvasculaire et péribronchique (**figure 10B**).

Nous voulions étudier les possibles causes de l'aggravation de la fibrose pulmonaire. L'IL-17A a donc été mesurée, car il s'agit d'une cytokine potentiellement importante dans notre modèle, tel que démontré à la **figure 7**.



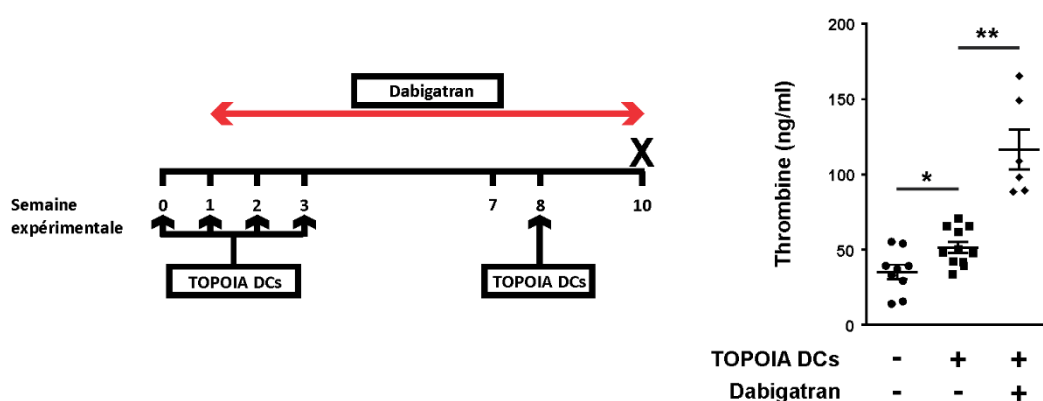
**Figure 11. Le traitement au dabigatran n'influence pas les niveaux pulmonaires d'IL-17A à la semaine 12 chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* ».**

À la semaine 12, les concentrations d'IL-17A ont été mesurées dans l'explant de poumons. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes comprenant un total de n=16 « Aucun traitement », n=12 « Traitement tardif » et n=9 « Traitement précoce ».

À la **figure 11**, on observe que les niveaux d'IL-17A dans les explants de poumons des différents groupes de souris traitées sont maintenus en comparaison avec les souris non traitées.



Ensuite, afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'aggravation de la fibrose pulmonaire induit par l'administration de dabigatran, nous avons analysé les taux de thrombine pulmonaire dans notre modèle. Nos données préliminaires avaient montré une hausse de la thrombine à la semaine 10. Nous avons donc mesuré la thrombine dans différentes conditions à la semaine 10. Le dabigatran a été donné à partir de la semaine 1 jusqu'à la semaine 10. Il était important que les souris soient traitées jusqu'à la fin de l'expérience pour être certain de connaître le niveau de la thrombine dans un contexte d'action du dabigatran, et non pas après un arrêt de traitement.



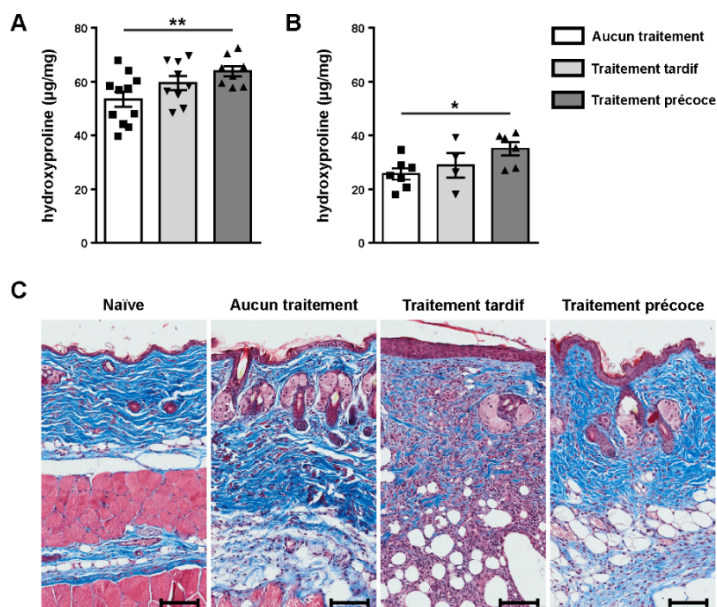
**Figure 12. L'administration de dabigatran augmente la concentration de thrombine au niveau pulmonaire à la semaine 10 dans notre modèle murin de SSc.**

À la semaine 10, la thrombine a été mesurée dans l'explant de poumons. \*  $p=0.0169$ , \*\*  $p=0.0037$ . Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes comprenant un total de  $n=9$  « Naïve »,  $n=11$  « Aucun traitement » et  $n=6$  « Dabigatran ». Le X sur le protocole d'immunisation indique le sacrifice.

On observe une augmentation des niveaux de thrombine dans l'explant pulmonaire chez les souris immunisées non traitées en comparaison aux souris naïves. Chez les souris immunisées traitées au dabigatran de la semaine 1 à la semaine 10, les niveaux de thrombine sont significativement élevés (figure 12).

## Atteinte cutanée

Il est important de mesurer la fibrose cutanée pour évaluer l'effet du traitement du dabigatran dans notre modèle murin de SSc. Il faut noter que les mâles et les femelles ont été séparés à cause de la grande différence en collagène cutané d'un sexe à l'autre. Les autres éléments étudiés ne varient pas en fonction du sexe.



**Figure 13. L'administration de dabigatran lors de la phase plus précoce de la maladie aggrave la fibrose cutanée chez les souris immunisées avec les « TOPOIA DCs ».**

La déposition de collagène dans des échantillons de peau prélevés à la semaine 12 chez des souris (A) mâles ou (B) femelles a été examinée par la mesure de l'hydroxyproline et (C) par la coloration de trichrome de Masson. (A) \*\*  $p=0,0078$ , (B) \*  $p=0,0162$ . Les moyennes des groupes ont été comparées par le test de t de Student non apparié. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne de deux expériences indépendantes comprenant un total de (n=mâles ou femelles)  $n=11$  ou  $7$  « Aucun traitement »,  $n=9$  ou  $4$  « Traitement tardif » et  $n=8$  ou  $6$  « Traitement précoce ». (C) L'échelle graphique mesure  $100 \mu\text{m}$ . Une cryosection de peau de souris naïve a été ajoutée pour servir de référence.

À la **figure 13**, on observe que les souris traitées au dabigatran de façon précoce développent une fibrose cutanée plus importante, tel que démontré par les niveaux d'hydroxyproline augmentés. Cet effet est observé autant chez les mâles (A) que chez les femelles (B). Les souris traitées de façon tardive ne présentent aucune différence avec les souris non traitées. Les deux types de traitement au dabigatran engendrent une hyperplasie de l'épiderme et une infiltration inflammatoire cutanée importante (**figure 13C**).

#### Objectif 4 : Manipulation du microbiote intestinal par la streptomycine

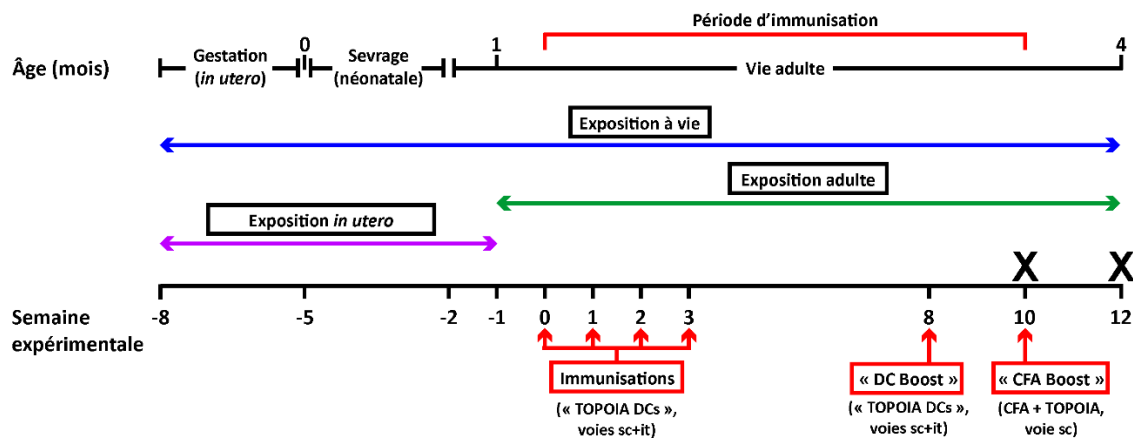
En plus des différents facteurs génétiques et environnementaux façonnant la composition du microbiote, les antibiotiques créent des changements importants dans les populations bactériennes, ce qui les rend très utiles pour étudier l'effet de la dysbiose (le déséquilibre de la composition du microbiote) sur différentes pathologies (90). La méthode choisie dans notre étude est l'administration d'un antibiotique, la streptomycine, dans le but de modifier le microbiote intestinal. Il faut préciser qu'un changement significatif dans la composition du microbiote par l'administration de streptomycine a été observé (**données préliminaires non présentées**). Ainsi, nous considérons l'exposition à la streptomycine comme une dysbiose. La streptomycine est un antibiotique qui cible les bactéries Gram-positif et Gram-négatif. Il est utilisé dans le contexte clinique et est peu absorbé lors de l'administration orale, ce qui limite les effets systémiques chez l'hôte, en particulier lorsque celui-ci doit être traité plusieurs semaines comme dans notre protocole (91).

Le système immunitaire en tant que cible et le principe de la « fenêtre critique »

L'hypothèse actuelle sur la colonisation microbienne suggère que le microbiote s'installe avant la naissance. Le microbiote de la mère forme le premier inoculum, puis la diversité microbienne augmente après la naissance et converge vers le microbiote adulte très tôt dans la vie (quelques années chez l'humain) (92). Il existe donc une fenêtre temporelle en début de vie durant laquelle a lieu une colonisation microbienne importante en parallèle à celle de la maturation du système immunitaire (92). Il est connu que le microbiote intestinal joue un rôle important durant cette période et ce, pour guider le développement immunitaire et maintenir l'homéostasie de la muqueuse. Cette phase est qualifiée de « fenêtre critique ». C'est-à-dire qu'il y a initiation d'un programme de maturation du système immunitaire et que, si ce programme d'événements immunologiques clés est perturbé par un microbiote altéré, l'hôte peut être prédisposé à de nombreuses maladies chroniques initiées par des réponses immunes aberrantes (90). Cette « fenêtre » a été observée dans une étude réalisée sur un modèle murin d'asthme. Celle-ci surviendrait durant les trois premières semaines de vie de l'animal (90). En dehors de cette « fenêtre », par exemple chez l'adulte, le microbiote est généralement plus stable. Toutefois, il peut quand même être altéré par divers facteurs tels que les antibiotiques (92), mais ce de façon différente en comparaison à un traitement plus précoce. De plus, dans cette éventualité de traitement à l'âge adulte, le microbiote intestinal est perturbé à un moment où le développement immunitaire est déjà chose du passé et donc où la tentative de modulation immunitaire est beaucoup moins efficace (91). En ce sens, nous pourrions être portés à croire qu'une dysbiose à ce

moment consisterait en un élément moins perturbateur pour l'immunité de l'hôte. Cette importante cinétique développementale entre le système immunitaire et la colonisation du microbiote intestinal nous a poussé à évaluer différents temps d'administration de la streptomycine et donc d'évaluer cette « fenêtre critique » dans notre modèle expérimental de SSc.

### Protocole d'immunisation

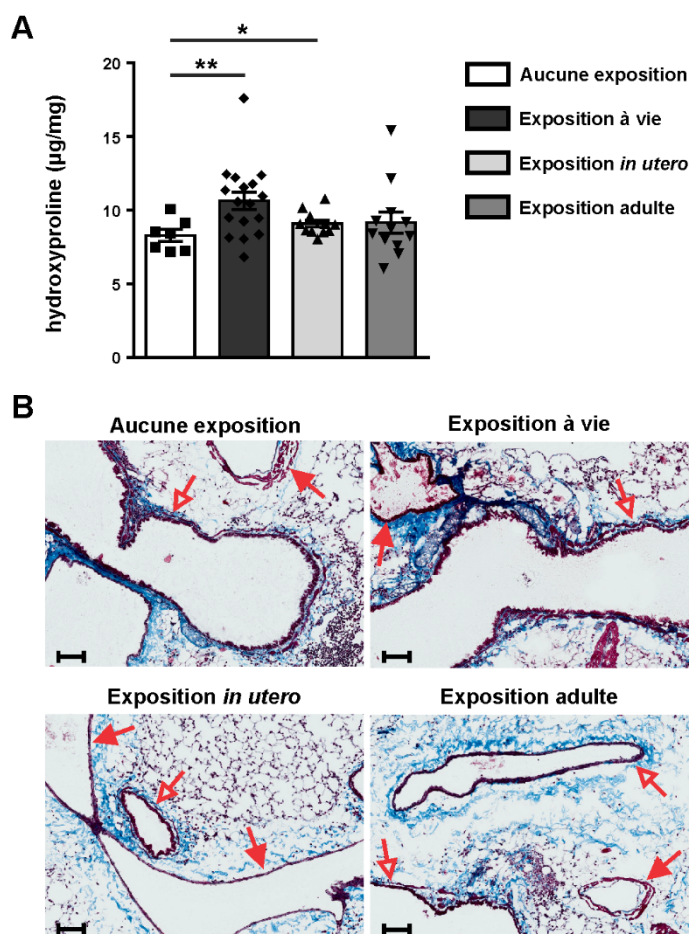


**Figure 14. Schéma du protocole d'immunisation et d'exposition à la streptomycine.**

Les X indiquent les différents points temporels de sacrifices. L'exposition dite « *in utero* » à la streptomycine comprend les périodes *in utero* et néonatale. L'exposition dite « à vie » désigne une exposition pour les périodes *in utero*, néonatale et adulte.

