

MARIE-PIER CORRIVEAU

## **SCLÉRODERMIE**

**Nouvelle hypothèse pathophysiologique grâce à l'utilisation d'un  
modèle de derme reconstruit par génie tissulaire**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire  
pour l'obtention du grade de maître ès science (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2009

## Résumé

La sclérodermie est une maladie auto-immune du tissu conjonctif caractérisée par une fibrose de la peau et des organes internes. L'objectif principal du projet était d'utiliser un modèle de derme reconstruit par auto-assemblage pour vérifier la capacité intrinsèque des fibroblastes sclérodermiques à sécréter et organiser une matrice extracellulaire *in vitro*. L'utilisation de fibroblastes de peau lésée ou non, de patients atteints de sclérodermie diffuse depuis moins d'un an ou depuis plus de dix ans nous a permis d'établir une nouvelle hypothèse. Au début de la maladie, les fibroblastes nécessiteraient la présence d'un ou de facteurs extrinsèques pour induire une fibrose. Avec le temps et lorsque la maladie s'aggrave, les fibroblastes deviendraient indépendants de ces stimuli externes. De plus, le TGF- $\beta$ 1 pourrait être un des facteurs importants pour induire des lésions fibrotiques. Finalement, ce même TGF- $\beta$ 1 pourrait être responsable des changements phénotypiques stables des fibroblastes au stade précoce de la maladie.

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, le Dr. Véronique Moulin, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de travailler au sein d'une équipe des plus stimulantes. Je voudrais aussi la remercier pour sa présence, sa confiance, ses encouragements, ses critiques constructives et ses judicieux conseils. Je voudrais également remercier le Dr. François A. Auger pour m'avoir accueillie au Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale.

Un grand merci à toute l'équipe du Dr. Moulin : Stéphane Chabaud (Ph.D), Anne Châteauneuf (M.Sc), Sébastien Larochelle (M.Sc), Dominique Mayrand (M.Sc) et Franck Simon (B.Sc). Ils ont su m'aider lors de mes expérimentations, répondre à mes mille et une questions et agrémente mes journées de travail.

Merci à tous les étudiants qui partagent le J1-09 pour les discussions enrichissantes et pour le côté social de ma maîtrise!!!

Un grand merci à ma colocataire Joanie Baillargeon (M.Sc) pour m'avoir écoutée, conseillée et encouragée tout au long de ma maîtrise.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents, Pierre et Sabine, ainsi que mes frères, Dan et Dominique, qui m'ont toujours encouragée dans mes projets : sans eux, je n'aurais jamais accompli des études graduées.

*À mes parents, Pierre et Sabine,  
pour leur soutien et leur compréhension*

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>I</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>II</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>CHAPITRE 1</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.0 Introduction.....	2
1.1 La Sclérodermie .....	2
1.1.1 Sclérodermie limitée .....	2
1.1.2 Sclérodermie diffuse .....	2
1.1.3 Le score modifié de Rodnan .....	4
1.2 Étiologie .....	5
1.2.1 Prédisposition génétique .....	5
1.2.2 Facteurs environnementaux .....	5
1.2.3 Microchimérisme .....	6
1.3 La pathogenèse.....	6
1.3.1 La composante vasculaire .....	7
1.3.2 La composante immunitaire.....	8
1.3.2.1 Immunité humorale.....	8
1.3.2.2 Immunité cellulaire .....	8
1.3.3 La composante fibrotique .....	9
1.3.3.1 La peau.....	9
1.3.3.1.1 L'épiderme .....	10
1.3.3.1.2 Le derme .....	11
1.3.3.1.3 L'hypoderme.....	11
1.3.3.2 La matrice extracellulaire .....	11
1.3.3.2.1 Le collagène type I.....	12
1.3.3.2.1.1 Le collagène de type I et la sclérodermie.....	14
1.3.3.2.2 Les métalloprotéinases.....	14
1.3.3.2.2.1 La MMP-1.....	15
1.3.3.2.3 Les TIMP .....	15
1.3.3.2.4 L'activité des métalloprotéinases et la sclérodermie .....	15
1.3.3.3 L'activation des fibroblastes .....	16
1.4 Les cytokines et facteurs de croissance .....	17
1.4.1 Le TGF- $\beta$ .....	17
1.4.1.1 La voie du TGF- $\beta$ .....	17
1.4.1.2 Le TGF- $\beta$ et la Sclérodermie .....	19
1.4.2 Le CTGF .....	19

1.4.2.1 Le CTGF et la Sclérodermie .....	20
1.5 Traitements .....	21
1.6 Les modèles d'études .....	21
1.7 Les objectifs du projet.....	24
<b>CHAPITRE 2 .....</b>	<b>26</b>
<b>ARTICLE .....</b>	<b>26</b>
2.0 Article .....	27
<b>CHAPITRE 3 .....</b>	<b>50</b>
<b>RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES .....</b>	<b>50</b>
3.0 Résumé.....	51
3.1 Matériel et méthodes.....	52
3.1.1 Culture de fibroblastes .....	52
3.1.2 Dermis reconstruits par auto-assemblage.....	52
3.1.3 Histologie et Mesure d'épaisseur des dermes reconstruits .....	52
3.1.4 Pré-traitement des fibroblastes avec le TGF- $\beta$ 1 .....	52
3.1.5 Traitement des fibroblastes .....	53
3.1.6 Prolifération cellulaire .....	53
3.1.7 Évaluation du collagène I sécrété .....	54
3.1.7.1 Précipitation des protéines à l'ammonium persulfate .....	54
3.1.7.2 Dosage des protéines par la méthode Bradford .....	54
3.1.7.3 SDS-Page et Immunobuvardage de type Western .....	55
3.1.8 Sécrétion de TGF- $\beta$ 1 .....	55
3.1.9 Analyses statistiques .....	56
3.2 Résultats.....	57
3.2.1 Quantité de TGF- $\beta$ 1 sécrétée par les fibroblastes.....	57
3.2.2 Effet des différents facteurs de croissance sur la prolifération cellulaire .....	59
3.2.3 Effet des différents facteurs de croissance sur la quantité de collagène I sécrétée .....	61
3.2.4 Effets de différents facteurs de croissance sur l'épaisseur des dermes reconstruits .....	63
3.2.5 Effet de la présence à long terme du TGF- $\beta$ 1 sur le phénotype des différentes populations cellulaires .....	65
<b>CHAPITRE 4 .....</b>	<b>67</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>67</b>
4.0 Discussion .....	68
<b>CHAPITRE 5 .....</b>	<b>77</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>77</b>
5.0 Bibliographie.....	78

## Liste des tableaux

Pages

**Table 1** : Characteristics of patients with systemic sclerosis (SSc) and healthy controls.....45

# Liste des figures

	Pages
<b>Figure 1</b> : Classification des différents cas de sclérodermie dans l'étude menée par Scussel-Lonzetti L., et al.....	3
<b>Figure 2</b> : Représentation des 17 sites utilisés pour le calcul du score modifié de Rodnan.....	4
<b>Figure 3</b> : Photos représentant les principales caractéristiques de la sclérodermie.....	7
<b>Figure 4</b> : Schématisation de la peau.....	10
<b>Figure 5</b> : Schématisation de la formation des fibres de collagène.....	13
<b>Figure 6</b> : La voie de signalisation du TGF- $\beta$ .....	18
<b>Figure 7</b> : Representative experiment showing thickness of reconstructed dermis (RD) using tissue engineering method.....	46
<b>Figure 8</b> : Ratio of the thickness of reconstructed dermis (RD) of each SSc cell population compared with control fibroblasts used in the same experiment.....	47
<b>Figure 9</b> : Collagen type I , MMP activity and MMP-1 quantification in supernatants of reconstructed dermis (RD).....	48
<b>Figure 10</b> : TGF $\beta$ 1 action on dermal reconstruction.....	49
<b>Figure 11</b> : Dosage de la quantité de TGF- $\beta$ 1 sécrétée par les différentes populations de fibroblastes.....	58
<b>Figure 12</b> : Effet des différents facteurs de croissance sur la prolifération cellulaire.....	60
<b>Figure 13</b> : Effet des différents facteurs de croissance sur la quantité de collagène I sécrétée.....	62
<b>Figure 14</b> : Effets de différents facteurs de croissance sur l'épaisseur des dermes reconstruits.....	64
<b>Figure 15</b> : Effet d'un pré-traitement des cellules avec du TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec différentes populations de fibroblastes.....	66

## Liste des abréviations

<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>CCN :</b>	Famille du CTGF/Cyr6/Nov
<b>CTGF :</b>	Connective tissue growth factor
<b>DME:</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DO:</b>	Densité optique
<b>H:</b>	Fibroblastes isolés de peau de sujets sains
<b>ICAM-1 :</b>	Intercellular adhesion molecule type 1
<b>IECA :</b>	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>IL :</b>	Interleukine
<b>L :</b>	Fibroblastes isolés de lésion de patient sclérodermique
<b>LTGF-<math>\beta</math> :</b>	Forme latente du Transforming growth factor- $\beta$
<b>MMP :</b>	Métalloprotéinase
<b>MTT :</b>	Bromure de 3-(4-5-Diméthiazol)-2,5-Diphényl Tétrazolium
<b>NL :</b>	Fibroblastes isolés de peau saine de patient sclérodermique
<b>NO:</b>	Oxyde nitrique
<b>Nov :</b>	Nephroblastoma overexpressed
<b>PDGF:</b>	Platelet-derived growth factor
<b>SMR:</b>	Score modifié de Rodnan
<b>SVF:</b>	Sérum de veau foetal
<b>TGF-<math>\beta</math> :</b>	Transforming growth factor- $\beta$
<b>TGF-<math>\beta</math>RI:</b>	Récepteur I du Transforming growth factor- $\beta$
<b>TGF-<math>\beta</math>RII:</b>	Récepteur II du Transforming growth factor- $\beta$
<b>TIMP:</b>	Tissue inhibitor of metalloproteinase
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tumor necrosis factor- $\alpha$
<b>TSK-1:</b>	Tight skin mouse

**Chapitre 1**  
**Introduction**

## **1.0 Introduction**

### **1.1 La Sclérodermie**

La sclérodermie est une maladie rare du tissu conjonctif qui se caractérise principalement par une fibrose de la peau et dans certains cas, des organes internes (Krieg and Meurer, 1988; Perez and Kohn, 1993). Dans la population générale, l'incidence annuelle varie entre 0,4 à 1,2 cas par 100 000 personnes (Medsger, 1994). Selon la Société de l'arthrite, plus de 16 000 Canadiens sont atteints de sclérodermie soit 1 personne sur 1 800. La sclérodermie peut toucher les deux genres, mais affecte plus particulièrement les femmes avec un ratio femme : homme variant de 3 :1 à 8 :1 (Steen et al., 1997). La maladie survient généralement chez les femmes noires âgées entre 34 et 44 ans et chez les femmes caucasiennes âgées entre 45 et 54 ans (Laing et al., 1997).

Les différentes formes de sclérodermie peuvent être divisées en deux grandes catégories selon l'atteinte de la peau par la fibrose: la sclérodermie limitée et la sclérodermie diffuse (LeRoy et al., 1988).

#### **1.1.1 Sclérodermie limitée**

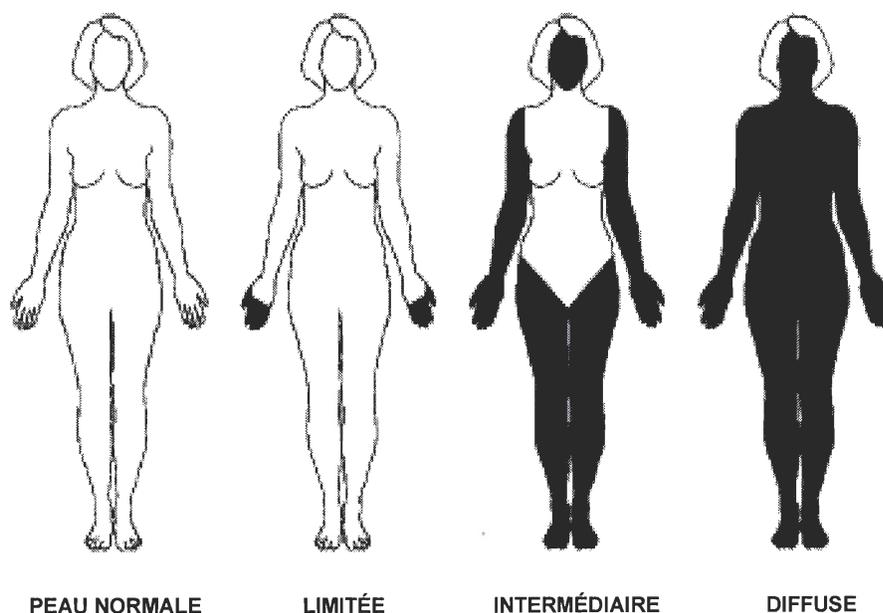
Chez les patients atteints de la forme limitée, la fibrose se restreint au niveau des extrémités et du visage (LeRoy et al., 1988). La maladie évolue très lentement et le pronostic est très favorable. Parfois, les patients présentent une hypertension pulmonaire et une malabsorption intestinale (Allanore and Kahan, 2006).