## Atteinte pulmonaire

Dans le but d'évaluer l'effet de la dysbiose induite par la streptomycine sur notre modèle murin, la fibrose pulmonaire a été étudiée à la semaine 12 chez ces souris.

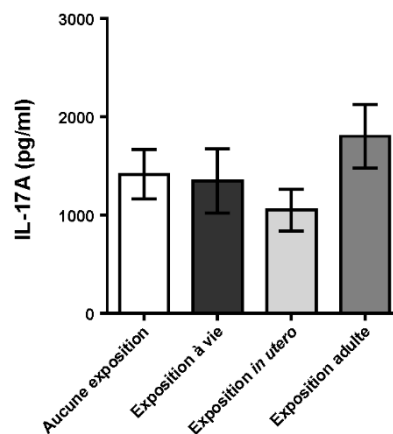


**Figure 15. L'exposition à la streptomycine lors des périodes *in utero* et néonatale aggrave la fibrose pulmonaire à la semaine 12 chez les souris immunisées avec les « TOPOIA DCs ».**

La déposition de collagène dans des échantillons de poumons prélevés à la semaine 12 a été examinée par (A) la mesure de l'hydroxyproline et (B) la coloration de trichrome de Masson. (A) \*\*  $p=0.0012$ , \*  $p=0.0169$ . Les moyennes des groupes ont été comparées par le test de t de Student non apparié. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes comprenant un total de  $n=7$  « aucune exposition »,  $n=17$  « exposition à vie »,  $n=11$  « exposition *in utero* » et  $n=12$  « exposition adulte ». (B) Les flèches pleines désignent les vaisseaux sanguins et les flèches vides désignent les bronches. L'échelle graphique mesure  $100 \mu\text{m}$ .

À la **figure 15A**, on observe que l'exposition à vie à la streptomycine entraîne une fibrose pulmonaire exacerbée à la semaine 12 chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* ». L'exposition *in utero*, qui est arrêtée avant le début du protocole d'immunisation, augmente la susceptibilité du développement de la fibrose pulmonaire chez ces souris. L'exposition adulte, quant à elle, n'a pas affecté les niveaux d'hydroxyproline significativement. Par l'analyse des coupes histologiques, on observe de l'inflammation et de la fibrose périvasculaire et péribronchiale chez tous les groupes de souris (**figure 15B**).

En lien avec la théorie concernant l'effet de la manipulation du microbiote sur l'inflammation et dans le but d'expliquer l'aggravation pulmonaire observée, l'IL-17A a encore une fois été mesurée dans l'explant pulmonaire des souris.



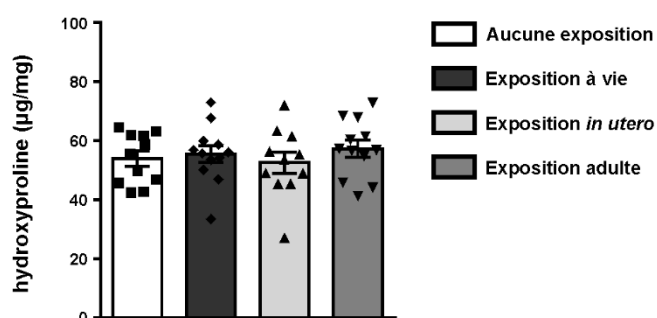
**Figure 16. L'exposition à la streptomycine n'influence pas les niveaux pulmonaires d'IL-17A à la semaine 10 chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* ».**

À la semaine 10, les concentrations d'IL-17A ont été mesurées dans l'explant de poumons. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes comprenant un total de n=13 « aucune exposition », n=5 « exposition à vie », n=7 « exposition *in utero* » et n=8 « exposition adulte ».

À la **figure 16**, on observe que les niveaux d'IL-17A dans les explants de poumons de souris exposées à la streptomycine ne varient pas de façon significative en comparaison aux souris non exposées et ce, peu importe la durée ou le moment de l'exposition.

## Atteinte cutanée

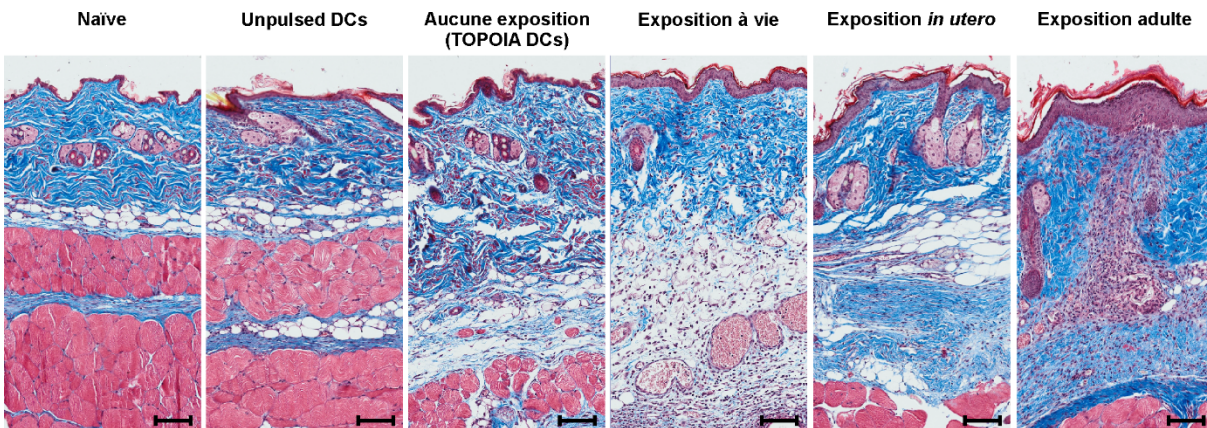
La fibrose cutanée étant une des caractéristiques principales pour l'évaluation de l'effet d'un traitement dans notre modèle murin de SSc, nous l'avons quantifiée chez ces souris à la semaine 12. Par manque de souris femelles dans les portées des couples reproducteurs exposés à la streptomycine et par la diminution du nombre de souris à cause de la séparation entre les semaines 10 et 12, seul le graphique pour les mâles est présenté. De plus, la fibrose cutanée de notre modèle expérimental est généralement observée chez les mâles.



**Figure 17. L'exposition à la streptomycine n'influence pas la fibrose cutanée à la semaine 12 dans notre modèle murin de SSc.**

La déposition de collagène dans des échantillons de peau prélevés à la semaine 12 chez les souris mâles a été examinée par la mesure de l'hydroxyproline. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes comprenant un total de n=11 « aucune exposition », n=12 « exposition à vie », n=11 « exposition *in utero* » et n=12 « exposition adulte ».

Aucune différence significative de niveaux d'hydroxyproline n'a été observée entre les différents groupes d'exposition à la streptomycine et le groupe de souris non traitées (**figure 17**).



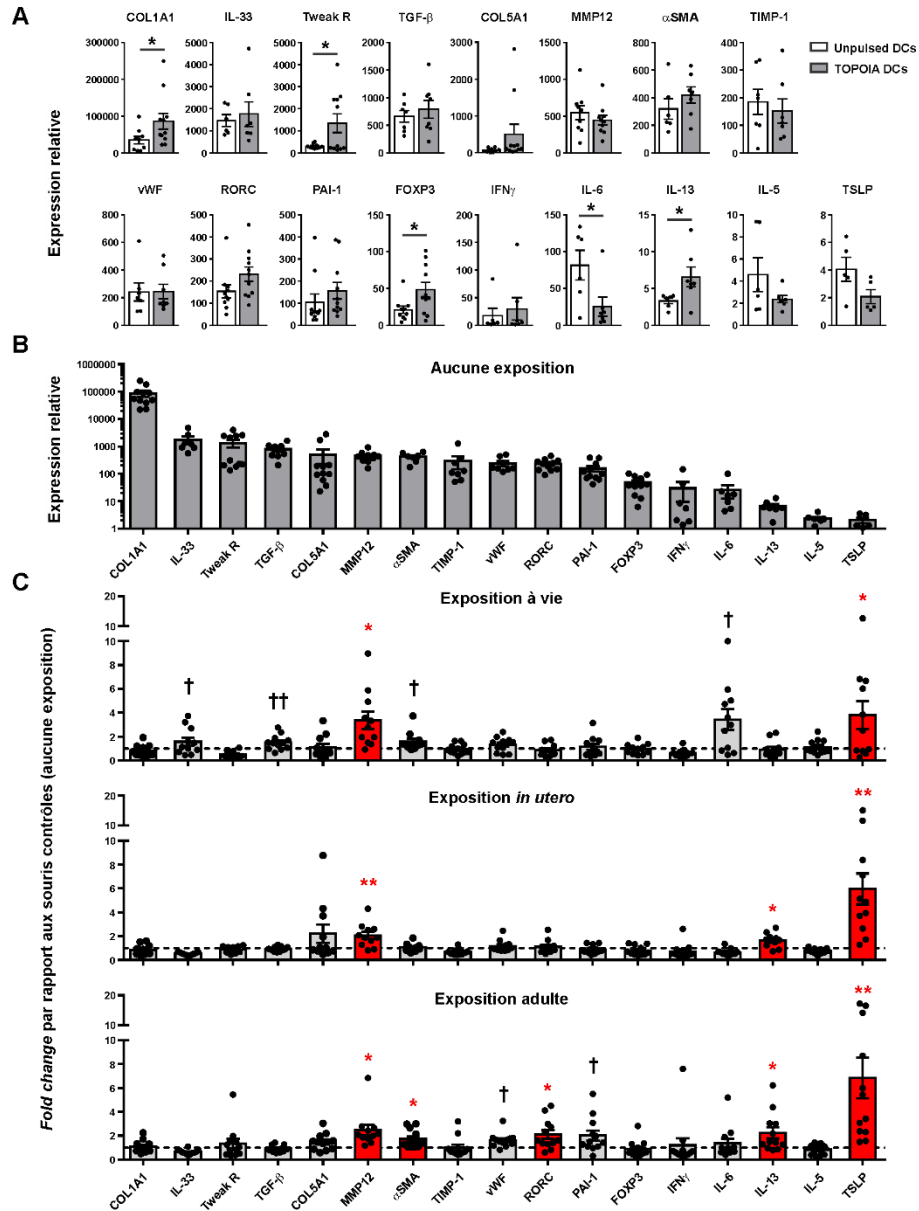
**Figure 18. Les expositions à vie, *in utero* et adulte à la streptomycine influencent l'inflammation cutanée à la semaine 12 chez les souris immunisées avec les « TOPOIA DCs ».**

La déposition de collagène et l'inflammation ont été évalués dans des échantillons de peau prélevés chez les souris mâles à la semaine 12 par la coloration de trichrome de Masson. L'échelle graphique mesure 100  $\mu\text{m}$ .

Par contre, l'analyse histologique à la semaine 12 a montré de l'inflammation cutanée chez les souris immunisées avec les « TOPOIA DCs » (**figure 18**) (manuscrit en révision). De plus, les souris traitées avec la streptomycine (expositions à vie, *in utero* et adulte) présentent davantage d'inflammation et une hyperplasie de l'épiderme (**figure 18**).

Nous voulions donc investiguer l'effet de la dysbiose sur la vasculopathie, l'inflammation et la fibrose au niveau cutané. Ainsi, nous avons étudié différentes cytokines de type Th1 (IFN $\gamma$ ), Th2 (IL-5, IL-6, IL-13, IL-33, TSLP) ou Th17 (IL-17, IL-22), des facteurs de transcription (RORC, FOXP3), des marqueurs vasculaires (vWF, PAI-1), ainsi que des protéines de la MEC (COL1A1, COL5A1) et plusieurs acteurs des processus de fibrose (Tweak-R, TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ SMA, TIMP-1, MMP12). Nous avons caractérisé le profil de ces différents gènes chez les souris immunisées avec les « TOPOIA DCs » (non traitées aux antibiotiques) et ensuite comparé les changements d'expression génique chez les souris immunisées avec les « TOPOIA DCs » et traitées avec la streptomycine.





**Figure 19.** Le protocole d'immunisation engendre un profil d'expression génique particulier au niveau cutané et l'exposition à la streptomycine à l'âge adulte augmente plusieurs marqueurs inflammatoires, vasculaires et fibrotiques chez les souris immunisées avec les « *TOPIOA DCs* ».

(A) Expression relative au niveau cutané de plusieurs gènes par rapport au gène de maintenance *Hprt* pour les groupes de souris immunisées avec des « *Unpulsed DCs* » ou « *TOPIOA DCs* ». (B) Comparaison de l'expression relative par rapport à *Hprt* de plusieurs gènes pour le groupe de souris non traitées (souris immunisées avec les « *TOPIOA DCs* »). (C) « *Fold change* » de l'expression génique de plusieurs gènes chez des souris exposées à la streptomycine par rapport au groupe de souris non traitées (ligne pointillée). \*  $p < 0.05$  en comparaison au groupe de souris non exposées (en rouge), †  $p < 0.05$  en comparaison aux autres

groupes de souris exposées à la streptomycine. Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne de deux expériences indépendantes comprenant un total de n=6 ou 10 « *Unpulsed DCs* », n=7 ou 11 « *TOPOIA DCs*, aucune exposition », n=11 « exposition à vie », n=11 « exposition *in utero* » et n=12 « exposition adulte ».