#### **1.1.2 Sclérodermie diffuse**

La forme diffuse affecte 10% des patients sclérodermiques et elle est la forme la plus mortelle avec 40% de mortalité sur une période de 10 ans (Scussel-Lonzetti et al., 2002). Les patients atteints de la forme diffuse présentent une fibrose qui s'étend sur tout le corps et au niveau des organes internes. Les principaux organes internes atteints par la fibrose sont

l'oesophage, les reins, les poumons et le coeur (Takehara, 2003). La principale cause de mortalité est la crise rénale qui se caractérise par une hypertension artérielle sévère et une insuffisance rénale progressive. Cependant, depuis le traitement des patients avec des IECA ou inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, le taux de survie est passé de 18% à 76% après un an de traitement (Steen et al., 1990).

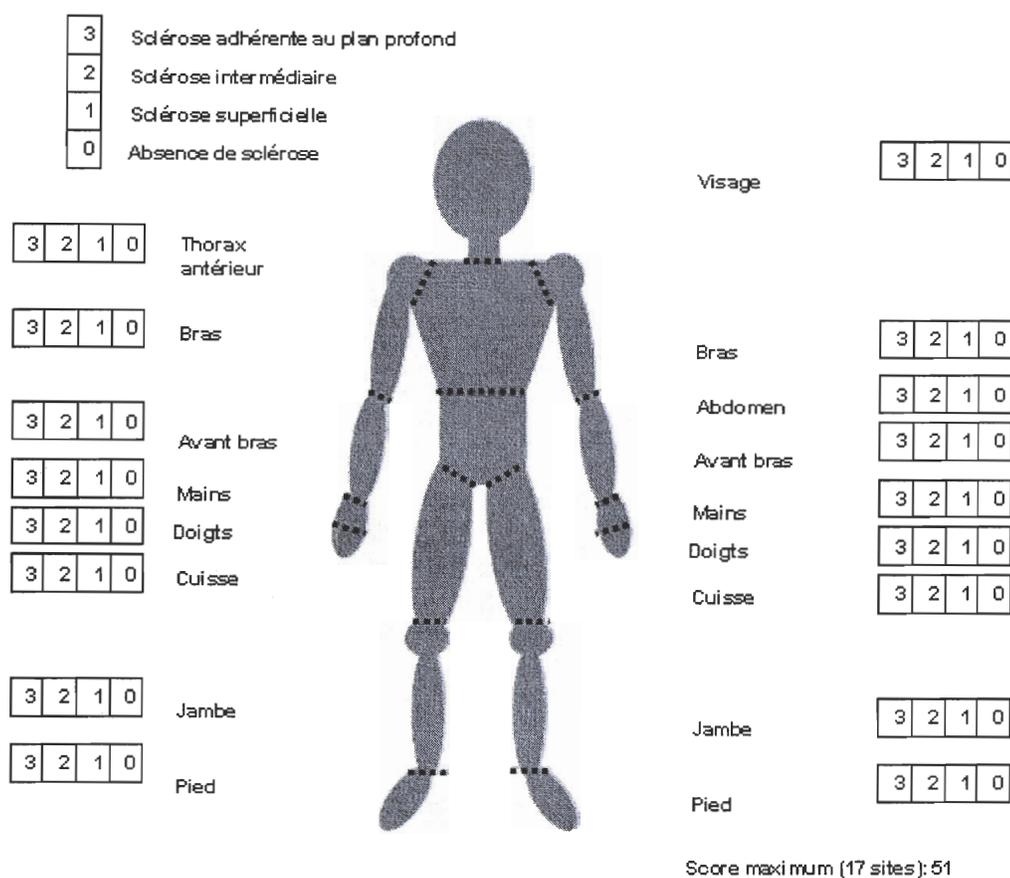
Il existe plusieurs critères de classification des différents cas de sclérodémie, mais celui classifiant l'atteinte de la peau (limitée ou diffuse) par la fibrose demeure celui le plus reconnu et le plus utilisé (Walker et al., 2007). Cependant, certaines équipes de recherche croient que les différentes formes de sclérodémie pourraient se diviser en trois catégories (Ferri et al., 2002; Scussel-Lonzetti et al., 2002). En effet, une équipe de chercheurs de Montréal a évalué le taux de mortalité chez 309 Canadiens français atteints de sclérodémie. Les différents cas ont été divisés en trois catégories : sclérodémie limitée, sclérodémie intermédiaire et sclérodémie diffuse (figure 1). Suite à cette étude, des taux de mortalité, mais aussi des caractéristiques cliniques et sérologiques (autoanticorps) différentes ont été mis en évidence pour ces trois formes de sclérodémie (Scussel-Lonzetti et al., 2002).



**Figure 1 : Classification des différents cas de sclérodémie dans l'étude menée par Scussel-Lonzetti L., et al.** Le noir représente l'atteinte de la peau par la fibrose. La fibrose se restreint au niveau des jointures pour la forme limitée. Elle s'étend au niveau des membres pour la forme intermédiaire et elle atteint le tronc dans la forme diffuse. (Modifiée de Scussel-Lonzetti et al., 2002).

### 1.1.3 Le score modifié de Rodnan

Le score modifié de Rodnan (SMR) est utilisé pour évaluer l'atteinte de la peau par la fibrose. Au total, la dureté et l'épaisseur de 17 sites sont évaluées et un score de 0 à 3 est attribué où 0 signifie que la peau est d'apparence normale et 3 indique une peau d'une épaisseur et d'une dureté très élevée (figure 2) (Clements et al., 1993).



**Figure 2 : Représentation des 17 sites utilisés pour le calcul du score modifié de Rodnan.** La dureté et l'épaisseur de 17 sites sont évaluées et un score entre 0 et 3 est accordé où 0 représente une peau d'apparence normale et 3 une peau très épaisse et très dure. ([www.rhumatismes.net](http://www.rhumatismes.net))

## 1.2 Étiologie

Jusqu'à ce jour, l'étiologie de la sclérodermie demeure encore inconnue. Par contre, plusieurs hypothèses ont été suggérées : prédisposition génétique, implication des facteurs environnementaux et plus récemment, microchimérisme.

### 1.2.1 Prédisposition génétique

La sclérodermie n'est pas une maladie héréditaire, mais plusieurs études suggèrent l'implication d'une composante génétique dans le développement de cette maladie. En effet, une histoire familiale positive de sclérodermie est le principal facteur de risque d'être atteint de cette maladie (Arnett et al., 2001). De plus, plusieurs études épidémiologiques ont démontré que certains groupes ethniques sont plus particulièrement atteints par la sclérodermie. L'incidence annuelle chez les femmes afro-américaines est évaluée à 22,5 cas/million comparativement à 12,8 cas/million pour les femmes caucasiennes (Laing et al., 1997). Aussi, la prévalence chez les Indiens Choctaw pur-sang de l'Oklahoma a été évaluée à 469 cas/100 000 personnes sur une période de quatre ans. Cette prévalence est plus élevée que celle retrouvée chez les Indiens Choctaw non pur-sang (31/100 000) et chez les Américains natifs de l'Oklahoma (9,5/100 000) (Arnett et al., 1996). Enfin, plusieurs polymorphismes et variations dans l'expression de certains gènes d'intérêt ont été associés à la sclérodermie (Assassi and Tan, 2005). Par contre, des études menées auprès de jumeaux monozygotes ont montré un taux d'atteinte similaire à celui retrouvé chez des jumeaux hétérozygotes (Cook et al., 1993; De Keyser et al., 2000).

### 1.2.2 Facteurs environnementaux

L'exposition à différents agents chimiques, physiques et infectieux augmenterait les risques d'être atteint de sclérodermie. En effet, l'exposition aux solvants organiques, tel le chlorure de vinyle, augmenterait les risques de phénomène de Raynaud, d'ulcères digitaux et d'épaississement de la peau (Diot et al., 2002). Le mimétisme moléculaire entre certaines

protéines rétrovirales et l'antigène-cible des anti-Scl-70, la topoisomérase I, suggère une origine virale de la maladie (Jimenez et al., 1995). De plus, la présence d'anticorps contre des protéines rétrovirales dans le sérum de patients atteints de sclérodémie renforce cette hypothèse (Dang et al., 1991).

Les facteurs environnementaux ne peuvent expliquer tous les cas de sclérodémie et d'autres études sont nécessaires pour alimenter ces hypothèses. De plus, toutes ces évidences suggèrent que l'interaction entre différents facteurs, génétiques et environnementaux, serait importante pour l'apparition de la maladie (Haustein and Herrmann, 1994).

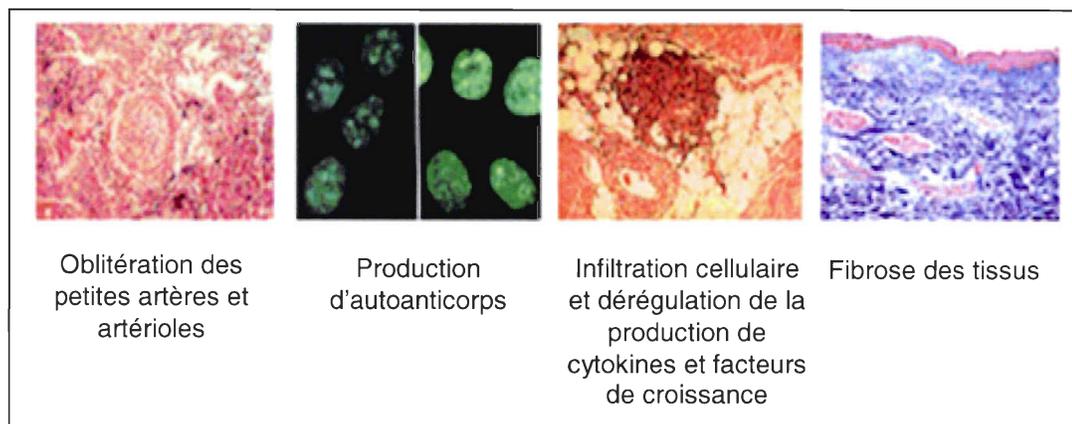
### **1.2.3 Microchimérisme**

Plus récemment, le microchimérisme ou la persistance des cellules du fœtus chez la mère a été suggéré comme étant une cause possible de la sclérodémie. En effet, les manifestations de la sclérodémie ressemblent beaucoup à celles de la réaction du greffon contre l'hôte qui est une conséquence du microchimérisme (Black and Stevens, 1989). Des chercheurs ont trouvé des cellules du fœtus chez la mère atteinte de sclérodémie après plusieurs années. Par contre, des cellules du fœtus ont aussi été retrouvées chez des sujets sains, quoi qu'en plus grande quantité chez les patientes sclérodémiques. Ces observations suggèrent que c'est la quantité de cellules étrangères présentes chez la mère et non seulement leur présence qui causerait la maladie (Artlett et al., 1998). De plus, le microchimérisme materno-fœtal ou la présence de cellules de la mère chez le fœtus pourrait expliquer les cas de sclérodémie chez les femmes n'ayant jamais eu de grossesse et chez les hommes (Maloney et al., 1999). Malgré toutes ces évidences, le microchimérisme demeure une hypothèse pour expliquer l'étiologie de la sclérodémie.

## **1.3 La pathogénèse**

La sclérodémie est caractérisée par une vasculopathie des petites artères, une altération de l'immunité cellulaire et humorale et un dépôt excessif des composantes de la matrice extracellulaire au niveau de la peau et des organes internes (figure 3). Cependant, la relation

entre ces trois composantes majeures de la pathologie n'a pas encore été établie (Derk and Jimenez, 2003).



**Figure 3 :** Photos représentant les principales caractéristiques de la sclérodémie. La sclérodémie est caractérisée principalement par une vasculopathie des petites artères, une activation du système immunitaire (production d'autoanticorps, de cytokines et de facteurs de croissance) et une fibrose de la peau et des organes internes. (modifiée de Jimenez and Derk, 2004)

### 1.3.1 La composante vasculaire

Une des composantes importante dans la pathologie de la sclérodémie est la vasculopathie des petites artères. Cette vasculopathie est un évènement précoce observé dans tous les sites atteints par la fibrose (peau et organes internes), mais aussi dans les sites non atteints (Grassi et al., 1993). La mort des cellules endothéliales serait un évènement central de cette vasculopathie. Malgré que son mécanisme demeure inconnu, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette mort massive : agents infectieux, anticorps anti-cellules endothéliales, cellules T cytotoxiques et lésions d'ischémie-reperfusion (Kahaleh, 2008). De plus, la vasodilatation semble aussi altérée chez les patients sclérodémiques. En effet, une diminution des vasodilatateurs (NO, prostacycline) et une augmentation de l'endothéline-1, un puissant vasoconstricteur ont été observées chez les patients atteints de sclérodémie (Jimenez and Derk, 2004). Les différentes altérations du système vasculaire sont bien illustrées par les diverses manifestations cliniques caractéristiques des patients sclérodémiques : le phénomène de Raynaud, la crise rénale et l'hypertension pulmonaire (Clements, 2000).

## **1.3.2 La composante immunitaire**

Une autre composante importante impliquée dans la sclérodermie est l'altération du système immunitaire. En effet, l'immunité humorale et l'immunité cellulaire sont affectées dans cette pathologie.

### **1.3.2.1 Immunité humorale**

Plus de 90% des patients atteints de sclérodermie produisent des anticorps anti-nucléaires (Ho and Reveille, 2003). De plus, les anticorps anti-centromères sont présents chez 80 à 96% des patients atteints de la forme limitée et seulement chez 10% de ceux atteints de la forme diffuse. Les anticorps anti-topoisomérase I ou anti-Scl-70 sont, quant à eux, exclusivement présents dans le sérum des patients atteints de la forme diffuse, soit dans 30 à 40% des cas. D'autres autoanticorps, tels les anticorps anti-ARN polymérase I et III, anti-fibrillarine et anti-PM-Scl sont moins communément retrouvés dans le sérum des patients sclérodermiques (Derk and Jimenez, 2003). Les autoanticorps sont utiles pour le diagnostic et le pronostic des patients atteints de sclérodermie (Grassegger et al., 2008).

### **1.3.2.2 Immunité cellulaire**

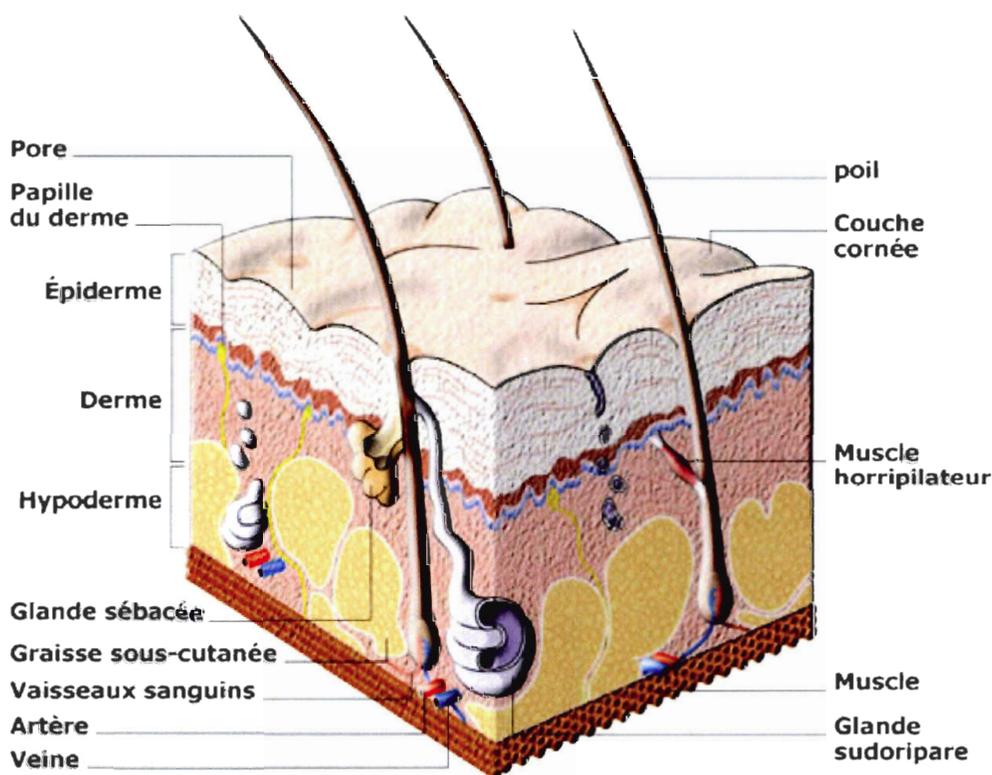
L'immunité cellulaire est aussi altérée chez les patients sclérodermiques. Des analyses de biopsies provenant de sites fibrotiques de patients atteints de sclérodermie précoce ont démontré l'infiltration de cellules mononucléaires au niveau du derme. Les macrophages et les cellules T CD4<sup>+</sup> sont celles retrouvées en plus grande quantité (Kraling et al., 1995). Les cellules infiltrées peuvent synthétiser et sécréter différentes cytokines et facteurs de croissance possiblement impliqués dans la modulation de différents types cellulaires et ainsi permettre l'initiation ou le maintien du processus pathologique (Ferrarini et al., 1990). En effet, plusieurs cytokines et facteurs de croissance ayant un potentiel pro-fibrosant sont augmentés dans le sérum et au niveau de la peau des patients sclérodermiques. Notamment les IL-1 $\beta$ , 2, 4, 6, 8, 10, 13, le TGF- $\beta$ , le PDGF et le TNF- $\alpha$  (Hasegawa et al., 1997).

### **1.3.3 La composante fibrotique**

La fibrose de la peau et des organes internes est la principale caractéristique des patients atteints de sclérodermie.

#### **1.3.3.1 La peau**

La peau est un organe complet, dont la principale fonction est de protéger le corps contre les agents externes (chimiques et biologiques). Elle recouvre en moyenne une surface de 1,5 à 2 m<sup>2</sup> et pèse environ 4 kg. La peau est composée de trois couches distinctes : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 4) (Marieb, 1999).



**Figure 4 : Schématisation de la peau.** La peau est composée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme, constitué de kératinocytes, est la couche la plus superficielle de la peau. Le derme, composé de fibroblastes et caractérisé par la présence d'une matrice extracellulaire et de vaisseaux sanguins, forme la deuxième couche. L'hypoderme, principalement formé d'adipocytes, représente la couche la plus profonde de la peau. ([www.etudiants-infirmiers.info](http://www.etudiants-infirmiers.info))

### 1.3.3.1.1 L'épiderme

L'épiderme, qui est le tissu épithélial de la peau, se divise en cinq couches distinctes: la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée. Les kératinocytes sont les principales cellules qui composent l'épiderme et la présence de desmosomes permet la formation de jonctions serrées (Marieb, 1999). Les kératinocytes se divisent dans la couche la plus profonde et se déplacent vers l'extérieur en se différenciant pour former les différentes couches de l'épiderme. Ce processus permet un renouvellement de l'épiderme sur une période de 26 à 42 jours (Halprin, 1972).

### **1.3.3.1.2 Le derme**

Le derme est le tissu conjonctif de la peau qui se divise en deux zones distinctes, soit la zone papillaire (tissu conjonctif lâche) et la zone réticulaire (tissu conjonctif dense). Les fibroblastes sont les principales cellules composant le derme. Ces cellules sont entourées d'une matrice extracellulaire formée de fibres de collagène, de fibres élastiques et de glycosaminoglycans. Cette composition permet des fonctions de résistance et de flexibilité. Le derme contient aussi des neurofibres, des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques (Marieb, 1999).

### **1.3.3.1.3 L'hypoderme**

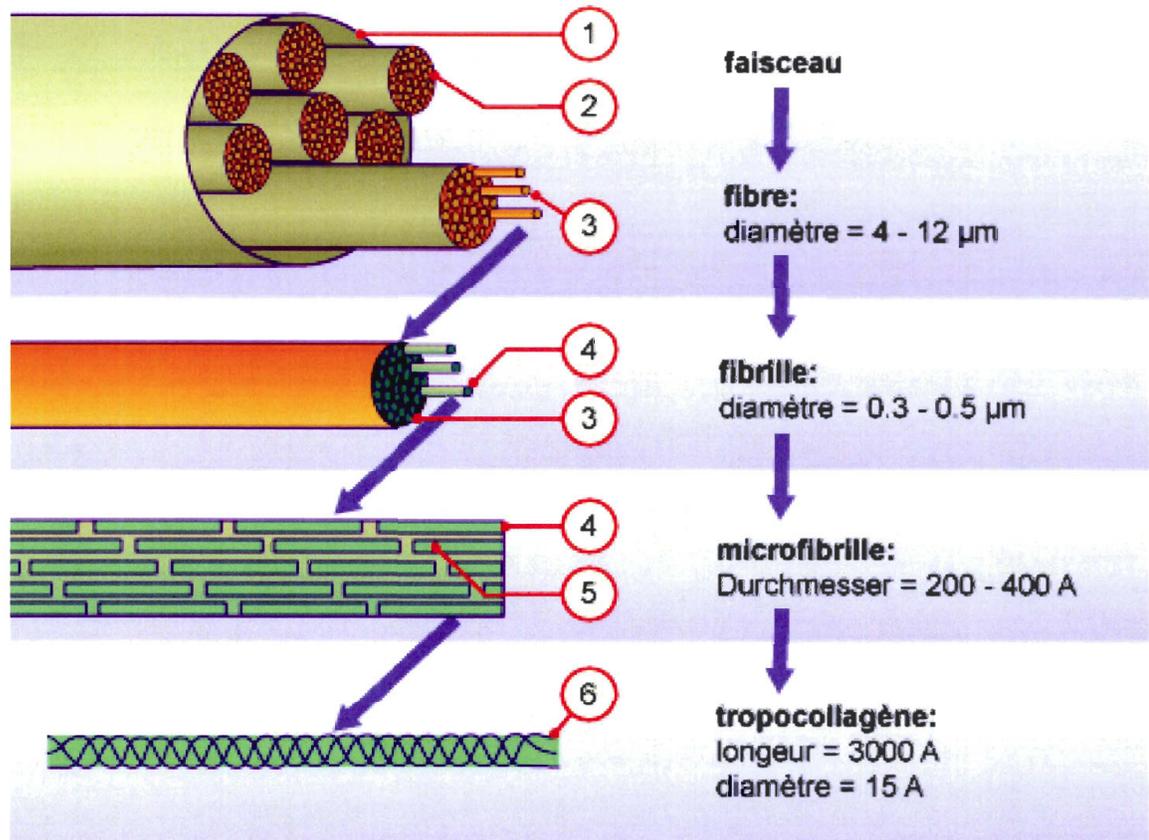
L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il se compose de tissu conjonctif lâche, d'adipocytes et d'un vaste réseau de capillaires. L'hypoderme assure les fonctions de protection des tissus profonds et de thermorégulation (Marieb, 1999).

### **1.3.3.2 La matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire (MEC) de la peau est constituée de plusieurs molécules regroupées en trois classes distinctes : les collagènes (collagène I et III), les glycoprotéines (élastine, fibrilline, fibronectine, ténascine) et les protéoglycans (décorine, lumican, fibromoduline) (Aumailley and Gayraud, 1998). Ces différentes molécules forment un vaste réseau entourant les cellules au niveau du derme qui permet l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules (Bhagal et al., 2005). Un déséquilibre entre le dépôt de la matrice extracellulaire et sa dégradation peut mener à des processus pathologiques telles les fibroses.

### 1.3.3.2.1 Le collagène type I

Jusqu'à maintenant, 26 différents types de collagène ont été identifiés, ce qui fait de la famille des collagènes la composante majeure de la matrice extracellulaire. Le collagène de type I est le plus abondant au niveau du derme (Gelse et al., 2003). Il est un hétérotrimère formé de deux chaînes  $\alpha 1$  et d'une chaîne  $\alpha 2$ . Ces chaînes, transcrites dans le noyau, sont envoyées dans le réticulum endoplasmique, afin de recevoir différentes modifications post-traductionnelles par les enzymes prolyl-hydroxylase et lysyl hydroxylase. Ces modifications vont permettre leur assemblage dans le cytoplasme avant qu'elles ne soient sécrétées dans l'espace extracellulaire sous forme de procollagène. Après la sécrétion dans l'espace extracellulaire, les propeptides N et C sont respectivement coupés par les enzymes spécifiques procollagène N-protéinase et procollagène C-protéinase. C'est une étape essentielle pour la formation de fibrille qui consiste à l'assemblage de plusieurs molécules de procollagène. L'assemblage de plusieurs fibrilles forme ensuite les fibres de collagène (figure 5) (Gelse et al., 2003).