La similarité en termes de fibrose cutanée entre les groupes des souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » et traitées ou non à la streptomycine est renforcée à la **figure 19C**, par l'observation d'une expression génique très stable du gène codant pour le collagène de type I (chaîne alpha1, COL1A1). À la **figure 19A**, l'analyse du profil d'expression de plusieurs gènes montre que certains gènes sont spécifiquement surexprimés chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » en comparaison à celles immunisées avec les « *Unpulsed DCs* », plus précisément ceux du COL1A1 (\* p=0.0492), de Tweak-R (\* p=0.0319), du *Forkhead box P3* (FOXP3) (\* p=0.0279) et de l'IL-13 (\* p=0.035). De plus, on observe une diminution de l'expression spécifique pour le gène de l'IL-6 (\* p=0.0442). Finalement, les gènes d' $\alpha$ SMA et du récepteur orphelin C relié au récepteur de l'acide rétinoïque (RORC) présentent une tendance à la hausse, tandis que celui de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) présente une tendance à la baisse. À la **figure 19B**, l'expression relative des différents gènes étudiés indique que les gènes les plus exprimés sont ceux du COL1A1, de l'IL-33, de Tweak-R, du TGF- $\beta$ , et les moins exprimés sont ceux de l'IL-5 et du TSLP. À la **figure 19C**, nous avons analysé les gènes surexprimés dans différentes conditions d'exposition à la streptomycine en comparaison aux souris contrôles, c'est-à-dire aux souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » et non traitées aux antibiotiques. Dans le groupe de souris exposées « à vie », les gènes du MMP12 (\* p=0.0104) et du TSLP (\* p=0.038) sont surexprimés en comparaison aux souris non traitées. De plus, les gènes du TGF- $\beta$  (†† p=0.0089 et †† p=0.0085) et de l'IL-33 († p=0.0225 et † p=0.012) sont surexprimés en comparaison aux expositions adulte et *in utero*, respectivement. Les gènes de l'IL-6 († p=0.0283) et de l' $\alpha$ SMA († p=0.0233) le sont aussi lorsque comparés à l'exposition *in utero*. Dans le cas de l'exposition *in utero*, les gènes du MMP12 (\*\* p=0.0097), du TSLP (\*\* p=0.0034) et de l'IL-13 (\* p=0.0322) sont surexprimés en comparaison aux souris non traitées. L'exposition adulte induit quant à elle la surexpression des gènes du MMP12 (\* p=0.0142), du TSLP (\*\* p=0.0057), de l' $\alpha$ SMA (\* p=0.029), de RORC (\* p=0.0198) et de l'IL-13 (\* p=0.0402) en comparaison aux souris contrôles. De plus, les gènes de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) († p=0.0226) et du vWF († p=0.0225) sont surexprimés dans cette condition en comparaison à l'exposition *in utero*.

## Discussion

### Objectif 1 : Pertinence de l'évaluation de la persistance de la sclérodermie expérimentale

#### A. Observe-t-on une persistance de la maladie au niveau cutané dans notre modèle expérimental de SSc ?

La réponse est « oui ». Tel que démontré dans les **figures 2 et 3**, on observe de la fibrose cutanée à la semaine 18. De plus, celle-ci s'étend jusqu'à 18 mm du site d'injection. Ces résultats permettent de renforcer le concept d'une atteinte cutanée diffuse du modèle, soulignant sa persistance et son aspect systémique, observations allant dans le même sens que la maladie développée chez l'humain. Ces caractéristiques contrastent avec le modèle murin de fibrose induite par la bléomycine, qui engendre une fibrose sur un radius très limité et pour une durée beaucoup plus courte (84). La **figure 4**, qui présente une augmentation des cellules positives pour  $\alpha$ SMA chez le groupe de souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* », renforce aussi l'idée d'une maladie persistante, puisque l' $\alpha$ SMA est un marqueur des myofibroblastes, les effecteurs clés de la fibrose. Il s'avère important de mentionner que les niveaux d'autoAc anti-TOPOI ont aussi été mesurés dans le sérum de ces souris à la semaine 18, et des niveaux plus élevés ont été observés chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » ou les « *TOPOIB DCs* » en comparaison à celles immunisées avec les « *unpulsed DCs* » (**données non présentées**, manuscrit en révision).

#### B. La persistance au niveau cutanée est-elle aussi observée au niveau pulmonaire dans notre modèle ?

Ici aussi, la réponse est « oui ». Tel que démontré dans la **figure 5**, des cryosections de parenchyme pulmonaire de souris à la semaine 18 nous permettent d'observer une fibrose pulmonaire qui est moindre qu'à la semaine 12, mais toujours augmentée chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » en comparaison à celles immunisées avec les « *unpulsed DCs* ». Cette augmentation de fibrose pulmonaire est associée à une coloration intense pour  $\alpha$ SMA des régions entourant les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins, ainsi qu'à une augmentation des cellules positives pour  $\alpha$ SMA dans le parenchyme. À la **figure 6**, on observe un épaissement du septum alvéolaire qui pourrait être dû entre autres à la déposition de MEC, à l'oedème ou à l'hyperplasie des cellules épithéliales (85, 86).

Ces différents éléments soutiennent l'idée d'une atteinte pulmonaire persistante qui caractérise notre modèle et qui s'additionne à l'atteinte cutanée elle aussi prolongée. Globalement, il

est possible d'observer une fibrose pulmonaire avec un épaississement du septum alvéolaire, une fibrose cutanée diffuse et la présence d'autoAc anti-TOPOI dans le modèle et ce, jusqu'à huit semaines après la dernière immunisation (CFA+peptide), témoignant ainsi du caractère prolongé et persistant du modèle. En ce sens, notre modèle murin pourrait offrir une importante fenêtre d'opportunités pour investiguer de nouveaux traitements potentiels tout au long de cette maladie expérimentale. Les données présentées dans ce mémoire et d'autres données non présentées provenant du laboratoire d'accueil suggèrent que notre modèle associe fibrose persistante (aux niveaux cutané, pulmonaire et vasculaire) et vasculopathie, que cette fibrose est précédée d'inflammation, et enfin que ces lésions sont associées à des autoAc anti-TOPOI circulants. Globalement, ces données suggèrent que notre modèle est proche de la pathophysiologie de la SSc humaine (manuscrit en révision).

### C. Les modèles expérimentaux plus récemment décrits reproduisent-ils la SSc humaine ?

Pendant ma maîtrise, de nouveaux modèles murins de SSc ont été développés. Tout d'abord, il existe maintenant un modèle de souris présentant l'inactivation du gène du récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPAR). On observe chez ces dernières une augmentation des quantités de collagène, du nombre de myofibroblastes et de l'épaisseur du derme. Cette fibrose cutanée est accompagnée d'une apoptose des cellules endothéliales et de la perte de capillaires. Les poumons présentent une importante inflammation, une déposition de collagène et un épaississement du septum alvéolaire (93).

Ensuite, le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine a pris part à une étude révolutionnant la base même du modèle (94). Une mini-pompe osmotique permettant une administration systémique de la bléomycine, qui était précédemment administrée via instillation intratrachéale ou par voie orale, a été utilisée dans le but de potentiellement améliorer le modèle en ce qui a trait à sa ressemblance à la SSc humaine. Ce modèle de mini-pompe est présenté comme étant plus proche à la maladie chez l'humain. Tout d'abord, la fibrose pulmonaire est limitée à la région sous-pleurale des poumons. Ensuite, on observe une inflammation plutôt limitée et non pas disséminée à tous les lobes pulmonaires comme dans le modèle de bléomycine à instillation directe. De plus, on observe une présence élevée de cellules épithéliales alvéolaires de type II hypertrophiques. Ces différents éléments sont caractéristiques de la SSc-ILD. Finalement, la fibrose pulmonaire est accompagnée d'une fibrose cutanée (94).

Les souris déficientes pour le ligand-1 de la glycoprotéine sélectine P (PSGL-1) constituent un autre modèle plus récemment développé. Ces souris présentent des autoAc circulants (dont les anti-TOPOI), un ratio cellules T effectrices / cellules T régulatrices débalancé, des altérations vasculaires, une fibrose cutanée, ainsi que des anomalies fonctionnelles et structurelles aux niveaux des poumons et des reins (95). Par contre, les concentrations de PSGL-1 soluble sont plus élevées chez les patients atteints de SSc que chez les individus sains, et les concentrations élevées de PSGL-1 sont associées à une fréquence et une sévérité moindre de la fibrose pulmonaire (96).

Finalement, les souris auxquelles ont été transférés passivement des anticorps anti-récepteur de type A de l'endothéline (ET<sub>A</sub>R) ou bien anti-récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT<sub>1</sub>R) constituent d'autres modèles. Ces derniers présentent une vasculopathie oblitérante accompagnée d'une infiltration périvasculaire de lymphocytes. Ils sont intéressants pour étudier les rôles des autoAc anti-ET<sub>A</sub>R et anti-AT<sub>1</sub>R dans la pathogenèse de la SSc (97).

**Tableau III. Tableau résumé illustrant la présentation des caractéristiques principales de la SSc dans les modèles murins récents de cette maladie**

	Fibrose	Inflammation	AutoAc	Vasculopathie
uPAR KO	✓	✓		✓
Bléomycine (mini-pompe)	✓	✓	✓	
PSGL-1 KO	✓		✓	✓
Anticorps anti- ET <sub>A</sub> R ou anti-AT <sub>1</sub> R		✓		✓

Bien qu'intéressants, ces modèles plus récents, tout comme les précédents, sont incomplets, c'est-à-dire qu'ils ne récapitulent pas les quatre mécanismes pathophysiologiques principaux de la maladie. Ainsi, ils permettent d'étudier certains aspects de la pathophysiologie de la maladie, mais s'avèrent peu adéquats pour la mise à l'épreuve d'agents thérapeutiques potentiels. De plus, la persistance de ces différentes maladies expérimentales induites est soit non étudiée ou encore assez limitée. La SSc reste une maladie très complexe à répliquer chez la souris, non seulement à cause des différences entre l'humain et la souris, mais tout simplement à cause de son hétérogénéité et de sa complexité intrinsèque.

## Objectif 2 : Caractérisation de l'infiltrat inflammatoire

### A. La phase fibrotique est-elle précédée d'une phase inflammatoire ?

Tel qu'observé à la **figure 7**, on observe plusieurs cytokines dans l'explant pulmonaire à la semaine 10 des souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* », ce qui suggère l'existence d'une phase inflammatoire. Il est important de mentionner que d'autres données du laboratoire d'accueil (manuscrit en révision) ont permis la confirmation de ce concept. Ces données incluent une augmentation des infiltrats cellulaires dans le BALF et l'augmentation spécifique de l'expression de plusieurs cytokines au niveau des poumons (*ex-vivo*). Dans les cytokines présentées à la **figure 7**, seule l'IL-17A est augmentée spécifiquement chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* ». En observant sa présence élevée dans l'explant pulmonaire de souris à la semaine 10, l'IL-17A semble donc avoir un rôle important dans le développement de notre modèle expérimental de SSc.

L'IL-17A contribue à la fibrose cutanée dans d'autres modèles murins de SSc, c'est-à-dire dans le modèle de fibrose cutanée induite par la bléomycine et chez les souris Tsk. Au niveau pulmonaire, l'IL-17A a été identifiée comme contribuant à l'inflammation et à la fibrose pulmonaire induites par la bléomycine, l'IL-1 $\beta$  ou le silice (98-100). De plus, tel que mentionné précédemment, l'IL-17A joue un rôle important dans la SSc humaine. En effet, des niveaux augmentés de cette cytokine ont été mesurés dans le sang et les tissus atteints de patients et ce, durant les phases plus précoces de la SSc. Contrairement à ce qui est observé chez la souris, l'IL-17A semble exercer chez l'humain des effets pro-inflammatoires et anti-fibrotiques (6, 23, 101). Pour en revenir aux cytokines impliquées dans notre modèle murin, cette production d'IL-17A était presque indétectable à la semaine 12 (**figure 7**), ce qui corrobore fortement le concept d'une diminution de l'inflammation laissant graduellement place à la fibrose.

Les autres cytokines étudiées semblent aussi impliquées, mais non pas de façon spécifique au peptide. En effet, elles sont présentes à des niveaux équivalents d'un groupe à l'autre, incluant le groupe contrôle « *unpulsed DCs* ». Cela n'indique pas qu'elles ne sont pas importantes, puisque l'injection répétée de « *unpulsed DCs* » implique à elle seule une réponse immunitaire transitoire (102).

Fait intéressant, nous avons observé une tendance vers l'augmentation des niveaux de l'éotaxine. Celle-ci pourrait être en lien avec l'augmentation d'IL-17A considérant leur relation précédemment abordée, c'est-à-dire la production d'éotaxine par les cellules musculaires lisses des voies respiratoires en réponse à plusieurs cytokines dont l'IL-17A.