**Figure 5 :Schématisation de la formation des fibres de collagène.** L'association de trois chaînes  $\alpha$  permet la formation de molécules de tropocollagène. L'assemblage de plusieurs molécules de tropocollagène va former des microfibrilles. Ces microfibrilles vont s'associer pour former des fibrilles de collagène. L'assemblage de ces dernières permettra la formation de fibres de collagène. (1 : Faisceau, 2 : Fibre, 3 : Fibrille, 4 : Microfibrille, 5 : Tropocollagène, 6 : Chaîne  $\alpha$ ) (www.unifr.ch)

#### **1.3.3.2.1.1 Le collagène de type I et la sclérodermie**

L'activité des promoteurs des gènes COL1A1 et COL1A2 (gènes codant pour les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du collagène de type I) serait augmentée dans les fibroblastes sclérodermiques comparativement aux fibroblastes de sujets sains (Kikuchi et al., 1992; Hitraya and Jimenez, 1996). De plus, les fibroblastes provenant de patients sclérodermiques produisent une plus grande quantité de collagène I et III comparativement aux fibroblastes de sujets sains (LeRoy, 1974). D'autres études ont montré qu'il y aurait une augmentation de l'expression des collagènes V, VI et VII au niveau des fibroblastes sclérodermiques (Peltonen et al., 1990; Rudnicka et al., 1994). Finalement, une augmentation de la lysyl-hydroxylase a été observée au niveau de la peau fibrosée des patients sclérodermiques. Une augmentation de cette enzyme pourrait contribuer à augmenter la dureté des dermes fibrotiques (van der Slot et al., 2003).

#### **1.3.3.2.2 Les métalloprotéinases**

Les métalloprotéinases (MMP) sont des endopeptidases zinc dépendantes qui effectuent principalement la dégradation des différentes composantes de la matrice extracellulaire (Nishijima et al., 2004). Elles sont importantes pour différents processus biologiques : l'embryogenèse, la réparation des tissus et l'angiogenèse. Cependant, une mauvaise régulation de leur expression ou de leur activité peut résulter en des processus pathologiques (Visse and Nagase, 2003). Chez l'humain, 23 MMP ont été identifiées et classées en cinq grandes familles: les collagénases (MMP-1, 8 et 13), les gélatinases (MMP-2 et 9), les stromélysines (MMP-3 et 10), les matrilysines (MMP-7, 11 et 26) et les membranaires (MMP-14, 15, 16, 17, 24 et 25). Cependant, certaines MMP ne font pas partie de ces familles (MMP-12, 19, 20, 21, 23, 27 et 28) (Nagase et al., 2006). Les MMP sont sécrétées sous forme de pro-enzyme et elles doivent être activées par des protéases pour exercer leur fonction (Nagase and Woessner, 1999).

### **1.3.3.2.1 La MMP-1**

La métalloprotéinase-1 ou MMP-1 fait partie de la famille des collagénases. Elle est produite sous une forme latente de 55-57 kDa et lorsqu'elle est activée, elle fait 42-47 kDa. Elle peut être produite par différents types cellulaires notamment par les fibroblastes, les cellules endothéliales, les monocytes et les macrophages (Beaudeau et al., 2003). La MMP-1 dégrade préférentiellement les collagènes natifs de type I, II, III, VII, X et XI, mais aussi la fibronectine, la laminine, la ténascine et la vitronectine (Sternlicht and Werb, 2001).

### **1.3.3.2.3 Les TIMP**

Les TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteinases) sont les inhibiteurs endogènes spécifiques de l'activité des métalloprotéinases. Il en existe quatre (TIMP-1, 2, 3 et 4) qui peuvent inhiber l'activité de toutes les MMP dans un rapport stoechiométrique de 1 :1 (Brew et al., 2000). Leur poids varie entre 21 et 29 kDa (Visse and Nagase, 2003). Ils sont importants pour la régulation du volume de la matrice extracellulaire.

### **1.3.3.2.4 L'activité des métalloprotéinases et la sclérodémie**

Auparavant, l'activité des MMP était connue comme étant inchangée chez les patients sclérodermiques (Uitto et al., 1979). Cependant, Takeda et son équipe ont publié, en 1994, qu'il y aurait une diminution de la production et de l'activité des collagénases au niveau des fibroblastes provenant de patients atteints de sclérodémie (Takeda et al., 1994). Ils ont aussi montré, plus particulièrement, qu'il y aurait une diminution de l'activité et de la production de MMP-1 pour ces mêmes fibroblastes (Takeda et al., 1994). De plus, une augmentation des anticorps anti-MMP-1 et anti-MMP-3, capables d'inhiber l'activité des MMP-1 et MMP-3 respectivement, a été observée chez les patients atteints de sclérodémie (Sato et al., 2003; Nishijima et al., 2004). D'autres études ont conclu qu'il y aurait une diminution de la quantité de MMP-13 et de l'activité des MMP-9 dans le sérum des patients sclérodermiques (Kikuchi et al., 2002; Asano et al., 2006). Finalement, il se produirait également une augmentation de TIMP-1 (dans le sérum et dans les cultures de fibroblastes de patients sclérodermiques) et de

TIMP-2 (dans le sérum des patients sclérodermiques), qui pourrait entraîner une diminution de l'activité des MMP et ainsi une diminution de la dégradation de la matrice extracellulaire (Kikuchi et al., 1995; Kirk et al., 1995; Yazawa et al., 2000).

### **1.3.3.3 L'activation des fibroblastes**

Les fibroblastes sont des cellules importantes dans la production, le dépôt et le remodelage de la matrice extracellulaire. Leur activation continue peut mener à des désordres fibrotiques comme la sclérodermie (Kulozik et al., 1990; Jelaska et al., 1996). L'activation des fibroblastes consiste principalement au changement dans l'expression de plusieurs gènes d'importance. En effet, les fibroblastes sclérodermiques en culture présentent une augmentation de l'expression des collagènes de type I, III, V, VI et VII, de même qu'une augmentation de l'expression de la fibronectine, la laminine, la ténascine et de d'autres protéoglycans et glycosaminoglycans (Falanga et al., 1987; Varga and Bashey, 1995). De plus, une diminution dans l'activité des collagénases et une surexpression des TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteinases) ont aussi été remarquées (Takeda et al., 1994, Kirk et al., 1995). Finalement, certaines équipes ont observé une surexpression des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) et de certains proto-oncogène (c-myc et c-myb) (Trojanowska et al., 1988; Piccinini et al., 1996; Ihn et al., 1997).

Par contre, le mécanisme d'activation des fibroblastes demeure encore inconnu jusqu'à ce jour. Cependant, deux grandes hypothèses ont été suggérées pour tenter d'expliquer ce phénomène.

D'un côté, une altération dans la régulation des gènes d'importance dans la sclérodermie serait responsable de l'activation autonome des fibroblastes. En effet, les fibroblastes sclérodermiques mis en culture conservent, pendant plusieurs passages, leur capacité à surproduire certaines composantes de la matrice extracellulaire (LeRoy, 1974).

D'autres équipes pensent plutôt que l'activation des fibroblastes nécessiterait la participation de d'autres types cellulaires comme, par exemple, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires. Le phénotype de surproduction de collagène des fibroblastes

sclérodermiques mis en culture serait instable et s'atténuerait après quelques passages (Vuorio et al., 1985). De plus, l'analyse des fibroblastes provenant de biopsies de patients sclérodermiques a montré que l'expression de plus de 1 800 gènes était dérégulée comparativement aux fibroblastes de sujets sains. Toutefois, l'analyse des mêmes fibroblastes sclérodermiques mis en culture a démontré une dérégulation moins importante dans l'expression des gènes (200 gènes), suggérant que l'environnement entourant les fibroblastes et la présence des autres types cellulaires sont importants afin d'observer l'expression complète du phénotype sclérodermique (Gardner et al., 2006).

## **1.4 Les cytokines et facteurs de croissance**

Différentes cytokines et facteurs de croissance sont reconnus comme pouvant jouer un rôle dans la sclérodermie. Parmi eux, le TGF- $\beta$  et le CTGF sont les plus connus pour leur potentiel pro-fibrosant (Denton and Abraham, 2001).

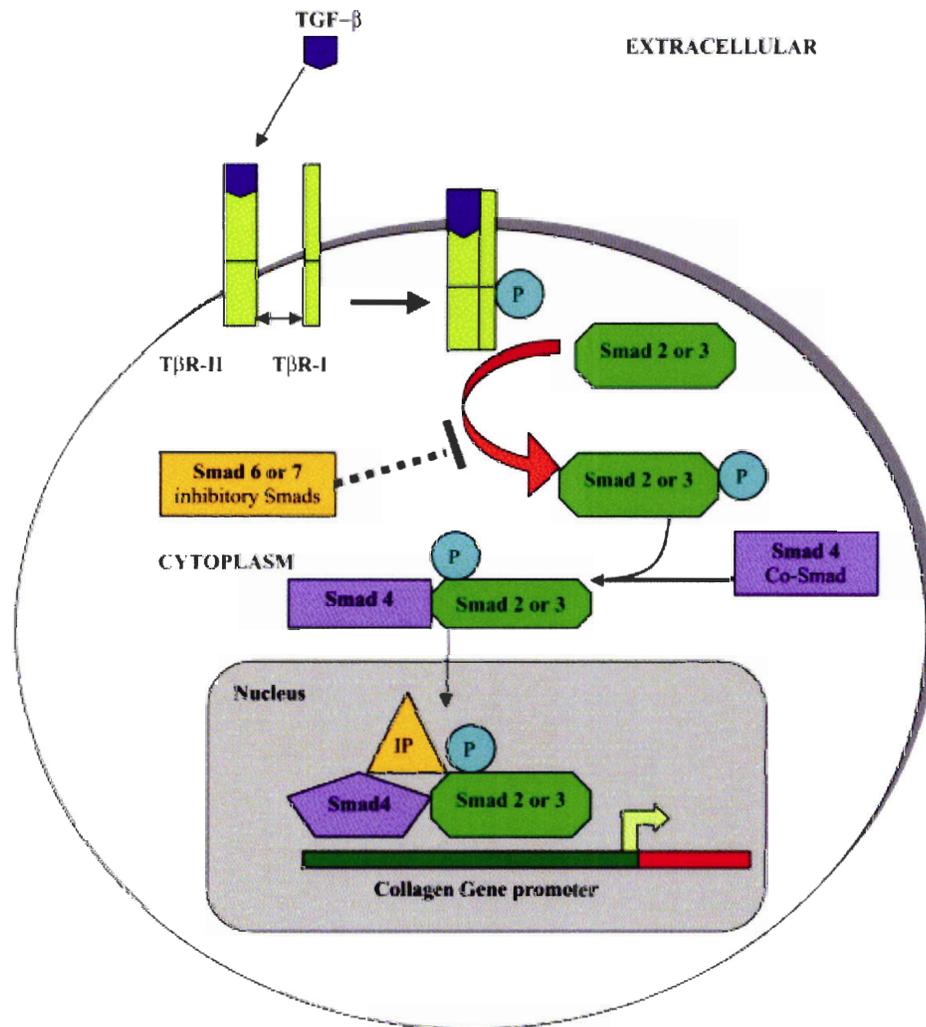
### **1.4.1 Le TGF- $\beta$**

Le TGF- $\beta$  (transforming growth factor) est un homodimère de 25 kDa dont 3 isoformes sont connus chez l'humain (TGF- $\beta$ 1, 2 et 3) (Piek et al., 1999). Il est produit et sécrété par différents types cellulaires notamment par les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Derynck and Feng, 1997). Le TGF- $\beta$  joue un rôle important dans le développement embryonnaire, la réponse immunitaire et la réparation des tissus à la suite de blessures (Clark and Coker, 1998). Pour exercer ses fonctions, le TGF- $\beta$  doit être activé, car il est produit et sécrété sous forme latente (LTGF- $\beta$ ) (Verrecchia et al., 2006).

#### **1.4.1.1 La voie du TGF- $\beta$**

L'homodimère TGF- $\beta$  se lie au récepteur de type II (TGF- $\beta$ RII) possédant une activité sérine/thréonine kinase constitutivement active. Ce complexe va recruter et phosphoryler le récepteur de type I (TGF- $\beta$ RI) et ainsi former un complexe pouvant activer une voie de

signalisation en aval. Les smad 2 et 3 peuvent alors se lier sur la partie TGF- $\beta$ RI du complexe afin d'être phosphorylées. Une fois activées, ces smad se lient à smad 4 pour transloquer au noyau et agir en tant que facteur de transcription. Les smad 6 et 7 sont des smad inhibitrices, qui en se liant au TGF- $\beta$ RI vont pouvoir empêcher la phosphorylation des smad 2 et 3 et ainsi empêcher la transcription des gènes (figure 6) (Derk and Jimenez, 2003).



**Figure 6 : La voie de signalisation du TGF- $\beta$ .** L'activation du récepteur sérine/ thréonine kinase entraîne la phosphorylation des smad (2 ou 3). Les smad activées peuvent se lier à smad 4 puis transloquer au noyau pour permettre l'expression de différents gènes. Les smad 6 et 7 sont des smad inhibitrices (Derk and Jimenez, 2003).