En ce qui a trait à l'IL-6, les niveaux diminuent à la semaine 12 chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » en comparaison à celles immunisées avec les « *unpulsed DCs* ». En fait, les niveaux chez les souris immunisées avec les « *unpulsed DCs* » ne changent pas, mais ceux chez les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » diminuent de la semaine 10 à la semaine 12, d'où l'observation de cette différence (**figure 7**). Étant donné sa présence, l'IL-6 pourrait donc être impliquée dans le modèle, mais de façon non spécifique au peptide. La **figure 7** suggère que le fait d'avoir plus d'IL-6 ne se traduit pas en augmentation de la sévérité de la maladie, puisque les souris immunisées avec les « *unpulsed DCs* » ont plus d'IL-6 dans leurs poumons à la semaine 12 et présentent une atteinte pulmonaire très faible. Ce niveau diminué d'IL-6 dans l'explant pulmonaire des souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » en comparaison aux souris contrôles est aussi observé au niveau de l'expression génique cutanée. En effet, l'expression du gène de l'IL-6 au niveau cutané est diminuée pour les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » en comparaison avec celles immunisées avec les « *unpulsed DCs* » (**figure 19A**).

Un profil d'expression génique au niveau cutané a été établi pour notre modèle à la semaine 12. Ce dernier présente de la fibrose qui est illustrée par la surexpression spécifique de COL1A1 et de Tweak-R, une nouvelle cible potentielle dont l'expression est élevée dans la peau de patients atteints de SSc en stade fibroprolifératif (49). De plus, on remarque une inflammation cutanée caractérisée par une surexpression spécifique d'IL-13, un autre élément observé chez les patients. Le gène de FOXP3 est un gène clé qui contrôle la fonction des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ (103) et qui est également surexprimé dans notre modèle expérimental (**figure 19A**). Cela n'implique pas nécessairement une plus grande immunosuppression. En effet, ces souris pourraient être dans une situation paradoxale semblable aux patients. Bien que la fréquence des cellules T régulatrices CD4+CD25+FOXP3+ soit augmentée chez les patients, la capacité immunosuppressive de ces derniers est diminuée, notamment en raison d'une déficience fonctionnelle de ces cellules T régulatrices (23, 104).

De plus, il est intéressant de mentionner que l'expression du gène de l'IL-4 est indétectable dans nos échantillons et que celle du gène de l'IL-5 est très faible, ce qui écarte l'idée que nous avons développé un modèle de dermatite atopique (105). C'est aussi le cas pour l'IL-22 et l'IL-17A, qui sont détectés dans 8/14 et 13/14 souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* », respectivement, ce qui rend peu probable le développement d'un modèle apparent au psoriasis (106).

Un autre élément intéressant est l'observation d'une tendance à la hausse de l'expression du gène de RORC, qui code pour la protéine ROR $\gamma$ . Cette dernière, plus spécifiquement son isoforme ROR $\gamma$ t, joue un rôle essentiel dans la différenciation de cellules T CD4+ naïves en cellules Th17 produisant de l'IL-17A et constitue un régulateur clé des cellules lymphoïdes innées du groupe 3 (ILC3). En ce sens, l'expression de ce gène joue un rôle critique dans la régulation des réponses inflammatoires (107, 108).

Nous avons aussi observé une tendance à la hausse de l'expression du gène codant pour PAI-1. Ce dernier est l'inhibiteur primaire des activateurs du plasminogène. Il s'agit d'une protéine multifonctionnelle qui est non seulement impliquée dans la régulation physiologique de la fibrinolyse et de la migration cellulaire, mais qui est aussi associée avec plusieurs conditions pathologiques aiguës et chroniques. Elle est généralement présente dans la circulation à des bas niveaux et son augmentation est associée de façon importante à différentes conditions comme le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires et la fibrose caractéristique de la SSc. De plus, des niveaux locaux ou systémiques augmentés de PAI-1 ne sont pas seulement un marqueur pathologique, mais peuvent aussi participer à l'apparition ou l'exacerbation de certaines conditions telles que la thrombose, l'athérosclérose et la fibrose tissulaire (109, 110).

En résumé, nos données, particulièrement en ce qui a trait à l'IL-17A, corroborent le concept d'une phase inflammatoire qui diminue avec le temps pour laisser graduellement place à la fibrose.

## B. La cytokine TGF- $\beta$ joue-t-elle un rôle dans le modèle ?

Le TGF- $\beta$  est une des cytokines clés dans le développement de la fibrose et s'avère donc primordiale à analyser (111). Toutefois, la signature TGF- $\beta$  est caractéristique d'un sous-groupe particulier de malades atteints de SSc (48, 112).

Cette hétérogénéité des voies fibrotiques est en quelque sorte illustrée par les divers modèles de SSc. En effet, certains modèles murins de SSc sont associés à des niveaux augmentés de TGF- $\beta$ 1, notamment les modèles de la bléomycine et du Scl-GVHD (113, 114). Cependant, plusieurs autres modèles induits et génétiques ne présentent aucune augmentation de TGF- $\beta$  (68, 115). Notre modèle s'inscrit dans cette seconde catégorie. En effet, tel que présenté à la **figure 8**, aucun des isoformes de TGF- $\beta$  actif n'est spécifiquement augmenté dans notre modèle, que ce soit au niveau pulmonaire ou systémique. Il n'y a pas non plus de surexpression spécifique de TGF- $\beta$  dans la peau des souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » en comparaison à celles immunisées avec les « *unpulsed DCs* »



(**figure 19A**). Toutefois, tel qu'il a été démontré précédemment, on observe par immunohistochimie une régulation positive d' $\alpha$ SMA au niveau des poumons et de la peau des souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* », ainsi qu'une tendance à la hausse de l'expression au niveau cutané du gène d' $\alpha$ SMA. Comme il est connu que TGF- $\beta$  est associé à la régulation d' $\alpha$ SMA, ceci suggère une implication des voies de signalisation de TGF- $\beta$  dans notre modèle.

Finalement, l'expression protéique des différents isoformes de TGF- $\beta$  reste stable de la semaine 10 à la semaine 12 et diminue à la semaine 18 dans le BALF et l'explant de poumons (**figure 8**). Ces observations soutiennent le concept que la fibrose pulmonaire atteint son maximum à la semaine 12 et diminue à la semaine 18.

### Objectif 3 : Traitement par le dabigatran

#### A. Quelles sont les cibles directes et indirectes du dabigatran ?

Tel que mentionné précédemment, le dabigatran est un inhibiteur de la thrombine. Diverses études ont impliqué le système de coagulation, en particulier la thrombine, dans la pathogenèse de la SSc-ILD. En effet, la thrombine est une sérine protéase pouvant moduler les réponses de réparation tissulaire en altérant la perméabilité vasculaire, en stimulant la migration des neutrophiles et des fibroblastes, et en promouvant l'adhésion, ainsi que l'étalement des cellules endothéliales et des fibroblastes. La thrombine active des types cellulaires variés et induit la sécrétion de plusieurs facteurs pro-immunitaires et pro-fibrotiques. Elle promeut la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes résistants à l'apoptose et induit l'angiogenèse en promouvant la migration et la prolifération des cellules endothéliales (1, 74). La thrombine peut additionnellement mener à la fibrose via la protéine Egr-1 ayant été abordée précédemment (voir Processus de fibrose à la section Introduction) (50).

La thrombine présente aussi des effets sur l'inflammation et la fibroprolifération via PAR-1. Les PARs sont présents sur une variété de types cellulaires, notamment les différents leucocytes, les plaquettes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires. PAR-1 est un récepteur majeur de signalisation profibrotique et il joue un rôle important dans le cadre de la SSc-ILD. En effet, l'activation de ce récepteur entraîne l'activation des cellules endothéliales et des fibroblastes, menant à la production de PDGF, ainsi que de MMP1, MMP3 et MMP9. Cette activation est suivie de la formation d'autoAc pathogéniques, résultat des effets sur l'immunité adaptative. De plus, l'activation de PAR-1 par la thrombine peut contribuer à l'insulte tissulaire en induisant l'activation des lymphocytes T inflammatoires et en modulant la réponse Th1/Th2 vers un profil Th2 pathogénique. Finalement, cette activation peut aussi induire TGF- $\beta$ 1 et CTGF, ce qui stimule indirectement la production d'autoAc et l'adoption d'un profil Th2. Toutes ces évidences montrent que la thrombine est impliquée dans le développement et la progression de la fibrose pulmonaire (74).

De plus, la thrombine promeut l'activation plaquettaire. Ainsi, chez les patients atteints de SSc, on observe une cascade de coagulation dérégulée et une activation plaquettaire renforcée (12). Ces plaquettes sont non seulement des médiateurs cellulaires de la thrombose, mais sont aussi considérées comme des cellules immunitaires qui initient et accélèrent plusieurs conditions vasculaires inflammatoires (116). Par exemple, ces plaquettes sont la source principale de CXCL4 (117), cytokine

importante ayant été abordée précédemment. Outre cette induction indirecte via l'activation plaquettaire, la thrombine induit la production de CXCL4 par des monocytes activés chez l'humain et ce, à travers les PARs (118). Réciproquement, le CXCL4 favorise la différenciation de monocytes en macrophages pro-fibrotiques potentiels (119). Il est intéressant de mentionner que l'injection de cette chimiokine pro-inflammatoire chez la souris induit de l'inflammation, mais pas de fibrose (31). La thrombine et le CXCL4 sont tous deux augmentés dans le BALF des patients atteints de SSc (120, 121) et semblent donc jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie.

Finalement, la délétion de PAR-1 chez les souris du modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine a montré une atténuation de cette fibrose (122), suggérant la possibilité d'un traitement via cette voie de « coagulation-inflammation ».

La thrombine apparaît donc comme la cible par excellence, non seulement car elle est directement en amont de PAR-1 et donc de divers processus pathogéniques, mais aussi parce qu'elle est en lien avec le CXCL4, une molécule clé de la SSc ayant été observée en quantités augmentées dans l'explant de poumons de notre modèle murin.

Il a été démontré que le dabigatran inhibe la signalisation profibrotique qui est médiée par PAR-1 en réponse à la thrombine (74) et diminue ainsi la production de collagène induite par la thrombine chez les fibroblastes de poumons sains ou provenant des poumons de patients atteints de SSc. Il bloque aussi le développement du phénotype myofibroblastique de fibroblastes provenant de poumons sains et activés par la thrombine. Il va même jusqu'à inverser ce phénotype exprimé par les fibroblastes pulmonaires provenant de patients atteints d'ILD dans le contexte de leur SSc (123), suggérant une interférence du dabigatran au niveau des processus menant à la fibrose, ce qui va en ligne avec l'idée d'un possible traitement par le blocage des actions de la thrombine.

#### **B. Le traitement au dabigatran a-t-il un effet sur le développement de la maladie dans notre modèle expérimental ?**

En suivant le principe que l'inflammation précède la fibrose, nous espérons améliorer la situation grâce au traitement précoce. L'idée était d'agir sur l'inflammation au stade initial de son développement et ainsi possiblement d'empêcher, voire de prévenir, le développement d'une fibrose systémique importante ou du moins de tempérer cette réponse réparatrice (pathologique) exagérée, soit en diminuant son niveau ou en ralentissant son développement. Dans le cas du traitement tardif et en suivant le même principe, nous nous attendions à n'observer aucune amélioration de la maladie.

Chez la souris, le dabigatran a déjà été à l'étude dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et a démontré son utilité dans ce dernier. En effet, une atténuation de la fibrose a été observée en réponse à un traitement préventif ainsi qu'en réponse à un traitement thérapeutique (81). Récemment, un groupe de recherche a évalué la neutralisation de PAI-1 par des anticorps dans les modèles murins de GVHD et de fibrose cutanée induite par la bléomycine administrée par une mini-pompe. Il s'agit ici d'une neutralisation sélective pour bloquer la liaison du PAI-1 à l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et à l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Cette neutralisation a mené à une amélioration de la situation clinique, à une résolution de la vasculopathie, à une baisse de l'inflammation, ainsi qu'à une réduction des régulateurs de la fibrinolyse et des marqueurs de dommages vasculaires (124). Cette étude montre que l'exacerbation de la fibrinolyse aide d'une certaine manière à la résolution de la fibrose cutanée. On accorde dans ces situations particulières un rôle négatif au système de coagulation. De ce point de vue très général, le dabigatran, étant un composé anti-coagulant, aurait dû selon notre hypothèse de travail améliorer la situation. Toutefois, l'effet du traitement au dabigatran s'est avéré bien différent.

En effet, tel que présenté aux **figures 10 et 13**, le dabigatran donné de façon précoce aggrave la maladie, tandis que le dabigatran administré plus tard ne présente aucun effet protecteur. En effet, on observe une plus grande déposition de collagène au niveau des poumons et de la peau pour le traitement précoce, alors que le traitement plus tardif ne présente aucune différence significative avec les souris non traitées. De plus, il est possible d'observer une plus importante infiltration de cellules inflammatoires dans ces tissus atteints. Contrairement à notre hypothèse, le dabigatran administré pendant la phase inflammatoire (traitement précoce) a donc un effet négatif, aggravateur sur la maladie. Le dabigatran donné lors de cette phase semble exacerber l'inflammation, qui évoluera vers une fibrose plus sévère.

### C. Comment expliquer l'effet paradoxal du dabigatran sur le modèle à l'étude ?

L'effet du dabigatran sur le développement de la SSc expérimentale est bien différent de ce à quoi nous nous attendions. En effet, les effets anti-inflammatoires du dabigatran semblent ici être remplacés par des effets pro-inflammatoires. Plusieurs explications mécanistiques potentielles sont discutées ci-bas, à savoir :

- la possibilité d'un « effet cage »,
- le rôle possible de l'IL-17A,
- le CXCL4,
- les différences d'un modèle à l'autre,
- l'étude de la thrombine,
- l'effet biphasique du dabigatran,
- la pharmacologie du dabigatran.