#### 1.4.1.2 Le TGF- $\beta$ et la Sclérodermie

Les caractéristiques des fibroblastes sclérodermiques ressemblent beaucoup à celles des fibroblastes sains ayant reçu un traitement au TGF- $\beta$  (Leroy et al., 1989; Massague, 1990). Le TGF- $\beta$  est connu pour augmenter la production des composantes de la matrice extracellulaire tels les collagènes de type I et III et la fibronectine (Varga et al., 1987; Roberts and Sporn, 1993). En plus d'augmenter la production de matrice extracellulaire, le TGF- $\beta$  diminuerait la dégradation de cette dernière en diminuant la production de MMP et en augmentant la production de leurs inhibiteurs, les TIMP (Varga and Trojanowska, 2008). Différentes études ont démontré une augmentation du TGF- $\beta$  dans le sérum des patients sclérodermiques, mais aussi au niveau de leur peau et de leurs poumons (Gruschwitz et al., 1990, Snowden et al., 1994).

Par contre, d'autres études ont conclu que les fibroblastes sclérodermiques et normaux produiraient une quantité similaire de TGF- $\beta$  (Needleman et al., 1990; Ihn et al., 2001). L'augmentation de la signalisation du TGF- $\beta$  serait plutôt due à une augmentation de l'expression des récepteurs TGF- $\beta$ RI et TGF- $\beta$ RII (Kawakami et al., 1998). De plus, Pannu et son équipe ont publié en 2004 qu'une augmentation du ratio TGF- $\beta$ RI : TGF- $\beta$ RII corrélait avec l'augmentation de la synthèse du collagène I chez les patients sclérodermiques (Pannu et al., 2004). Finalement, certaines études ont montré qu'il y aurait moins de smad 7 et plus de smad 3 phosphorylées au niveau des fibroblastes sclérodermiques (Dong et al., 2002; Mori et al., 2003).

#### 1.4.2 Le CTGF

Le « *connective tissue growth factor* » ou CTGF est un facteur de croissance de 36-38 kDa qui peut être produit par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Bradham et al., 1991; Derk and Jimenez, 2003). Il fait partie de la famille des CCN (CTGF/Cyr6/NOV) et il est important pour l'adhésion, la migration, la prolifération, la survie et la différenciation des cellules (Denton and Abraham, 2001). Il joue aussi un rôle important dans l'angiogenèse, la production des constituants de la matrice extracellulaire et l'organisation structurale du tissu conjonctif (Derk and Jimenez, 2003). Il est surexprimé dans

plusieurs désordres tels les chéloïdes, la fibrose rénale et la fibrose hépatique (Igarashi et al., 1996; Lasky et al., 1998; Paradis et al., 1999).

#### 1.4.2.1 Le CTGF et la Sclérodermie

Une augmentation du CTGF a été observée dans le sérum des patients atteints de sclérodermie. De plus, le taux sérique de CTGF corrélait avec l'étendue de la fibrose de la peau et des poumons (Sato et al., 2000). Une surexpression des ARNm du CTGF a aussi été remarquée au niveau des biopsies de peau provenant de patients ayant la maladie (Igarashi et al., 1995). Ces résultats ont été confirmés avec des fibroblastes de patients sclérodermiques (Igarashi et al., 1995).

Son rôle dans la sclérodermie n'a pas encore été clairement défini. D'une part, le CTGF aurait un rôle anti-fibrotique. En effet, Chen et al. ont montré une augmentation des MMP-1 et MMP-3 au niveau des fibroblastes normaux à la suite d'un traitement au CTGF (Chen et al., 2001).

D'autre part, le CTGF aurait un rôle pro-fibrotique. En effet, Le CTGF augmenterait la synthèse du collagène I et de la fibronectine par les fibroblastes (Frazier et al., 1996). De plus, l'utilisation d'ARN interférant l'expression du CTGF a montré une inhibition de la surproduction des collagènes de type I et III, normalement observé chez les fibroblastes sclérodermiques (Xiao et al., 2006). D'autres équipes ont conclu qu'une stimulation des fibroblastes avec du CTGF n'augmenterait pas la synthèse du collagène I (Gore-Hyer et al., 2003, Chujo et al., 2005). Cependant, si les fibroblastes sont préalablement traités avec du TGF- $\beta$  ou reçoivent un traitement au CTGF combiné à l'insuline, une augmentation de la production du collagène I et de la fibronectine est observée (Gore-Hyer et al., 2003, Chujo et al., 2005). De plus, l'utilisation d'anticorps neutralisant et d'ARN interférant le CTGF, inhiberait la production de collagène observée à la suite d'un traitement des fibroblastes avec le TGF- $\beta$  (Duncan et al., 1999). L'ensemble de ces résultats laisse donc penser que le CTGF pourrait être un médiateur pro-fibrotique en aval du TGF- $\beta$  (Gore-Hyer et al., 2003).

Une des hypothèses avancées serait que le TGF- $\beta$  induirait la fibrose et le CTGF permettrait de la maintenir, mais d'autres études sont nécessaires pour déterminer le rôle exact du CTGF dans la sclérodermie (Chujo et al., 2005).

## 1.5 Traitements

Aucun traitement ne peut guérir la sclérodermie, cependant, des corticostéroïdes peuvent être prescrits dans les cas d'inflammation sévère (Derk and Jimenez, 2003). De plus la D-pénicillamine est donnée pour diminuer la fibrose (Clements et al., 1999). Par contre, ces traitements étant peu efficaces, des traitements pour réduire l'atteinte des organes sont privilégiés afin de diminuer la morbidité et la mortalité des patients atteints de sclérodermie. Par exemple, des analogues de la prostacycline et des antagonistes de l'endothéline sont utilisés pour diminuer l'hypertension pulmonaire et préserver l'intégrité des poumons (Badesch et al., 2000; McLaughlin et al., 2005). De plus, l'utilisation d'IECA améliore la fonction cardiaque à long terme (Kahan et al., 1990). Dans certains cas, la greffe d'organes est privilégiée (Allanore and Kahan, 2006). Grâce aux progrès de la recherche, de nouvelles thérapies prometteuses pour traiter la fibrose sont présentement à l'étude : greffe de cellules souches hématopoïétiques combinée à une forte dose d'immunosuppresseurs, immunoglobulines intraveineuses, inhibiteurs de tyrosine kinase et inhibiteurs d'histone déacétylase (Amital et al., 2003; Distler et al., 2007; Huber et al., 2007; Vonk et al., 2008).

## 1.6 Les modèles d'études

Différents modèles d'étude sont utilisés pour étudier la fibrose qui est la principale caractéristique affectant les patients sclérodermiques. Certaines équipes utilisent des modèles animaux dont la fibrose apparaît naturellement comme chez les souris TSK-1 (Green et al., 1976). Ces souris présentent un épaississement de l'hypoderme et une hyperplasie sous-cutanée qui semblent être dus à une duplication intragénique du gène codant pour la fibrilline-1 (Jimenez et al., 1984; Siracusa et al., 1996; Baxter et al., 2005). D'autres équipes travaillent avec des souris dont la fibrose est induite par des agents chimiques (Bléomycine) (Yamamoto et al., 1999). Les injections de Bléomycine entraînent l'infiltration de monocytes, l'apparition

de différentes cytokines et la présence de fibrose au niveau du derme (Lakos et al., 2006). Cependant la fibrose dermique est restreinte et le phénotype sclérodermique est renversé après l'arrêt des injections (Varga and Trojanowska, 2008). Plus récemment, le développement des souris transgéniques (activation ou suppression d'un gène) permettent maintenant d'étudier l'importance et le rôle de certains gènes dans le développement de la fibrose (Sonnylal et al., 2007). Finalement, plusieurs équipes travaillent avec des fibroblastes provenant de biopsies de patients atteints de sclérodermie et cultivés en monocouche (Kuroda and Shinkai, 1997; Kawakami et al., 1998; Xiao et al., 2006).

La plupart des équipes qui étudient la sclérodermie grâce à la culture de fibroblastes humains de peau lésée ou lésionnelle ne tiennent pas compte de l'âge de la pathologie. En effet, au niveau clinique, la maladie évolue avec le temps (Nihtyanova and Denton, 2008). Cependant, certaines études effectuées tenaient compte de ce paramètre et des résultats différents ont été obtenus pour les différents stades de la maladie. Kuroda et Shinkai ont effectué une étude sur l'expression de certains gènes au niveau des fibroblastes, à différents stades de la maladie (stade précoce (moins d'un an d'apparition de la maladie), stade moyen (entre 2 à 4 ans) et stade tardif (plus de 6 ans)). Une dérégulation dans l'expression de gènes d'importance dans la sclérodermie (collagène I et III, décorine, MMP, TIMP) a été observée au niveau des fibroblastes provenant de patients au stade précoce et au stade moyen de la maladie comparativement aux fibroblastes provenant de sujets sains. Cependant, aucune différence n'a été observée dans l'expression de ces gènes entre les fibroblastes de stade tardif et les fibroblastes de sujets sains (Kuroda and Shinkai, 1997). Une autre étude a été effectuée avec des fibroblastes provenant de patients atteints de sclérodermie à deux stades différents d'évolution de la maladie (stade précoce (moins de 2,5 ans) et stade tardif (plus de 7 ans)). Alors que des différences au niveau du remodelage de la matrice extracellulaire ont été observées entre les fibroblastes de patients au stade précoce de la maladie et les fibroblastes provenant de sujets de sains, aucune différence significative n'a été reportée entre les fibroblastes provenant de patients au stade tardif de la maladie et les fibroblastes de sujets sains (Zurita-Salinas et al., 2004). Ces auteurs concluent qu'il existe des différences entre les fibroblastes sclérodermiques et les fibroblastes normaux et que ces différences seraient liées à l'âge de la pathologie.

Certaines équipes ont effectué des recherches en utilisant des fibroblastes provenant de peau d'apparence normale de patients atteints de sclérodermie. Ils ont trouvé que ces fibroblastes montraient aussi des différences lorsque comparés aux fibroblastes de sujets sains. Des anomalies dans certains processus cellulaires comme la formation de la matrice extracellulaire, la fibrillogenèse et l'angiogenèse étaient notables (Claman et al., 1991; Tan et al., 2005).

## 1.7 Les objectifs du projet

Malgré plusieurs hypothèses, l'étiologie et la pathogenèse de la sclérodermie demeurent encore inconnues jusqu'à maintenant. Plus particulièrement, il n'a pas encore été établi de façon formelle dans la littérature, si le phénotype fibrotique des fibroblastes provenant de patients sclérodermiques était dû à un stimulus exogène ou à une activation intrinsèque des cellules. La plupart des équipes qui étudient la composante fibrotique de la sclérodermie utilisent des cultures de fibroblastes humains en monocouche où les contacts cellules-cellules sont très nombreux. Cependant, ce modèle est peu représentatif de l'environnement réel des cellules : *in vivo* les fibroblastes sont entourés d'une matrice extracellulaire diminuant le nombre de contacts intercellulaires.

Dans notre laboratoire, nous avons développé un modèle de derme reconstruit par la méthode d'auto-assemblage. Ce modèle permet aux cellules d'être cultivées dans des conditions leur permettant de sécréter une matrice extracellulaire importante et ainsi de les garder dans un contexte très proche de celui rencontré *in vivo*. De plus, pour mieux comprendre le développement de la sclérodermie, nous utilisons différentes populations de fibroblastes. En effet, des fibroblastes de peau fibrosée (lésionnel) et des fibroblastes de peau d'apparence normale (non-lésionnel) provenant de patients atteints de sclérodermie diffuse depuis moins d'un an (stade précoce) ou depuis plus de dix ans (stade tardif) ont été utilisés pour ce projet. Des fibroblastes de sujets sains ont aussi été utilisés comme contrôle.

Notre hypothèse était que les fibroblastes provenant de biopsies sclérodermiques auraient des capacités différentes à sécréter et organiser une matrice extracellulaire *in vitro* pour reformer des dermes fibrotiques. De plus, leurs capacités à reformer des dermes fibrotiques varieraient selon l'âge de la pathologie, mais également selon le degré d'atteinte de la peau au moment du prélèvement de la biopsie.

Suite à cette hypothèse, notre premier objectif fut de déterminer, en fonction des paramètres de l'âge de la pathologie ou de l'état lésionnel ou non de la peau biopsiée, la capacité des différentes populations sclérodermiques à sécréter et déposer une matrice extracellulaire pour reconstituer un derme. Notre deuxième objectif consistait ensuite à

évaluer la réponse des cellules à deux facteurs de croissance (TGF- $\beta$ /CTGF) considérés comme très importants dans le développement de la fibrose (Denton and Abraham, 2001). Enfin, notre dernier objectif fut de déterminer si la présence à long terme d'une molécule dans l'environnement cellulaire pouvait engendrer des changements phénotypiques stables pouvant expliquer les résultats obtenus lors de la réalisation de nos deux premiers objectifs.