Certaines études ont montré que la cohabitation de souris avec des partenaires de cage malades influence des paramètres comportementaux et physiologiques chez ces souris, par exemple la réponse inflammatoire (125, 126). Ce phénomène est nommé « effet cage ». La possibilité d'un rôle joué par cet « effet cage » dans l'aggravation de la maladie a été écartée par l'obtention des mêmes résultats pour des souris immunisées aux « *TOPOIA DCs* » qui cohabitent avec celles immunisées aux « *unpulsed DCs* » et des souris immunisées aux « *TOPOIA DCs* » élevées dans des cages séparées (seulement « *TOPOIA DCs* ») (**figure 10**).

Bien qu'apparaissant comme primordiale dans le développement de notre modèle murin, l'IL-17A n'est pas impliquée dans l'aggravation de cette maladie, puisque ses niveaux sont très stables d'une condition à l'autre (**figure 11**). Toutefois, la détection d'IL-17A dans notre modèle et son maintien sont possiblement très importants pour l'aggravation de la maladie.

Autre élément intéressant, le CXCL4 est diminué à la semaine 12 pour les souris traitées au dabigatran à une fenêtre temporelle plus précoce en comparaison aux souris non traitées (**données non présentées**). Le CXCL4 est considéré comme un marqueur précoce de l'atteinte pulmonaire, puis il diminue par la suite. Dans le cas du traitement précoce, il aurait déjà diminué à la semaine 12. Cette baisse précoce de CXCL4 pourrait possiblement entrer en corrélation avec la progression de la maladie et donc représenter une indication de la sévérité de cette dernière.

Il est important de garder en tête que l'atteinte pulmonaire caractérisant les modèles dans lesquels le dabigatran a été étudié est bien différente de celle observée dans notre modèle. Par exemple, l'instillation de bléomycine induit des lésions pulmonaires aiguës, tandis que notre modèle présente un développement progressif lié au système immunitaire et démontre un caractère chronique. D'un point de vue plus spécifique, les voies de signalisation et les cytokines impliquées diffèrent également d'un modèle à l'autre. Ces différences entre les modèles pourraient partiellement expliquer nos observations.

Le système de coagulation comprend un grand nombre de facteurs jouant leurs rôles de façon simultanée et ce, à plusieurs endroits dans l'arbre vasculaire. L'augmentation des niveaux de thrombine dans l'explant pulmonaire chez les souris non traitées en comparaison aux souris naïves observée à la **figure 12** témoigne du statut pro-coagulant des poumons. Il est très surprenant de constater que les niveaux de thrombine ne sont pas diminués au niveau local lors de l'administration d'un composé anti-thrombine au niveau systémique. Ils sont même plutôt augmentés (**figure 12**), comme si l'on avait *stimulé* la production de thrombine dans le compartiment pulmonaire avec le traitement anti-coagulant. C'est cette augmentation de la thrombine qui peut en partie expliquer, selon nous, l'aggravation de la maladie dans le groupe « traitement précoce ». Ce concept va dans le même sens que les données théoriques et les autres études sur le sujet (74). Élément intéressant, l'augmentation des niveaux de thrombine entraînée par l'administration d'inhibiteurs directs de la thrombine (entre autres le dabigatran) à « faibles doses » est un phénomène ayant déjà été observé. Cela n'est toutefois pas observé pour des inhibiteurs du facteur Xa (127). Dans notre étude, la concentration locale pulmonaire pourrait être plus basse et engendrer cet effet hypercoagulant.

Toutefois, pourquoi le traitement tardif n'entraîne-t-il pas une aggravation ? Tout d'abord, la fenêtre d'administration du dabigatran, c'est-à-dire la phase inflammatoire ou la phase fibrotique, semble être un déterminant important dans l'effet du traitement. Ensuite, bien que constituant un élément secondaire, la durée du traitement pourrait expliquer une partie de cette différence, puisque le traitement tardif s'étale sur cinq semaines au lieu de sept semaines. Il faut toutefois garder en tête que ce traitement aggrave l'inflammation pulmonaire et cutanée, élément probablement dû au dabigatran lui-même. À ce sujet, une étude comparative entre le dabigatran et le rivaroxaban a démontré un effet biphasique du dabigatran. En effet, lorsqu'administré à doses relativement plus « faibles » (mais adéquate sur le plan clinique, comme celle utilisée dans notre étude), ce composé augmente, au niveau des cellules endothéliales, l'expression génique de plusieurs marqueurs pro-

inflammatoires tels que CXCL2, IL-8, MCP-1 et le facteur tissulaire. Cet effet s'estompe à plus fortes doses, mais le risque de saignement augmente. Le rivaroxaban, un inhibiteur du facteur Xa, ne présente pas cet effet biphasique (128).

Une étude sur un modèle murin d'asthme a montré un effet limité du dabigatran dans l'amélioration de la pathologie pulmonaire (82). Dans cette étude, bien que le taux ait été adéquat dans le sang, le niveau de dabigatran était diminué dans les poumons possiblement à cause d'une fuite de protéines dans l'espace alvéolaire (82). Ce phénomène pourrait expliquer en partie les observations dans notre modèle et par le fait même, l'aggravation de la maladie. Une élimination trop rapide et/ou une concentration locale inefficace pourraient peut-être expliquer l'absence de modulation au niveau local. L'utilisation de souris KO pour la thrombine serait une approche pour contrer cela, mais ces dernières sont non viables à cause de l'absence d'une voie secondaire à la thrombine, contrairement au PAI-1 par exemple, auquel on peut associer l'alpha 2-antiplasmine (129, 130).

En conclusion, la localisation *in vivo* de l'inhibition de la thrombine par le dabigatran est un élément crucial dans le développement de la maladie et il est possible que la voie orale ne soit pas idéale pour obtenir un effet anti-coagulant au niveau pulmonaire. La voie intratrachéale serait en ce sens une alternative intéressante chez la souris.

#### D. Le dabigatran est-il un nouvel agent thérapeutique potentiel pour la SSc humaine ?

Il y a présentement une étude clinique ayant pour objectif de s'assurer de l'innocuité de l'utilisation du dabigatran dans une cohorte de patients atteints de SSc (*National Clinical Trial # : NCT02426229*; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02426229>), d'où la nécessité de considérer les effets du dabigatran dans différents modèles expérimentaux.

Selon nos résultats, le dabigatran ne semble pas être un agent prometteur pour stabiliser, améliorer ou guérir la SSc. Évidemment, il est difficile de faire la transition souris/humain et les résultats doivent donc être pris avec un certain recul. Notre étude doit plutôt s'ajouter au groupe d'études sur le sujet, par exemple avec le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Nous formulons l'hypothèse que le dabigatran ne sera peut-être pas le traitement de choix et surtout que la prudence est de mise. Il faut porter une attention particulière à la localisation de l'effet du dabigatran et donc de la thrombine active disponible. En effet, une diminution de la thrombine peut s'avérer bénéfique, tel que discuté, mais une stimulation de la coagulation au niveau local pourrait être néfaste.

## Objectif 4 : Manipulation du microbiote intestinal par la streptomycine

### A. Comment le microbiote intestinal peut-il influencer le développement des maladies auto-immunes ?

Différentes populations bactériennes du microbiote peuvent exercer leurs effets sur différents types de cellules et induire des réponses immunitaires variées. Ainsi, la composition de ce microbiote peut avoir une influence déterminante sur la réponse immunitaire. D'un point de vue très surprenant, certaines bactéries commensales de l'intestin peuvent affecter le développement de maladies dans des organes éloignés de l'intestin et peuvent avoir des effets diamétralement opposés selon le contexte et les organes impliqués, c'est-à-dire une induction et exacerbation ou bien une inhibition et protection (131).

Différents mécanismes impliqués dans l'auto-immunité pourraient être affectés ou utilisés par les bactéries commensales de l'intestin. Tout d'abord, celles-ci peuvent utiliser le mimétisme moléculaire, c'est-à-dire le partage d'épitopes communs avec des antigènes du soi. Dans ce contexte, les bactéries intestinales peuvent être associées au déclenchement ou à l'exacerbation de maladies auto-immunes dans un organe distal. Ensuite, il y a un mécanisme connu sous le nom de « *bystander activation* ». Il s'agit d'un phénomène d'activation non-spécifique (absence de stimulation du TCR) de cellules T autoréactives en réponse à des antigènes étrangers. Ce phénomène pourrait lui aussi jouer un rôle dans le déclenchement de maladies auto-immunes. Finalement, certaines lignées de bactéries commensales ont une capacité à induire la production de cytokines via l'activation de cellules présentatrices d'antigène ou d'ILCs. Ces cytokines peuvent amplifier l'auto-immunité, notamment en ciblant les cellules T autoréactives ainsi qu'en réduisant l'efficacité des cellules régulatrices (76). Par exemple, les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) stimulent la génération de réponses en lymphocytes T de type Th17. Ces cellules Th17 sont nécessaires pour la défense contre certains types de pathogènes, mais peuvent également contribuer à l'auto-immunité. En ce sens, un microbiote favorisant la présence de SFB pourrait avoir un impact sur la réponse immunitaire et par le fait même sur le développement de maladies auto-immunes médiées par Th17, notamment chez des individus génétiquement susceptibles (131). C'est donc la création d'un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal qui entraîne alors la surreprésentation d'espèces bactériennes néfastes ou la sous-représentation d'espèces bénéfiques à une situation donnée, phénomènes menant à l'exacerbation de l'auto-immunité.



Tel que mentionné précédemment, un rôle protecteur de la manipulation du microbiote intestinal a aussi été associé au développement de l'auto-immunité (132). Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer cette « conversation » entre l'hôte et le microbiote qui mène à une protection. Le consensus actuel est que le microbiote est généralement dans une relation d'homéostasie avec l'hôte et que la maladie progresse indépendamment de ce microbiote. Tout d'abord, l'hypothèse de la « lignée spécifique » prédit que si une lignée bactérienne s'expand, elle bloque le développement de l'auto-immunité en supprimant les réponses inflammatoires de l'hôte, pour ainsi améliorer ses chances de rester dans cet état d'expansion. L'apaisement de l'auto-immunité est donc l'effet secondaire d'un réflexe de survie. Ensuite, l'hypothèse du « signal équilibré » prédit que les interactions de l'hôte avec son microbiote sont indépendantes de la composition précise de ce microbiote et que c'est plutôt la génétique de l'hôte qui joue un rôle critique dans cette conversation. Cette hypothèse implique un équilibre entre la réponse de l'hôte envers les bactéries commensales et l'effort que ces dernières mettent à réduire cette réponse. C'est l'incapacité de l'hôte à contrôler le microbiote adéquatement qui engendre une dominance de la signalisation négative fournie par le microbiote et donc une réduction de l'auto-immunité (76). On voit donc que plusieurs phénomènes et hypothèses mécanistiques peuvent expliquer le lien entre un hôte et son microbiote dans l'exacerbation ou l'amélioration de plusieurs conditions. L'existence même de ce lien et l'ensemble des études sur le sujet mènent à croire au potentiel thérapeutique de la manipulation du microbiote.

La dysbiose en réponse à la streptomycine a déjà été étudiée dans des modèles murins d'asthme (91), de diabète de type 1 (133) et de pneumopathie immunologique (134). Ces différentes études ont présenté des résultats variables selon la maladie étudiée. Pour le modèle d'asthme, la dysbiose induite par la streptomycine n'a pas eu d'effet sur la maladie et ce, en suivant les expositions à vie ou adulte (91). Pour ce qui est du diabète de type 1, l'incidence a augmenté chez les mâles suite au traitement, mais il est important de mentionner que la streptomycine a été jumelée à l'ampicilline et la colistine, rendant difficile l'analyse de l'apport de la streptomycine dans cette aggravation (133). Dans le cas de la pneumopathie immunologique, maladie médiée par les lymphocytes Th1/Th17, la dysbiose induite par la streptomycine a entraîné une augmentation radicale de la sévérité de la maladie (134).

## B. Les modifications du microbiote intestinal ont-elles un effet sur le développement de la SSc expérimentale ?

Nous souhaitons aggraver la maladie expérimentale pour ainsi possiblement raccourcir le temps nécessaire à son développement chez les souris et mieux examiner de nouvelles approches thérapeutiques. Les résultats attendus étaient toutefois très difficiles à prévoir, étant donné l'absence d'études sur l'influence de la dysbiose sur la SSc et les résultats variables obtenus dans les quelques études concernant la dysbiose induite par la streptomycine et les maladies auto-immunes.

L'exposition à la streptomycine a effectivement aggravé la maladie dans notre modèle expérimental. Toutefois, il est important de mentionner que le moment de l'exposition à l'antibiotique est une variable cruciale dans la mise en place de cet effet. Tel que démontré à la **figure 15**, la fibrose pulmonaire est augmentée de façon importante lors de l'exposition à vie à la streptomycine, augmentée lors de l'exposition *in utero* (qui est arrêtée avant la période d'immunisation) et non modifiée pour l'exposition adulte. Ces résultats appuient le rôle particulier du microbiote intestinal au début de la vie (périodes *in utero* et néonatale) dans le développement de l'atteinte pulmonaire de la maladie. Selon nos résultats et en accord avec la littérature (90), il y aurait, à cette période de la vie, un « *cross-talk* » important entre le microbiote intestinal et les processus inflammatoires impliqués dans l'atteinte pulmonaire.

L'IL-17A pulmonaire, cytokine importante dans notre modèle expérimental, a été étudiée et reste stable aux différents temps d'exposition à la streptomycine en comparaison aux souris non traitées (**figure 16**). Toutefois, la source de cet IL-17A est modifiée en réponse à la dysbiose. L'IL-17A est principalement produite par les cellules CD4<sup>+</sup> Th17 chez les souris non traitées, alors que les cellules T de type  $\gamma\delta$  produisant de l'IL-17A (principaux producteurs) au niveau intra-cytoplasmique (culture *ex-vivo* de cellules de poumons) prédominent chez les souris traitées à la streptomycine (**données non présentées**). Nos résultats contredisent une étude de dysbiose à la streptomycine dans un modèle de fibrose kystique (135). En effet, une diminution des lymphocytes T de type  $\gamma\delta$  produisant de l'IL-17 a été observée dans leur modèle en réponse à un traitement à la streptomycine. Toutefois, il faut souligner que la streptomycine semble augmenter les cellules T de type  $\gamma\delta$  chez les souris de type sauvage (135). Le contexte semble donc fortement lié à l'effet du traitement à l'antibiotique.

Il est important de mentionner que le CXCL4, chimiokine abordée précédemment, n'est pas modulée par la dysbiose induite par la streptomycine et ce, peu importe le moment d'exposition (**données non présentées**).

### C. Comment la dysbiose modifie-t-elle l'atteinte cutanée ?

Au niveau de la peau, la fibrose demeure stable peu importe le moment ou la durée de l'exposition à la streptomycine (**figure 17**). La dysbiose induite par cet antibiotique ne semble donc pas affecter la fibrose cutanée observée à la semaine 12 dans notre modèle expérimental. Ces mesures d'hydroxyproline sont renforcées par l'expression stable de certains gènes codant pour des protéines appartenant à la matrice extracellulaire, c'est-à-dire le COL1A1 et le collagène de type V (chaîne alpha1, COL5A1) (**figure 19C**). Toutefois, l'importante surexpression de plusieurs gènes (**figure 19C**) témoigne de la présence d'une réponse inflammatoire altérée en réponse à la dysbiose.

L'expression des gènes de MMP12 et TSLP est augmentée pour toutes les expositions à la streptomycine. Les niveaux de MMP12 sont plus élevés chez les patients atteints de SSc que chez les sujets sains, et sont associés avec la sévérité de l'atteinte cutanée, de la fibrose pulmonaire et des dommages vasculaires périphériques (136). Le TSLP joue un rôle important pour orchestrer la réponse initiale à une insulte épithéliale. Le TSLP maintient l'homéostasie de type Th2 au niveau des barrières et une dérégulation de l'expression de TSLP peut ainsi mener au développement de réponses inflammatoires de type 2 (137). Il est intéressant de noter que le microbiote limite l'expression de TSLP dans un contexte d'atteinte cutanée. En effet, l'exacerbation du TSLP chez des souris axéniques ayant une barrière cutanée défectueuse a été démontrée (138). Une autre étude a démontré que le TSLP est hautement exprimé dans la peau des patients atteints de dcSSc et que ce TSLP interagit de façon complexe avec deux autres cytokines pro-fibrotiques, le TGF- $\beta$  et l'IL-13, ce qui suggère qu'il pourrait promouvoir la fibrose de la SSc de façon directe, ou bien indirectement en stimulant des gènes pro-fibrotiques ou la production de ces cytokines (139). Globalement, les souris ayant été exposées à la streptomycine présentent une déviation vers cet axe TSLP/IL-13/TGF- $\beta$ . De manière intéressante, bien que le gène du TSLP soit surexprimé lors de l'exposition à l'antibiotique, nous n'avons pas observé d'augmentation de la réponse Th2. En effet, les niveaux d'expression du gène de l'IL-5 restent très stables et l'expression du gène de l'IL-4 demeure indétectable pour toutes les conditions (**figure 19C**).

Encore une fois, l'aspect temporel de l'exposition à la streptomycine apparaît comme un élément déterminant dans l'effet qu'aura cette dysbiose sur la maladie expérimentale. Toutefois, dans le cas de l'atteinte cutanée et contrairement à l'atteinte pulmonaire, la période critique d'exposition à l'antibiotique semble être l'âge adulte. En effet, le groupe de souris ayant été exposées à la streptomycine pendant la période adulte est le seul à présenter une surexpression spécifique de plusieurs gènes abordés précédemment tels que ceux de l' $\alpha$ SMA, de RORC, du vWF et de PAI-1 (**figure**

**19C).** L'inflammation (IL-13, TSLP, RORC) et la vasculopathie (vWF, MMP12, PAI-1) exacerbées par l'exposition à l'âge adulte apparaissent comme étant les plus sévères et pourraient bien se transformer en fibrose cutanée importante ultérieurement. La surexpression d' $\alpha$ SMA, une protéine associée à la fibroprolifération, est aussi un indice de cette possible transition.

En comparaison à cette exposition à l'âge adulte, l'exposition *in utero* entraîne une altération inflammatoire plutôt légère. Mis-à-part MMP12 et TSLP, seul l'IL-13 est surexprimé en comparaison aux souris non traitées (**figure 19C**), une surexpression qui est observée pour l'exposition adulte également. On associe donc cette surexpression de l'IL-13 à une dysbiose induite par l'antibiothérapie à n'importe quel moment de la vie des souris.

Bien que nous nous attendions à un profil d'expression plus sévère lors du traitement par l'antibiotique de la période fœtale jusqu'au moment du sacrifice, les souris exposées « à vie » démontrent un profil intermédiaire se situant entre les deux autres groupes. En ce sens, nous concluons que la période adulte est bel et bien néfaste, mais que la dysbiose pendant les périodes *in utero* et néonatale présente un effet qui est moins relié aux manifestations cutanées. De plus, on observe chez ces souris un profil d'expression génique différent, c'est-à-dire IL-6, IL-33,  $\alpha$ SMA et TGF- $\beta$  (**figure 19C**). Nous pourrions émettre l'hypothèse que ces souris développeront elles aussi de la fibrose cutanée ultérieurement.

En conclusion, nos résultats montrent que les différentes durées d'expositions à l'antibiotique induisent des changements de composition du microbiote qui leur sont communs tandis que d'autres changements sont restreints. Globalement, il est possible d'observer que la dysbiose induite par la streptomycine pendant les périodes *in utero* et néonatale est critique dans l'aggravation de la fibrose pulmonaire. Au niveau de l'atteinte cutanée, c'est plutôt la période adulte qui est déterminante pour une aggravation. Pour expliquer les différences plus spécifiques entre les différentes expositions et pour mieux comprendre les changements menant à l'aggravation de la maladie, notre prochaine étape a été d'étudier le microbiote intestinal de ces souris.

#### D. Peut-on expliquer l'effet d'une dysbiose induite par une exposition à la streptomycine sur la maladie expérimentale en analysant la composition du microbiote ?

Les microbiotes murins et humains sont tous deux dominés par des bactéries appartenant aux embranchements *Bacteroidetes* et *Firmicutes* (et à un moindre degré *Proteobacteria*, *Deferribacteres*, *Actinobacteria* et *Fusobacteria*). L'analyse du microbiote a été réalisée chez nos souris et les données

présentées sont préliminaires. Tout d'abord, le protocole d'immunisation n'a pas d'effet sur la diversité bactérienne du microbiote intestinal. Il n'y a pas non plus de changement majeur dans la composition du microbiote entre les souris immunisées avec les « *TOPOIA DCs* » en comparaison à celles immunisées avec les « *unpulsed DCs* », mis-à-part la perte de *Mucispirillum schaedleri* (*Deferribacteres*) et la surcroissance de *Bifidobacterium pseudolongum* (*Actinobacteria*). Nous avons par contre observé une diminution significative de la diversité du microbiote en réponse à la streptomycine et ce, particulièrement pour l'exposition adulte. L'analyse des coordonnées principales du microbiote intestinal des souris appartenant aux différentes conditions a permis de confirmer que l'administration de streptomycine induit une dysbiose chez ces souris et ce, pour toutes les expositions (**données non présentées**). D'après la littérature chez la souris, la streptomycine altère le microbiote en éliminant les bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.* et *Streptococcus* du groupe D (embranchement *Firmicutes*), au profit d'une expansion des espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*) (83).

Les *Lactobacillus* appartiennent au groupe qu'on appelle les micro-organismes bénéfiques. En effet, ces derniers ont la capacité d'induire les cellules T régulatrices et donc d'assurer une certaine protection envers l'inflammation. Autre exemple, certaines *Lactobacillus* codent pour une protéase, la lactoceptine, qui dégrade spécifiquement la cytokine inflammatoire CXCL10. Ces micro-organismes bénéfiques s'opposent directement aux effets des réponses inflammatoires de l'hôte et aident ainsi directement dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Inversement, leur perte contribue à briser cette homéostasie et favorise une situation pro-inflammatoire (131, 140).

À l'opposé, la famille des *Enterobacteriaceae* est la plus connue et rapportée d'un groupe de micro-organismes considérés comme potentiellement nuisibles et ainsi appelés « *pathobionts* ». Ces derniers sont retrouvés à des niveaux faibles dans un intestin sain et ne causent généralement aucun problème. Toutefois, plusieurs exemples montrent que la surcroissance de ces organismes peut contribuer à certaines maladies, par exemple des modèles murins de colite (140, 141). Cette famille comprend des espèces telles que *Escherichia coli*, *Shigella* et *Klebsiella*. Il n'est toutefois pas encore clair si ces micro-organismes, lorsqu'ayant l'opportunité de croître, peuvent initier la maladie ou ne font qu'exacerber sa progression (140).

Ainsi, cette perte de *Lactobacillus*, micro-organismes généralement associés à une protection contre l'inflammation, couplée à une surcroissance d'*Enterobacteriaceae* « *pathobionts* », conduit à

postuler un effet aggravateur de la dysbiose induite par la streptomycine. L'aggravation observée dans notre modèle expérimental concorde bien avec ce concept théorique basé sur la littérature.

#### E. Dans quelle mesure les microbiotes murins et humains sont-ils comparables ?

Les microbiotes murins et humains sont semblables en termes d'embranchements, mais sont toutefois très différents en termes de genres de bactéries. De plus, les observations chez la souris ne sont pas nécessairement applicables chez l'humain, tout d'abord parce que les modèles murins ne reproduisent pas complètement le système humain. Ensuite, différents modèles de souris peuvent entraîner différentes modifications de la composition du microbiote intestinal. De plus, les phénomènes de *cross-talk* observés sont spécifiques à l'hôte. Finalement, il faut aussi être prudent quant aux comparaisons entre la souris et l'humain à cause de l'existence de plusieurs autres facteurs tels que le fond génétique, le mode d'accouchement et la diète (142).

Dans le cas de la SSc chez l'humain, une étude a permis l'identification de modifications dans la composition du microbiote de 17 patients en comparaison aux sujets sains (143). Tout comme dans les maladies inflammatoires, les patients atteints de SSc présentent une diminution de bactéries de genre *Clostridium* et *Faecalibacterium* (embranchement *Firmicutes*), ainsi qu'une augmentation de bactéries « *pathobionts* » telles que celles appartenant au genre *Fusobacterium* (embranchement *Fusobacteria*) et à la classe  $\gamma$ -*Proteobacteria* (comprend les *Enterobacteriaceae*, embranchement *Proteobacteria*). Par contre, contrairement à ce qui est observé typiquement dans les conditions inflammatoires, les bactéries de genre *Bifidobacterium* (embranchement *Actinobacteria*) et *Lactobacillus* (*Firmicutes*) sont augmentées chez les patients atteints de SSc (143). Il est très complexe d'établir un lien de cause à effet entre une bactérie et une maladie, d'autant plus que certaines bactéries peuvent avoir des effets différents selon les conditions physiologiques de l'hôte. De plus, il est difficile de déterminer si ce microbiote perturbé est la cause de la maladie ou plutôt une conséquence d'un intestin sclérodermique qui est devenu moins efficace à absorber et qui favorise la pullulation bactérienne par un trouble de motilité.

Le message à retenir n'est donc pas que la streptomycine pourrait s'avérer néfaste chez l'humain, mais plutôt que la dysbiose peut influencer le développement de conditions auto-immunes, tel qu'il a déjà été démontré pour plusieurs maladies et tel que nous l'avons démontré particulièrement dans le modèle expérimental de SSc du laboratoire d'accueil. La présente étude confirme que l'aspect temporel de la dysbiose est tout aussi important.

## Conclusion générale et perspectives futures

La SSc demeure une maladie complexe à présentation clinique très hétérogène. Il n'existe toujours pas de traitement curatif pour cette maladie associée à une morbidité et à une mortalité élevées. Seul le travail acharné en recherche permettra un jour d'améliorer l'espérance de vie et la qualité de vie des milliers de patients atteints de SSc.

Un point majeur qui découle de nos résultats expérimentaux, tant au niveau du microbiote que de l'effet paradoxal du dabigatran, est que le décours temporel de cette maladie multi-systémique est critique dans l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques.