## **Chapitre 2**

### **Article**

## 2.0 Article

### THE FIBROTIC PHENOTYPE OF SYSTEMIC SCLEROSIS FIBROBLASTS VARIES WITH DISEASE DURATION AND SEVERITY OF SKIN INVOLVEMENT: RECONSTITUTION OF SKIN FIBROSIS DEVELOPMENT USING A TISSUE ENGINEERING APPROACH.

(Article accepté dans The Journal of Pathology)

#### Avant-propos

Les résultats concernant la mesure de l'épaisseur des dermes obtenus par génie tissulaire présentés dans cet article ont été obtenus conjointement par Ines Boufaied et moi-même, dépendamment des populations cellulaires étudiées. De plus, j'ai effectué les dosages de collagène I et de MMP-1. J'ai aussi dosé l'activité enzymatique des MMP. Finalement, j'ai étudié l'effet du CTGF sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec les différentes populations cellulaires.

#### Résumé

Pour vérifier la capacité intrinsèque des fibroblastes sclérodermiques à sécréter et organiser une matrice extracellulaire *in vitro*, des dermes ont été reconstruits avec des fibroblastes de peau lésée (L) ou non (NL) de patients atteints de sclérodermie diffuse depuis moins d'un an (stade précoce) ou depuis plus de 10 ans (stade tardif). Les fibroblastes L de stade précoce ont reconstruit des dermes plus minces que les dermes reconstruits avec des fibroblastes de sujets sains alors que les fibroblastes L de stade tardif ont reconstruits, en moyenne, des dermes plus épais que les contrôles. Ces résultats s'expliquent majoritairement par des variations dans l'équilibre synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire. De plus, le traitement des cellules avec du TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) augmente l'épaisseur de la plupart des dermes reconstruits. Finalement, l'ensemble des résultats indique que la sclérodermie serait un processus pathologique en plusieurs étapes et que le TGF- $\beta$  pourrait représenter un des facteurs impliqués.

**THE FIBROTIC PHENOTYPE OF SYSTEMIC SCLEROSIS FIBROBLASTS VARIES  
WITH DISEASE DURATION AND SEVERITY OF SKIN INVOLVEMENT:  
RECONSTITUTION OF SKIN FIBROSIS DEVELOPMENT USING A TISSUE  
ENGINEERING APPROACH.**

Marie-Pier Corriveau <sup>\*1</sup>, Inès Boufaied <sup>\*1</sup>, Julie Lessard<sup>1</sup>, Stéphane Chabaud<sup>1</sup>, Jean-Luc Senécal<sup>3,5</sup>, Tamara Grodzicky<sup>3,5</sup>, Suzanne Chartier<sup>4,5</sup>, Yves Raymond<sup>3,5</sup>, Véronique J. Moulin<sup>1,2</sup>

\* : Both authors have equally contributed

<sup>1</sup> Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale /LOEX, Hôpital du Saint-Sacrement du Centre Hospitalier Affilié Universitaire de Québec (CHA), Québec, Canada,

<sup>2</sup> Department of Surgery, Laval University, Québec, Canada,

<sup>3</sup> Laboratory for Research in Autoimmunity, Division of Rheumatology

<sup>4</sup> Division of Dermatology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

<sup>5</sup> Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Québec, Canada.

**Corresponding author:** Véronique Moulin, Ph.D.

Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale,  
Hôpital du Saint-Sacrement,  
1050 Chemin Ste-Foy, Québec, (Qc), Canada, G1S 4L8

**Phone number :** (418) 682-7693

**Fax number :** (418) 682-8000

**Email :** veronique.moulin@chg.ulaval.ca

**Key Words:** systemic sclerosis, tissue engineering, fibrosis, TGF $\beta$ , extracellular matrix

## ABSTRACT

**Objective.** To examine the pathophysiologic mechanisms of fibrosis in diffuse systemic sclerosis (SSc) using a tissue engineering approach.

**Methods.** Skin fibroblasts were isolated from lesional skin of SSc patients with a disease duration of less than one year (early-stage SSc) or more than 10 years (late-stage SSc). Fibroblasts were also isolated from non-lesional skin and compared with normal fibroblasts isolated from healthy adults. Cells were cultured using a tissue-engineering method to reconstruct a human dermis, and histologically observed. Dermal thickness was measured, as it reflects the global and intrinsic capacity of cells to reconstitute matrix. Collagen I, MMP-1 and MMP activity were evaluated. Cells were treated with TGF- $\beta$ 1 or CTGF during dermis formation to study their fibrogenic role. Clinical severity of skin involvement was measured by a modified Rodnan score.

**Results.** Thickness of the dermis generated with non-lesional, early-stage SSc fibroblasts was similar to normal cells. In contrast, reconstructed dermis from lesional, early-stage SSc fibroblasts and non-lesional, late-stage SSc cells were thinner while lesional, late-stage SSc fibroblasts made a thicker dermis. Dermis were always thicker when produced with TGF $\beta$ 1-treated cells, except when lesional, late-stage SSc fibroblasts from patients with high Rodnan skin scores were used. CTGF did not affect dermal thickness. Measurements of collagen I and collagenases in the culture medium of the various reconstructed dermis could explain some of the changes observed.

**Conclusion.** The fibrotic phenotype of SSc fibroblasts varies with disease duration and with severity of skin involvement and this is clearly visualized during in vitro dermis reconstruction.

## INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is an incurable connective tissue disease of unknown etiology. SSc is dominated by three major pathophysiologic phenomena [1]. First, widespread microvascular injuries cause ischemic manifestations such as Raynaud phenomenon. Second, chronic inflammation is characterized by tissue infiltration of immune cells. Third, fibrosis of the skin and internal organs is often prominent, causing dysfunction of tissues, leading to organ failure and death. The mechanisms at the origin of SSc fibrosis are largely unknown but have been linked to persistent activation of the genes coding for extracellular matrix (ECM) proteins in fibroblasts. The mechanisms leading to this constant activation are controversial. Dysregulation in the production of the cytokines modulating the functions of non pathological fibroblasts has been suggested [2,3], as well as a change in the response of pathological fibroblasts to normal stimuli [4,5].

We undertook this study to better understand the mechanisms at the origin of fibrosis in SSc. We selected a tissue engineering approach that has been previously used to study the pathogenesis of another fibrotic condition, the hypertrophic scar [6]. This method allows the culture of cells in a tissue-like environment nearly similar to *in vivo* conditions: cells become embedded into an ECM secreted and organized by these same cells. Furthermore, analyses are performed after two months of culture, a culture period longer than the short-term cultures usually performed [7,8], which is also more representative of SSc lesion formation. This tissue engineering method has allowed us to evaluate the global and intrinsic fibrotic capacity of the fibroblasts. Indeed, the total accumulation of ECM is dependent upon the balance between synthesis and degradation of ECM components, the latter process being regulated by matrix metalloproteinases (MMP). This equilibrium is very tightly regulated by a large number of molecules with numerous actions and mutual interactions such as collagens, fibronectin, MMP, and TIMP. The dermis generated with the tissue engineering approach is thus a direct consequence of the fibroblast phenotype and is independent of external stimuli.

In the present study, given the antinomic results in the literature concerning the fibrotic capacity of fibroblasts isolated from SSc, we hypothesized that this could be explained by a progression over time of the fibroblastic phenotype. Indeed, most studies thus far did not take into account disease duration, despite the finding that skin fibroblasts isolated from SSc

patients with different disease durations showed different phenotypes [4,8,9]. Furthermore, the few reports that have studied non-lesional skin, using histological [3] or biochemical [10,11] methods, have described the “clinically healthy” skin as histopathologically abnormal.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients**

Patients were recruited at the Connective Tissue Diseases Clinic, Division of Rheumatology, CHUM (Table 1) [12,13]. All patients met the American College of Rheumatology classification criteria for diffuse cutaneous SSc [14]. None of the patients had an overlap syndrome or mixed connective tissue disease. Each patient was classified according to the time elapsed between the onset of the first SSc symptom and the skin biopsies. Patients with less than 1 year or more than 10 years disease duration were classified as early-stage SSc or late-stage SSc, respectively. A modified Rodnan skin score, based on the degree of skin hidebinding/tethering [15], was determined. This parameter is a reflection of the severity of the skin fibrosis. A Rodnan score superior to 20/51 is considered very high and such patients show severe fibrotic lesions. No significant differences were determined between both categories of SSc populations (age or Rodnan score). Skin biopsy specimens were obtained from sclerodermatous skin (lesional) and clinically non-affected skin (non-lesional) areas.

As normal controls, one skin biopsy was obtained from each of 10 healthy Caucasian volunteers who were matched for age, gender and biopsy site with SSc patients, when possible. Two of the controls (H4 and H5) were younger, causing a statistically lower mean age in the normal control group. However, previous comparison of dermal thickness or protein secretion of normal control cell populations did not reveal any correlaton with age (data not shown).

All procedures involving patients were conducted according to the Helsinki Declaration and were approved by the Research Ethical Committees of CHA and CHUM.

### **Fibroblast isolation and culture**

Thirty human fibroblast populations were isolated from the skin biopsies of SSc patients and controls and were similarly isolated and cultured as described previously [16]. Cells were used between passages 4 and 6.

### **Self-assembly reconstructed dermis (RD)**

Fibroblasts were seeded in 6-well plates at a density of 56 000 cells per well [6]. Each well contained a filter-paper anchorage device to prevent contraction [17]. Fibroblasts were allowed to grow in the presence of 50 µg/ml of ascorbate (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) to form sheets. After approximately 35 days, two sheets were superposed and left to adhere for another 21 days. After these culture periods (8 weeks), fibroblasts had generated a thick tissue composed of cells and matrix, reminiscent of the human dermis *in vivo*. Each experiment included early- and late-stage SSc patients and was designed to compare the dermis produced by fibroblasts isolated from lesional or non-lesional skins of the same SSc patient with fibroblasts from healthy skins as control. Each experiment was performed in duplicate or triplicate and results were averaged over duplicate or triplicate.

### **Growth factors**

Where specified, recombinant human transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1, 1 ng/ml; eBioscience, San Diego, CA) or recombinant human connective tissue growth factor (CTGF, 2 ng/ml; RDI, MA) were added to cell culture media during the formation of the RD (8 weeks). Preliminary experiments demonstrated that these concentrations were the minimal concentration necessary to induce mitogenic effects or alpha smooth muscle actin expression in monolayer cultures after 7 days of treatment (data not shown).

### **Histology and morphometric analyses**

For histological analysis, biopsies from each RD after 8 weeks of culture were incubated with BrdU (10µM) for 24 hours before fixation with Bouin's solution and paraffin embedment. Microtome sections were stained with Masson's trichrome. From histologies, dermis thickness was measured using the Metaview Imaging System software by an evaluator blinded to the origin of the dermis.

### **Fibroblast count**

The number of cells present in the RD was determined using a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantification using picogreen according to [18]. Briefly, a constant surface area from each RD was incubated overnight at 56°C with Tris buffer containing proteinase K (1.6U/ml) and EDTA (10mM). After heat deactivation, each sample was incubated for 2h at 37°C with RNase A (1 mg/ml) before addition of Quant-iT Picogreen (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Fluorescence was read using a spectrofluorometer. DNA in each sample was evaluated using lambda DNA (Invitrogen) as standard. Cell numbers in each RD was derived using the mean amount of DNA per cell (7 pg DNA/cell) and the exposed surface of RD.

### **Proliferation and apoptosis**

Indirect immunofluorescence labeling was performed using mouse monoclonal anti-human BrdU and rabbit monoclonal anti-human active caspase-3 antibodies (BD Pharmingen) on frozen sections of RD as previously described [6], to quantitate proliferation and apoptosis, respectively.

### **Quantitative determination of collagen type I secretion**

Cell culture supernatants collected 24h before biopsy sampling were used. Culture media were not found to interfere at the dilutions used. Collagen type I secretion was indirectly evaluated using a Procollagen type I C-peptide enzyme immunoassay kit (Fisher Scientific, Ottawa, Canada), following manufacturer's instructions. The amount of free peptide stoichiometrically reflects the amount of secreted collagen type I molecules.

### **Total MMP activity**

Total MMP activity was determined in the same supernatant than for collagen assay using the SensoLyte™ 520 Generic MMP assay kit (Anaspec, San Jose, CA). This kit can detect simultaneously the activity of MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 and 14. Results reflect the overall MMP and metalloprotease inhibitor balance.

### **MMP-1**

MMP-1 was quantitated with a specific assay (Biotrak, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK), following manufacturer's instructions. The culture media used were not found to interfere at the dilutions used.