À partir de notre modèle murin de SSc, et notamment de fibrose pulmonaire et cutanée, plusieurs avenues intéressantes de caractérisation pathophysiologique et d'approches thérapeutiques nouvelles pourraient être empruntées :

- Afin de caractériser plus en détail le modèle et de démontrer qu'il s'agit d'une maladie expérimentale médiée par les cellules T, une expérience de transfert de cellules T serait très pertinente.
- L'utilisation de l'anti-IL-17A dans notre modèle expérimental pourrait constituer une étude intéressante sur le rôle de l'IL-17A dans le développement de la maladie.
- Au vu de l'expression génique de l'IL-13 dans la peau ainsi que de l'expression protéique intracytoplasmique dans les poumons des souris non traitées, l'administration d'anti-IL-13 apparaît comme une approche thérapeutique potentielle dans le cadre de cette maladie expérimentale. Des souris IL-13 KO pourraient aussi être utilisées pour évaluer le rôle pathogénique de cette cytokine dans la maladie expérimentale.
- Étant donné qu'il s'agit d'un modèle expérimental basé sur l'administration de DCs, l'utilisation de mycophénolate mofétil (MMF) pourrait être une approche intéressante, puisque cette molécule est déjà utilisée et semble stabiliser l'évolution clinique de la SSc chez certains patients. Parmi les multiples fonctions immunosuppressives du MMF, celui-ci inhibe la maturation et la fonction des DCs tant chez l'humain que chez la souris (144, 145).
- Dans la même perspective, la molécule FTY720, qui inhibe la migration des DCs, serait une molécule intéressante à mettre à l'épreuve dans ce modèle en particulier (146).

D'autre part, nos résultats démontrant l'effet paradoxal du dabigatran pourraient être mis à profit dans les approches suivantes dans notre modèle expérimental de SSc :

- Utiliser notre protocole d'immunisation sur des souris PAR-1 KO pour évaluer l'effet de l'inhibition de PAR-1 sans la complexité pharmacologique engendrée par l'utilisation du dabigatran (147).
- Comparer le dabigatran avec le rivaroxaban. Ce dernier n'est pas un inhibiteur direct de la thrombine, mais plutôt d'un inhibiteur indirect via l'inhibition du facteur Xa, facteur responsable de la conversion de la prothrombine en thrombine. Contrairement au dabigatran, le rivaroxaban ne présente pas d'effets pro-inflammatoires lorsqu'administré à des « faibles doses » et représente ainsi une alternative thérapeutique très intéressante à examiner (128).

Finalement, nos résultats quant au microbiote intestinal dans le modèle expérimental suggèrent la continuation du projet par les expériences suivantes :

- Suivre l'évolution de la maladie à un point temporel plus tardif (semaines 16-18) pour évaluer si l'inflammation et les autres marqueurs observés dans l'analyse de l'expression des gènes à un temps précoce conduisent ultérieurement à de la fibrose.
- Évaluer la présence de TSLP, d'IL-13 et IL-33 dans les poumons, étant donné qu'il s'agit de cytokines potentiellement clés dans les changements induits par la dysbiose intestinale suite à l'administration de streptomycine. Leur présence ne se limite peut-être pas au niveau de la peau.
- Étudier spécifiquement les microbiotes pulmonaire et cutané, étant donné qu'il s'agit d'organes-cibles primordiaux dans la SSc. Par exemple, il a été démontré que le microbiote de la peau peut induire une immunité protectrice contre les pathogènes cutanés (148). En ce sens, sa modulation serait intéressante à évaluer dans différentes conditions inflammatoires.
- Enfin, suite à nos résultats, il serait intéressant d'identifier des micro-organismes à manipuler. Bien évidemment, l'identification du profil du microbiote qui contribue à telle ou telle pathologie et l'élucidation des mécanismes impliqués serait un projet très ambitieux. Néanmoins, il serait intéressant d'étudier les espèces bactériennes de façon plus ciblée pour tenter d'identifier une ou plusieurs espèces impliquées (profil microbien) et ce, en parallèle avec des études de microbiote chez les patients. Ce type d'étude permettrait d'identifier des bactéries primordiales comme les SFB dans le contexte des réponses Th17 dans l'intestin (149).



Cette information pourrait ensuite être mise à profit au niveau thérapeutique en favorisant la croissance des bactéries bénéfiques ou en éradiquant celles qui sont néfastes. Plusieurs études ont déjà montré ce phénomène de rétablissement de bactéries bénéfiques menant à une protection et parfois même à la guérison de certaines maladies. Le fait de restaurer un microbiote « sain » possède donc vraiment un rôle thérapeutique potentiel, et on nomme cela « *rebiosis* » (140). Le principe est d'identifier des composantes fonctionnelles (idéalement un assortiment de micro-organismes pour un bénéfice maximal) du microbiote pouvant être cultivées (20-30% seulement) et donc utilisées sous la forme de probiotiques. Une autre approche serait l'utilisation de prébiotiques, c'est-à-dire d'ingrédients non-digestibles pouvant stimuler la croissance et l'activité de certains groupes bactériens. Davantage de connaissances sur la relation entre les réponses immunitaires de l'hôte et le microbiote pourrait ainsi mener à la conception de meilleures thérapies utilisant la manipulation des communautés microbiennes (140).

Dans une perspective encore plus générale, nous spéculons que le fait d'utiliser des probiotiques ou de se soucier de notre microbiote personnel ne devrait peut-être pas être utilisé comme approche thérapeutique contre la SSc, mais plutôt comme approche préventive contre les maladies inflammatoires chroniques, incluant les pathologies auto-immunes.

## Références bibliographiques

1. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front Immunol*. 2015;6:272.
2. Bernatsky S, Joseph L, Pineau CA, Belisle P, Hudson M, Clarke AE. Scleroderma prevalence: demographic variations in a population-based sample. *Arthritis Rheum*. 2009;61(3):400-4.
3. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(2):165-70.
4. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2737-47.
5. van Laar JM, Varga J. The immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):439-41.
6. Brembilla NC, Chizzolini C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. *Eur Cytokine Netw*. 2012;23(4):128-39.
7. van Bon L, Cossu M, Radstake TR. An update on an immune system that goes awry in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(6):505-10.
8. Bossini-Castillo L, Lopez-Isac E, Mayes MD, Martin J. Genetics of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):443-51.
9. Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suarez H, et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum Mol Genet*. 2009;18(11):2071-7.
10. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3902-12.
11. Asano Y, Sato S. Vasculopathy in scleroderma. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):489-500.
12. Ramirez GA, Franchini S, Rovere-Querini P, Sabbadini MG, Manfredi AA, Maugeri N. The role of platelets in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2012;3:160.
13. Sondergaard K, Stengaard-Pedersen K, Zachariae H, Heickendorff L, Deleuran M, Deleuran B. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) in scleroderma skin. *Br J Rheumatol*. 1998;37(3):304-10.
14. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol*. 1992;166(3):255-63.
15. Raja J, Denton CP. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):543-57.
16. Fullard N, O'Reilly S. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):511-7.
17. Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(8):566-77.
18. Lu TT. Dendritic Cells: Novel Players in Fibrosis and Scleroderma. *Current Rheumatology Reports*. 2011;14(1):30-8.
19. Marchal-Somme J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Valeyre D, Soumelis V, Crestani B, et al. Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol*. 2006;176(10):5735-9.

20. Bantsimba-Malanda C, Marchal-Somme J, Goven D, Freynet O, Michel L, Crestani B, et al. A role for dendritic cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice? *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(3):385-95.
21. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol*. 2002;168(7):3649-59.
22. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest*. 1996;98(3):785-92.
23. Chizzolini C, Boin F. The role of the acquired immune response in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):519-28.
24. Fuschiotti P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. *Cytokine*. 2011;56(3):544-9.
25. Huang XL, Wang YJ, Yan JW, Wan YN, Chen B, Li BZ, et al. Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis. *Inflamm Res*. 2015;64(3-4):151-9.
26. O'Reilly S, Cant R, Ciechomska M, van Laar JM. Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis? *Clin Transl Immunology*. 2013;2(4):e4.
27. Balanescu P, Ladaru A, Balanescu E, Nicolau A, Baicus C, Dan GA. IL-17, IL-6 and IFN-gamma in Systemic Sclerosis Patients. *Rom J Intern Med*. 2015;53(1):44-9.
28. Murdaca G, Spano F, Contatore M, Guastalla A, Puppo F. Potential use of TNF-alpha inhibitors in systemic sclerosis. *Immunotherapy*. 2014;6(3):283-9.
29. Corrado A. The Th1 chemokine IP-10 in Systemic sclerosis. *Clin Ter*. 2014;165(6):e436-41.
30. Yang X, Yang J, Xing X, Wan L, Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R4.
31. van Bon L, Affandi AJ, Broen J, Christmann RB, Marijnissen RJ, Stawski L, et al. Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. *N Engl J Med*. 2014;370(5):433-43.
32. Matsukura S, Odaka M, Kurokawa M, Kuga H, Homma T, Takeuchi H, et al. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of eotaxin/CC chemokine ligand 11 and its promoter activity through binding site for nuclear factor-kappa-beta in airway smooth muscle cells. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(5):763-71.
33. Odaka M, Matsukura S, Kuga H, Kokubu F, Kasama T, Kurokawa M, et al. Differential regulation of chemokine expression by Th1 and Th2 cytokines and mechanisms of eotaxin/CCL-11 expression in human airway smooth muscle cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143 Suppl 1:84-8.
34. Rahman MS, Yamasaki A, Yang J, Shan L, Halayko AJ, Gounni AS. IL-17A induces eotaxin-1/CC chemokine ligand 11 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAPK (Erk1/2, JNK, and p38) pathways. *J Immunol*. 2006;177(6):4064-71.
35. MacDonald KG, Dawson NA, Huang Q, Dunne JV, Levings MK, Broady R. Regulatory T cells produce profibrotic cytokines in the skin of patients with systemic sclerosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(4):946- e9.
36. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum*. 2004;50(6):1918-27.
37. Koenig M, Dieude M, Senecal JL. Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2008;7(8):588-93.
38. Senecal JL, Henault J, Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol*. 2005;32(9):1643-9.
39. Gunther J, Rademacher J, van Laar JM, Siegert E, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):529-42.

40. Affandi AJ, Radstake TR, Marut W. Update on biomarkers in systemic sclerosis: tools for diagnosis and treatment. *Semin Immunopathol.* 2015;37(5):475-87.
41. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(1):42-54.
42. Leask A. Matrix remodeling in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2015;37(5):559-63.
43. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med.* 2009;360(19):1989-2003.
44. Kahari VM, Sandberg M, Kalimo H, Vuorio T, Vuorio E. Identification of fibroblasts responsible for increased collagen production in localized scleroderma by in situ hybridization. *J Invest Dermatol.* 1988;90(5):664-70.
45. Scharffetter K, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization. *European journal of clinical investigation.* 1988;18(1):9-17.
46. Hugel T, White K, van Laar JM. Cell-to-cell contact of activated mast cells with fibroblasts and lymphocytes in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(9):1582.
47. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpfissinger TF, Feichtinger J, Zelger B, et al. The immunology of fibrosis. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:107-35.
48. Sargent JL, Milano A, Bhattacharyya S, Varga J, Connolly MK, Chang HY, et al. A TGFbeta-responsive gene signature is associated with a subset of diffuse scleroderma with increased disease severity. *J Invest Dermatol.* 2010;130(3):694-705.
49. Sargent JL, Li Z, Aliprantis AO, Greenblatt M, Lemaire R, Wu MH, et al. Interspecies comparative genomics identifies optimal mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2016.
50. Bhattacharyya S, Fang F, Tourtellotte W, Varga J. Egr-1: new conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). *J Pathol.* 2013;229(2):286-97.
51. Nagaraja V, Denton CP, Khanna D. Old medications and new targeted therapies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54(11):1944-53.
52. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR, et al. Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore).* 2002;81(2):154-67.
53. Morin F, Kavian N, Batteux F. Animal models of systemic sclerosis. *Curr Pharm Des.* 2015;21(18):2365-79.
54. Rossi GA, Hunninghake GW, Gadek JE, Szapiel SV, Kawanami O, Ferrans VJ, et al. Hereditary emphysema in the tight-skin mouse. Evaluation of pathogenesis. *Am Rev Respir Dis.* 1984;129(5):850-5.
55. Szapiel SV, Fulmer JD, Hunninghake GW, Elson NA, Kawanami O, Ferrans VJ, et al. Hereditary emphysema in the tight-skin (Tsk/+) mouse. *Am Rev Respir Dis.* 1981;123(6):680-5.
56. Le Hir M, Martin M, Haas C. A syndrome resembling human systemic sclerosis (scleroderma) in MRL/lpr mice lacking interferon-gamma (IFN-gamma) receptor (MRL/lprgammaR-/-). *Clin Exp Immunol.* 1999;115(2):281-7.
57. Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, Keene DR, He R, Adams HP, et al. Postnatal induction of transforming growth factor  $\beta$  signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis & Rheumatism.* 2007;56(1):334-44.
58. Denton CP, Zheng B, Evans LA, Shi-wen X, Ong VH, Fisher I, et al. Fibroblast-specific expression of a kinase-deficient type II transforming growth factor beta (TGFbeta) receptor leads to paradoxical activation of TGFbeta signaling pathways with fibrosis in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2003;278(27):25109-19.
59. Maurer B, Reich N, Juengel A, Kriegsmann J, Gay RE, Schett G, et al. Fra-2 transgenic mice as a novel model of pulmonary hypertension associated with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(8):1382-7.

60. Castello-Cros R, Whitaker-Menezes D, Molchansky A, Purkins G, Soslowsky LJ, Beason DP, et al. Scleroderma-like properties of skin from caveolin-1-deficient mice: Implications for new treatment strategies in patients with fibrosis and systemic sclerosis. *Cell Cycle*. 2011;10(13):2140-50.
61. Asano Y, Markiewicz M, Kubo M, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol*. 2009;29(2):425-34.
62. Samuel CS, Zhao C, Yang Q, Wang H, Tian H, Tregear GW, et al. The relaxin gene knockout mouse: a model of progressive scleroderma. *J Invest Dermatol*. 2005;125(4):692-9.
63. Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R, et al. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum*. 2011;63(6):1707-17.
64. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol*. 1999;112(4):456-62.
65. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gaudie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(3):362-82.
66. Christner PJ, Artlett CM, Conway RF, Jimenez SA. Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride. *Arthritis Rheum*. 2000;43(11):2598-605.
67. Stawski L, Han R, Bujor AM, Trojanowska M. Angiotensin II induces skin fibrosis: a novel mouse model of dermal fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):R194.
68. Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chereau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *Journal of immunology*. 2009;182(9):5855-64.
69. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis Rheum*. 2011;63(11):3575-85.
70. Jaffee BD, Claman HN. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell Immunol*. 1983;77(1):1-12.
71. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum*. 2010;62(10):2831-44.
72. Del Galdo F, Matucci-Cerinic M. The search for the perfect animal model discloses the importance of biological targets for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(4):635-6.
73. De Langhe E, Lories R. Fibrogenesis, novel lessons from animal models. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):565-74.
74. Ludwicka-Bradley A, Silver RM, Bogatkevich GS. Coagulation and autoimmunity in scleroderma interstitial lung disease. *Semin Arthritis Rheum*. 2011;41(2):212-22.
75. Ploplis VA, Wilberding J, McLennan L, Liang Z, Cornelissen I, DeFord ME, et al. A total fibrinogen deficiency is compatible with the development of pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol*. 2000;157(3):703-8.
76. Chervonsky AV. Microbiota and autoimmunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(3):a007294.
77. Rogers GB. Germs and joints: the contribution of the human microbiome to rheumatoid arthritis. *Nat Med*. 2015;21(8):839-41.
78. Dunne JL, Triplett EW, Gevers D, Xavier R, Insel R, Danska J, et al. The intestinal microbiome in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(1):30-7.

79. Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, Kurrer MO, Oudit GY, Watts TH, et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat Med.* 2003;9(12):1484-90.
80. Fortin G, Raymond M, Van VQ, Rubio M, Gautier P, Sarfati M, et al. A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha+CD103- dendritic cells. *J Exp Med.* 2009;206(9):1995-2011.
81. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Nietert PJ, Akter T, van Ryn J, Silver RM. Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1416-25.
82. de Boer JD, Berkhout LC, de Stoppelaar SF, Yang J, Ottenhoff R, Meijers JC, et al. Effect of the oral thrombin inhibitor dabigatran on allergic lung inflammation induced by repeated house dust mite administration in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309(8):L768-75.
83. Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li Y, Lupp C, et al. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect Immun.* 2008;76(10):4726-36.
84. Lakos G, Takagawa S, Varga J. *Animal Models of Scleroderma.* Perl A, editor. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004.
85. Polosukhin VV, Stathopoulos GT, Lawson WE, Blackwell TS. Variability of interalveolar septal remodeling after bleomycin treatment in mice. *Ultrastruct Pathol.* 2005;29(1):53-64.
86. Nishimura K, Kitaichi M, Izumi T, Nagai S, Kanaoka M, Itoh H. Usual interstitial pneumonia: histologic correlation with high-resolution CT. *Radiology.* 1992;182(2):337-42.
87. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology.* 1993;122(1):103-11.
88. Bhattacharyya S, Kelley K, Melichian DS, Tamaki Z, Fang F, Su Y, et al. Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor-beta responses: a novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *Am J Pathol.* 2013;182(1):192-205.
89. Hankey GJ, Eikelboom JW. Dabigatran etexilate: a new oral thrombin inhibitor. *Circulation.* 2011;123(13):1436-50.
90. Russell SL, Gold MJ, Willing BP, Thorson L, McNagny KM, Finlay BB. Perinatal antibiotic treatment affects murine microbiota, immune responses and allergic asthma. *Gut Microbes.* 2013;4(2):158-64.
91. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, Willing BP, Thorson L, Wlodarska M, et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep.* 2012;13(5):440-7.
92. Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26:26050.
93. Manetti M, Rosa I, Milia AF, Guiducci S, Carmeliet P, Ibba-Manneschi L, et al. Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1700-9.
94. Lee R, Reese C, Bonner M, Tourkina E, Hajdu Z, Riemer EC, et al. Bleomycin delivery by osmotic minipump: similarity to human scleroderma interstitial lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306(8):L736-48.
95. Perez-Frias A, Gonzalez-Tajuelo R, Nunez-Andrade N, Tejedor R, Garcia-Blanco MJ, Vicente-Rabareda E, et al. Development of an autoimmune syndrome affecting the skin and internal organs in P-selectin glycoprotein ligand 1 leukocyte receptor-deficient mice. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(11):3178-89.

96. Yanaba K, Takehara K, Sato S. Serum concentrations of soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 are increased in patients with systemic sclerosis: association with lower frequency of pulmonary fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(5):583-7.
97. Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, et al. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(7):808-17.
98. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3726-35.
99. Mi S, Li Z, Yang HZ, Liu H, Wang JP, Ma YG, et al. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta1-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2011;187(6):3003-14.
100. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med.* 2010;207(3):535-52.
101. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S, et al. Interleukin-17A+ cell counts are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated with the extent of skin involvement. *Arthritis Rheum.* 2013;65(5):1347-56.
102. Lambrecht BN. Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy.* 2005;60(3):271-82.
103. Passerini L, Santoni de Sio FR, Roncarolo MG, Bacchetta R. Forkhead box P3: the peacekeeper of the immune system. *Int Rev Immunol.* 2014;33(2):129-45.
104. Liu X, Gao N, Li M, Xu D, Hou Y, Wang Q, et al. Elevated levels of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in systemic sclerosis patients contribute to the secretion of IL-17 and immunosuppression dysfunction. *PLoS One.* 2013;8(6):e64531.
105. Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol.* 2011;2(3).
106. Benham H, Norris P, Goodall J, Wechalekar MD, FitzGerald O, Szentpetery A, et al. Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R136.
107. Zhang Y, Luo XY, Wu DH, Xu Y. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(1):71-87.
108. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med.* 2015;21(7):698-708.
109. Cale JM, Lawrence DA. Structure-function relationships of plasminogen activator inhibitor-1 and its potential as a therapeutic agent. *Curr Drug Targets.* 2007;8(9):971-81.
110. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol.* 2012;227(2):493-507.
111. Lafyatis R. Transforming growth factor beta--at the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(12):706-19.
112. Rice LM, Padilla CM, McLaughlin SR, Mathes A, Ziemek J, Goummih S, et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J Clin Invest.* 2015;125(7):2795-807.
113. McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol.* 1999;163(10):5693-9.
114. Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Experimental lung research.* 1992;18(1):29-43.
115. Eferl R, Hasselblatt P, Rath M, Popper H, Zenz R, Komnenovic V, et al. Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10525-30.

116. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014;123(18):2759-67.
117. von Hundelshausen P, Schmitt MM. Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications. *Frontiers in physiology*. 2014;5:294.
118. Schaffner A, Rhyn P, Schoedon G, Schaer DJ. Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes--role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *J Leukoc Biol*. 2005;78(1):202-9.
119. Gleissner CA. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Frontiers in physiology*. 2012;3:1.
120. Ohba T, McDonald JK, Silver RM, Strange C, LeRoy EC, Ludwicka A. Scleroderma bronchoalveolar lavage fluid contains thrombin, a mediator of human lung fibroblast proliferation via induction of platelet-derived growth factor alpha-receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;10(4):405-12.
121. Kowal-Bielecka O, Kowal K, Lewszuk A, Bodzenta-Lukaszyk A, Walecki J, Sierakowski S. Beta thromboglobulin and platelet factor 4 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(3):484-6.
122. Howell DC, Johns RH, Lasky JA, Shan B, Scotton CJ, Laurent GJ, et al. Absence of proteinase-activated receptor-1 signaling affords protection from bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis. *Am J Pathol*. 2005;166(5):1353-65.
123. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Silver RM. Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, blocks differentiation of normal fibroblasts to a myofibroblast phenotype and demonstrates anti-fibrotic effects on scleroderma lung fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2009;60(11):3455-64.
124. Lemaire R, Burwell T, Sun H, Delaney T, Bakken J, Cheng L, et al. Resolution of Skin Fibrosis by Neutralization of the Antifibrinolytic Function of Plasminogen Activator Inhibitor 1. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(2):473-83.
125. Morgulis MS, Stankevicius D, Sa-Rocha LC, Palermo-Neto J. Cohabitation with a sick cage mate: consequences on behavior and on ehrlich tumor growth. *Neuroimmunomodulation*. 2004;11(1):49-57.
126. Hamasato EK, de Lima AP, de Oliveira AP, dos Santos Franco AL, de Lima WT, Palermo-Neto J. Cohabitation with a sick partner increases allergic lung inflammatory response in mice. *Brain Behav Immun*. 2014;42:109-17.
127. Perzborn E, Heitmeier S, Buetehorn U, Laux V. Direct thrombin inhibitors, but not the direct factor Xa inhibitor rivaroxaban, increase tissue factor-induced hypercoagulability in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost*. 2014;12(7):1054-65.
128. Ellinghaus P, Perzborn E, Hauenschild P, Gerdes C, Heitmeier S, Visser M, et al. Expression of pro-inflammatory genes in human endothelial cells: Comparison of rivaroxaban and dabigatran. *Thrombosis research*. 2016;142:44-51.
129. Camerer E, Duong DN, Hamilton JR, Coughlin SR. Combined deficiency of protease-activated receptor-4 and fibrinogen recapitulates the hemostatic defect but not the embryonic lethality of prothrombin deficiency. *Blood*. 2004;103(1):152-4.
130. Carpenter SL, Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia*. 2008;14(6):1250-4.
131. Kosiewicz MM, Zirnheld AL, Alard P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. *Front Microbiol*. 2011;2:180.
132. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-41.



133. Candon S, Perez-Arroyo A, Marquet C, Valette F, Foray AP, Pelletier B, et al. Antibiotics in early life alter the gut microbiome and increase disease incidence in a spontaneous mouse model of autoimmune insulin-dependent diabetes. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125448.
134. Russell SL, Gold MJ, Reynolds LA, Willing BP, Dimitriu P, Thorson L, et al. Perinatal antibiotic-induced shifts in gut microbiota have differential effects on inflammatory lung diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(1):100-9.
135. Bazett M, Bergeron ME, Haston CK. Streptomycin treatment alters the intestinal microbiome, pulmonary T cell profile and airway hyperresponsiveness in a cystic fibrosis mouse model. *Sci Rep*. 2016;6:19189.
136. Manetti M, Guiducci S, Romano E, Bellando-Randone S, Conforti ML, Ibba-Manneschi L, et al. Increased serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase-12 in patients with systemic sclerosis: correlation with severity of skin and pulmonary fibrosis and vascular damage. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(6):1064-72.
137. Ziegler SF, Roan F, Bell BD, Stoklasek TA, Kitajima M, Han H. The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP). *Adv Pharmacol*. 2013;66:129-55.
138. Yockey LJ, Demehri S, Turkoz M, Turkoz A, Ahern PP, Jassim O, et al. The absence of a microbiota enhances TSLP expression in mice with defective skin barrier but does not affect the severity of their allergic inflammation. *J Invest Dermatol*. 2013;133(12):2714-21.
139. Christmann RB, Mathes A, Affandi AJ, Padilla C, Nazari B, Bujor AM, et al. Thymic stromal lymphopoietin is up-regulated in the skin of patients with systemic sclerosis and induces profibrotic genes and intracellular signaling that overlap with those induced by interleukin-13 and transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*. 2013;65(5):1335-46.
140. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol*. 2014;16(7):1024-33.
141. Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10<sup>-/-</sup> mice. *Nature*. 2012;487(7405):104-8.
142. Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech*. 2015;8(1):1-16.
143. Volkmann ER, Chang YL, Barroso N, Furst DE, Clements PJ, Gorn AH, et al. Association of Systemic Sclerosis With a Unique Colonic Microbial Consortium. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(6):1483-92.
144. Colic M, Stojic-Vukanic Z, Pavlovic B, Jandric D, Stefanoska I. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 2003;134(1):63-9.
145. Mehling A, Grabbe S, Voskort M, Schwarz T, Luger TA, Beissert S. Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J Immunol*. 2000;165(5):2374-81.
146. Lan YY, De Creus A, Colvin BL, Abe M, Brinkmann V, Coates PT, et al. The sphingosine-1-phosphate receptor agonist FTY720 modulates dendritic cell trafficking in vivo. *Am J Transplant*. 2005;5(11):2649-59.
147. Connolly AJ, Suh DY, Hunt TK, Coughlin SR. Mice lacking the thrombin receptor, PAR1, have normal skin wound healing. *Am J Pathol*. 1997;151(5):1199-204.
148. Belkaid Y, Segre JA. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science*. 2014;346(6212):954-9.
149. Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*. 2008;4(4):337-49.