### **Statistical analysis**

Presented results were the average  $\pm$  standard deviation of the results obtained in several independent experiments using same conditions. Statistical differences were computed by the one sample Student's t-test when at least 3 populations where available. The results were considered significant when P-values were  $< 0.05$  [19].

## RESULTS

### Dermal thickness

We first investigated whether human fibroblasts isolated from non-lesional or lesional skin of patients with early- or late-stage SSc differed from healthy controls in their capacity to reconstitute a dermal matrix. In order to do so, the thickness of the reconstituted dermis (RD) was analyzed and compared (fig 7). Thickness of the RD made by early-stage SSc cells isolated from non-lesional skin was similar to that made by healthy control fibroblasts. In contrast, lesional early-stage SSc fibroblasts and non-lesional late-stage SSc fibroblasts generated RD that were thinner than those from healthy control fibroblasts. Finally, lesional late-stage SSc fibroblasts made RD significantly thicker than those obtained with healthy control fibroblasts.

Fibroblasts isolated from skin biopsies from five early-stage and five late-stage SSc patients were similarly cultured and the thickness of the resulting RD was compared with those obtained with cells from ten healthy donors (fig 8). Results were also correlated with the Rodnan score of the patient. To allow comparison between all the experiments, the ratio of the SSc patient value to that of a control in the same experiment was calculated, a ratio of 1 indicating no difference between the SSc patient and the control. As each SSc patient cell population was involved in two to five experiments under the same conditions but with different controls, the value used to represent a SSc patient in figures and statistical analyses is average over experiments.

Non-lesional early-stage SSc fibroblasts and fibroblasts from healthy controls generated RD of similar thickness (mean ratio $\pm$ SD:  $1.00 \pm 0.16$ ;  $p > 0.05$ ) (fig 8A). Lesional fibroblasts from early-stage SSc produced RD that were thinner than those produced by control fibroblasts (mean ratio:  $0.63 \pm 0.2$ ;  $p < 0.05$ ) (fig 8B).

The non lesional late-stage SSc fibroblasts (mean ratio $\pm$ SD:  $0.84 \pm 0.25$ ;  $p > 0.05$ ) (fig. 8C) were not statistically different from the controls. In contrast, when fibroblasts from late-stage lesional skin were used, RD were thicker than control (mean ratio:  $1.54 \pm 0.40$ ;  $p < 0.01$ ) (fig 8D). We however observed that RD of non lesional late-stage SSc fibroblasts of patients with a low Rodnan score ( $< 20/51$ ; L9, L10 and L11) were of similar

thickness than that of control fibroblasts, whereas those associated with a high Rodnan Score (>20/51; L7 and L8) were thinner (fig 8C). However, the number of patients in each group (3 vs. 2) was too low to perform a statistical comparison.

### **Cell number, growth and apoptosis**

To evaluate if the varying thickness observed was due to variations in cell numbers, we determined the total number of fibroblasts in the different RD. No significant difference in total fibroblast count was observed among the different RD tested (data not shown). Furthermore, very few cells were labeled with anti-BrdU antibodies (less than 10%) used as a proliferation marker, or by anti-caspase-3 antibodies (less than 1%) used as an apoptosis marker (data not shown). No significant difference was detected when the levels of proliferation or apoptosis between SSc and normal RD were compared.

### **Production of collagen type I**

To determine whether the variation observed in dermal thickness was dependent upon ECM protein production, the secretion of collagen type I was measured (fig 9A). Lesional late-stage SSc fibroblast populations displayed a significant increase in collagen type I secretion compared to control cells (mean ratio $\pm$ SD: 2.55  $\pm$  0.89;  $p < 0.05$ ). The 3 other types of fibroblasts were not statistically different from controls.

### **Total MMP activity**

Dermal thickness is the result of a balance between ECM production and degradation. Hence, quantification of the total MMP activity in culture supernatants was also performed (fig 9B). As with collagen secretion, variations between each cell population existed. Only supernatants from late-stage SSc lesional cells showed a statistically significant decrease compared to controls in their capacity to degrade matrix (mean ratio $\pm$ SD: 0.52 $\pm$  0.20;  $p < 0.05$ ).

### **MMP-1 production**

MMP-1 being the major MMP responsible for type I collagen degradation, its presence was also assessed (fig 9C). MMP-1 secretion by early-stage SSc cells and non-lesional late-stage SSc fibroblasts was not found to be statistically different in comparison to its secretion by control cells. In contrast, a strong and significant decrease in the amount of MMP-1 was observed in the supernatants of dermis reconstructed with fibroblasts from lesional late-stage SSc patients (mean ratio $\pm$ SD: 0.31 $\pm$ 0.07;  $p$ <0.05).

### **Action of TGF $\beta$ 1 or CTGF on fibrosis**

The presence of TGF $\beta$ 1 during RD formation significantly increased the thickness of all RD with the notable exception of dermis reconstructed with lesional late-stage SSc fibroblasts (fig 10A). A closer look at of the latter result showed that only the RD of patients with a high Rodnan score did not seem to be affected by the presence of TGF $\beta$ 1 (fig 10B). The presence of TGF $\beta$ 1 was not found to significantly increase the secretion of collagen type I in the RD made from fibroblasts isolated from healthy controls, lesional skin of early-stage SSc patients (non lesional skin was not statistically tested because only two cell populations were available) nor from lesional late-stage SSc patients (fig 10C). In contrast and despite the small number of cell populations RD made with non lesional late-stage SSc fibroblasts significantly secreted more collagen type I in the presence of TGF $\beta$ 1 (mean ratio $\pm$ SD: 2.15 $\pm$ 0.20;  $p$ <0.05). MMP-1 secretion (fig 10D) as well as total MMP activity (data not shown) were significantly decreased for controls and late-stage SSc patients when TGF $\beta$ 1 was present for all tested RD; although no statistical test was performed for early-stage SSc patients, a similar decrease was also observed for them.

Treatment during the whole period of dermis production with CTGF was not found to induce any significant difference on dermal thickness or collagen secretion (data not shown).

## DISCUSSION

We chose to study SSc fibroblasts in a tissue-like context, which is as close to the *in vivo* reality as possible, using a tissue-engineered model of reconstructed human dermis that allows long term cultures. This approach allowed us to analyze the global and intrinsic fibrotic capacity of SSc. Dermal thickness is the result of a balance between ECM protein production and degradation as well as a reflection of cell number. Our results demonstrated that, after 8 weeks in culture, proliferation and apoptosis rates of fibroblasts were very low, as observed in human skin *in vivo* [20]. Furthermore, the total number of cells in each RD being similar, the changes in RD thickness could only be explained by a remodeling of the ECM, which itself could only result from its intrinsic production and degradation rates.

To analyze the fibrotic capacity of the SSc fibroblast populations, collagen type I and MMP secretion were measured. Our results diverge from part, but not all, of the literature where cells were studied for only a short period of time in monolayer cultures [3-5,21,22], reflecting the drastic changes in phenotype that occur when cells are embedded in ECM [23]. Changes in collagen type I and MMP secretion rates could explain most of the changes observed in RD thickness according to cell origin. For example, the increased thickness of RD made with lesional late-stage SSc cells could be accounted for by both an increase in collagen secretion and a decrease of MMP activities. However, the strong decrease in thickness of RD generated by lesional early-stage SSc cells as well as by some of the non lesional late-stage SSc fibroblasts could not be explained by the protein secretion rates observed. Further studies will have to examine the role of other ECM molecules, such as tenascin and fibrillin-1, that are also involved in SSc pathophysiology [24-26].

Our results suggested that depending upon the lesional state, disease duration and severity of skin involvement, the capacity of SSc fibroblasts to reconstruct a dermis without any extrinsic stimuli varied. Non lesional early-stage fibroblasts reconstituted a dermis with a thickness that was similar to that made by normal fibroblasts. This observation indicates that, at the onset of SSc, fibroblasts from non-fibrotic skin display a normal phenotype and that the pathophysiologic process is restricted to lesional sites. *In vivo*, the skin of these lesional sites shows fibrosis. Paradoxically, RD obtained *in vitro* with cells isolated from these lesional regions were significantly thinner than dermis made by healthy cells or by non-lesional

fibroblasts from the same patient. We thus suggest that these cells require extrinsic stimuli to express their fibrotic phenotype. However, their incapacity to generate a dermis of the same thickness as that made by control cells demonstrated that sustained and important intrinsic changes had already taken place in these cell populations. The same conclusion could stand for non-lesional late-stage fibroblasts, but this time specifically for those associated with a high Rodnan score, whereas those with a low Rodnan score seemed to behave normally. The two populations from lesional late-stage SSc patients with high Rodnan score were the only cells that could reconstruct in vitro a fibrotic dermis with a significantly increased thickness. We thus hypothesize that these late-stage cells had accumulated intrinsic and sustained changes that allowed them to generate fibrosis independently of extrinsic stimuli. However, because of the small number of cell populations involved, this hypothesis would need to be verified.

The putative role of extrinsic stimuli was investigated by adding TGF $\beta$ 1 and CTGF, both key mediators of tissue fibrosis [27,28]. While CTGF was without any effect, TGF $\beta$ 1 did induce a significant increase in dermal thickness, with the notable exception of the two populations of lesional late-stage SSc cells associated with a high Rodnan skin score. These results strengthen our hypothesis that cells reconstituting a thinner dermis were responsive to extrinsic stimuli while lesional late-stage cells appeared to have developed beyond any such dependence.

In conclusion, development of skin fibrosis in SSc appears to result from progressive changes at the fibroblast level from a normal phenotype to a sustained and autonomous fibrotic phenotype. TGF $\beta$ 1 could be one of the extrinsic factors involved at the onset of the disease, but several other mediators such as GM-CSF [21], MCP-1 [29] or MIF [30] are also candidates. The use of our tissue engineering method permits a new vision of the development of fibrosis during SSc and will help to further analyze fibroblast phenotypic changes during SSc evolution. Furthermore, these results suggest that anti-fibrotic treatments of SSc would gain efficacy if they were tailored to disease duration and severity.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors acknowledge Dominique Mayrand for her helpful collaboration with this study and Dr Charles J. Roberge for critical review and very useful discussion.

## REFERENCES

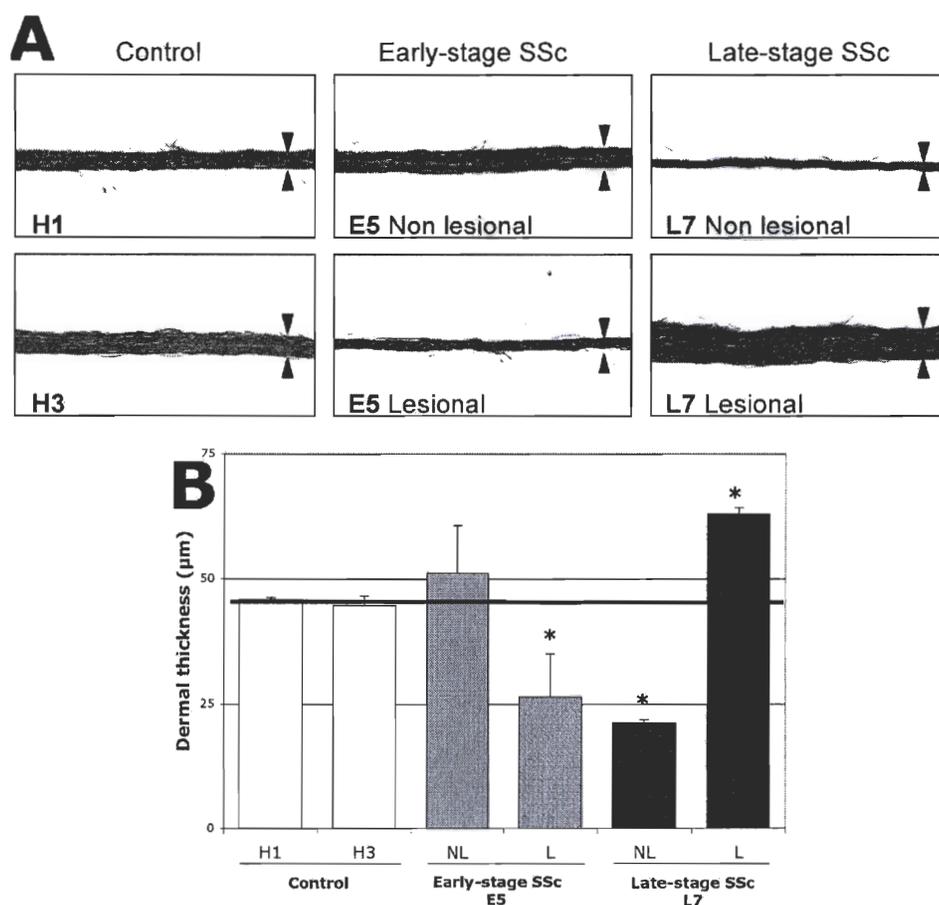
1. Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 2004;**140**:37-50.
2. Gardner H, Shearstone JR, Bandaru R, Crowell T, Lynes M, Trojanowska M *et al*. Gene profiling of scleroderma skin reveals robust signatures of disease that are imperfectly reflected in the transcript profiles of explanted fibroblasts. *Arthritis and rheumatism* 2006;**54**:1961-1973.
3. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A *et al*. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;**100**:12319-12324.
4. Zurita-Salinas CS, Krotzsch E, Diaz de Leon L, Alcocer-Varela J. Collagen turnover is diminished by different clones of skin fibroblasts from early- but not late-stage systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2004;**24**:283-290.
5. Kikuchi K, Hartl CW, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Direct demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis fibroblasts: insensitivity to TGF beta 1 stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;**187**:45-50.
6. Bellemare J, Roberge CJ, Bergeron D, Lopez-Valle CA, Roy M, Moulin VJ. Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scar. *The Journal of pathology* 2005;**206**:1-8.
7. Needleman BW, Choi J, Burrows-Mezu A, Fontana JA. Secretion and binding of transforming growth factor beta by scleroderma and normal dermal fibroblasts. *Arthritis and rheumatism* 1990;**33**:650-656.
8. Kuroda K, Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Archives of dermatological research* 1997;**289**:567-572.
9. Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK, Harlow LA *et al*. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. *Pathobiology* 1993;**61**:239-246.
10. Vancheeswaran R, Azam A, Black C, Dashwood MR. Localization of endothelin-1 and its binding sites in scleroderma skin. *The Journal of rheumatology* 1994;**21**:1268-1276.
11. Tan FK, Hildebrand BA, Lester MS, Stivers DN, Pounds S, Zhou X *et al*. Classification analysis of the transcriptome of nonlesional cultured dermal fibroblasts from systemic sclerosis patients with early disease. *Arthritis and rheumatism* 2005;**52**:865-876.
12. 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**:154-167.

13. Robitaille G, Henault J, Christin MS, Senecal JL, Raymond Y. The nuclear autoantigen CENP-B displays cytokine-like activities toward vascular smooth muscle cells. *Arthritis and rheumatism* 2007;**56**:3814-3826.
14. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis and rheumatism* 1980;**23**:581-590.
15. Steen VD, Medsger TA, Jr., Rodnan GP. D-Penicillamine therapy in progressive systemic sclerosis (scleroderma): a retrospective analysis. *Ann Intern Med* 1982;**97**:652-659.
16. Moulin V, Plamondon M. Differential expression of collagen integrin receptor on human fetal versus adult skin fibroblasts: implication in wound contraction during healing. *British Journal of Dermatology* 2002;**147**:886-892.
17. Vermette M, Trottier V, Menard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 2007;**28**:2850-2860.
18. Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal Biochem* 1997;**249**:228-238.
19. Scherrer B. *Biostatistique*. G Morin: Montreal, 1984.
20. Pietramaggiore G, Liu P, Scherer SS, Kaipainen A, Prsa MJ, Mayer H *et al*. Tensile forces stimulate vascular remodeling and epidermal cell proliferation in living skin. *Ann Surg* 2007;**246**:896-902.
21. Postiglione L, Montagnani S, Riccio A, Montuori N, Sciorio S, Ladogana P *et al*. Enhanced expression of the receptor for granulocyte macrophage colony stimulating factor on dermal fibroblasts from scleroderma patients. *The Journal of rheumatology* 2002;**29**:94-101.
22. Wang Y, Fan P-S, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis and rheumatism* 2006;**54**:2271-2279.
23. Kono T, Tani T, Furukawa M, Mizuno N, Kitajima J, Ishii M *et al*. Cell cycle analysis of human dermal fibroblasts cultured on or in hydrated type I collagen lattices. *Archives of dermatological research* 1990;**282**:258-262.
24. Kuroda K, Shinkai H. Decorin and glycosaminoglycan synthesis in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Archives of dermatological research* 1997;**289**:481-485.
25. Wallis DD, Tan FK, Kielty CM, Kimball MD, Arnett FC, Milewicz DM. Abnormalities in fibrillin 1-containing microfibrils in dermal fibroblast cultures from patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis and rheumatism* 2001;**44**:1855-1864.
26. Varga JA, Trojanowska M. Fibrosis in systemic sclerosis. *Rheumatic diseases clinics of North America* 2008;**34**:115-143; vii.
27. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2001;**27**:140-146.
28. Gore-Hyer E, Pannu J, Smith EA, Grotendorst G, Trojanowska M. Selective stimulation of collagen synthesis in the presence of costimulatory insulin signaling

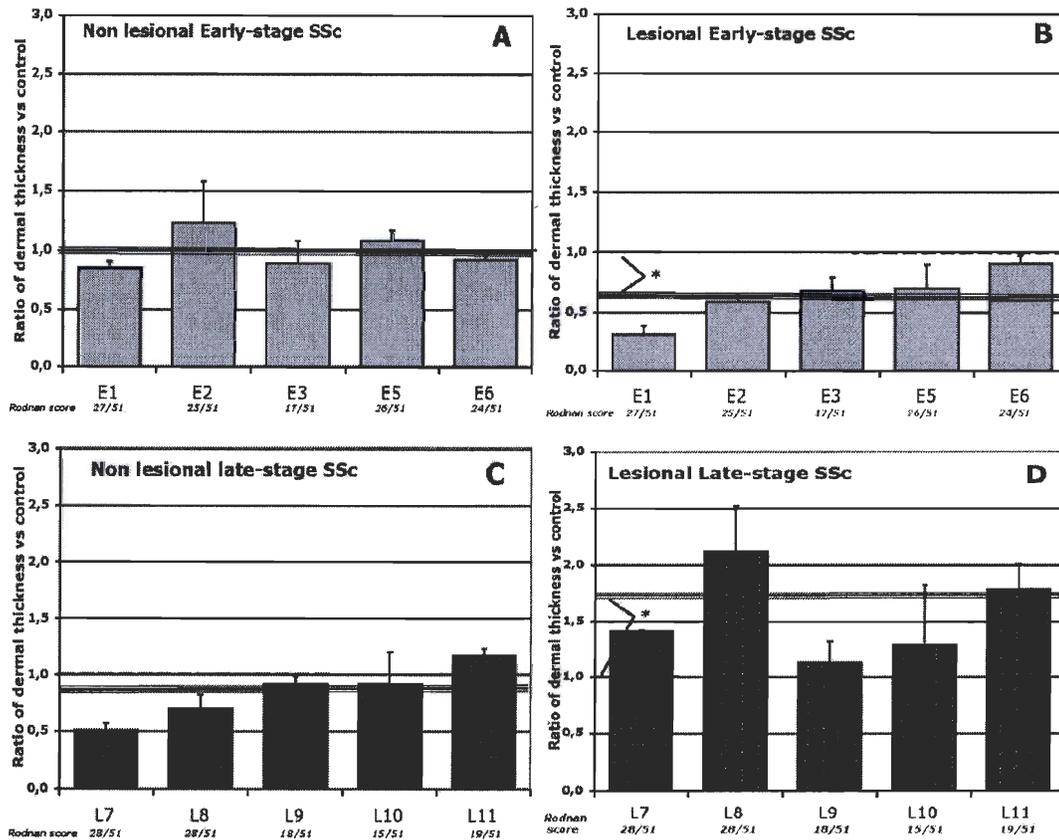
- by connective tissue growth factor in scleroderma fibroblasts. *Arthritis and rheumatism* 2003;**48**:798-806.
29. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999;**117**:159-165.
  30. Selvi E, Tripodi SA, Catenaccio M, Lorenzini S, Chindamo D, Manganelli S *et al*. Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases* 2003;**62**:460-464.

**Table 1** : Characteristics of patients with systemic sclerosis (SSc) and healthy controls.

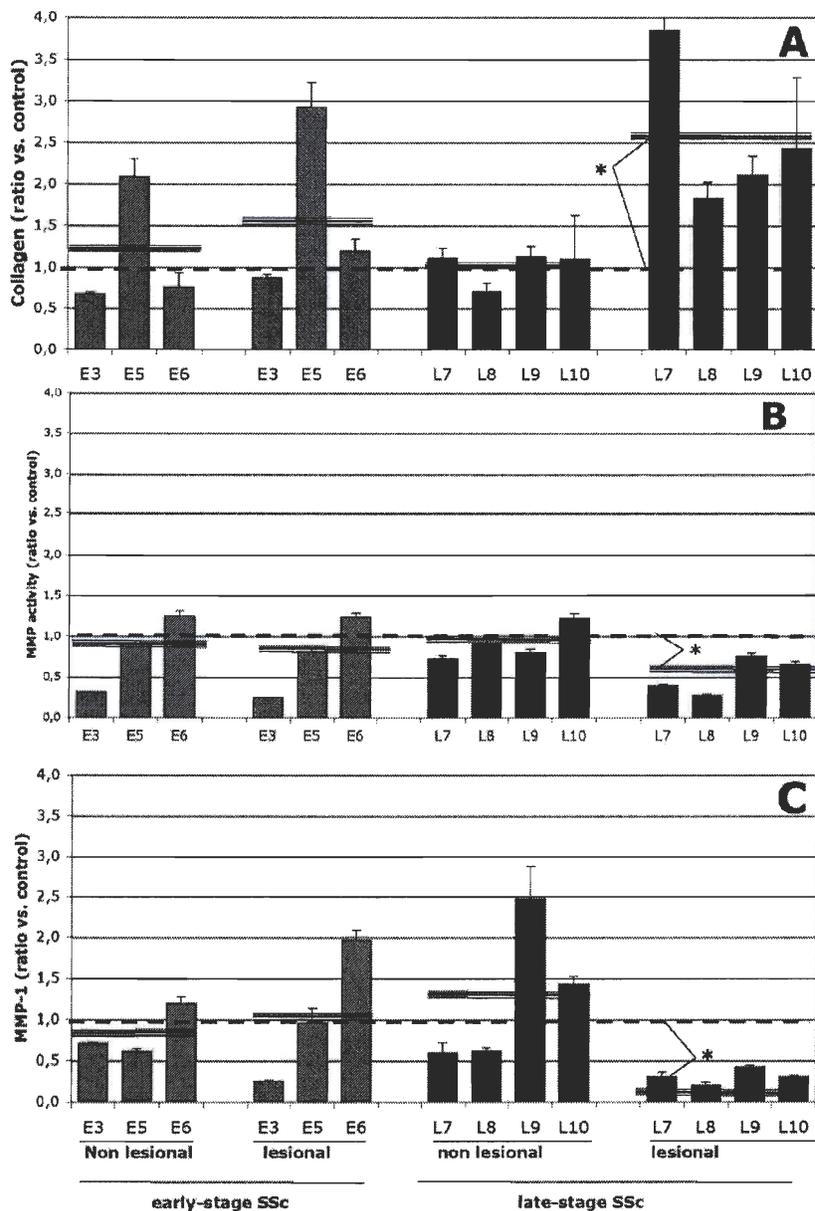
Patient ID	l/nl	Biopsy site	Sex	Age years	Diagnostic	Rodnan Score
<b>Early-stage SSc patients (age: 57.6 ± 9.48 Modified Rodnan skin score: 23.80 ± 3.54)</b>						
E1	l nl	Forearm Arm	F	53	Early SSc (7 months)	27/51
E2	l nl	Forearm Arm	M	76	Early SSc (4.5 months)	25/51
E3	l nl	Leg Arm	F	57	Early SSc (3 months)	17/51
E5	l nl	Forearm Buttock	F	50	Early SSc (11 months)	26/51
E6	l nl	Forearm Buttock	F	52	Early SSc (6 months)	24/51
<b>Late-stage SSc patients (age: 54.6 ± 11.36 Modified Rodnan skin score: 21.60 ± 5.39)</b>						
L7	l nl	Forearm Arm	F	39	Late SSc (10.5 years)	28/51
L8	l nl	Forearm Back	F	51	Late SSc (19 years)	28/51
L9	l nl	Forearm Buttock	F	72	Late SSc (19 years)	18/51
L10	l nl	Forearm Arm	F	49	Late SSc (12 years)	15/51
L11	l nl	Arm Upperarm	F	62	Late SSc (13 years)	19/51
<b>Healthy controls (age: 40.33 ± 12.31)</b>						
H1		Arm	F	42	Late : L; Early : E; Healthy : H; Lesional : l; Non lesional : nl Patients were untreated except E5 and E6 (methotrexate) and L10 (low dose penicillamine)	
H2		Arm	F	35		
H3		Arm	F	49		
H4		Arm	F	21		
H5		Arm	F	22		
H6		Arm	M	35		
H7		Arm	F	55		
H9		Breast	F	48		
H10		Breast	F	56		



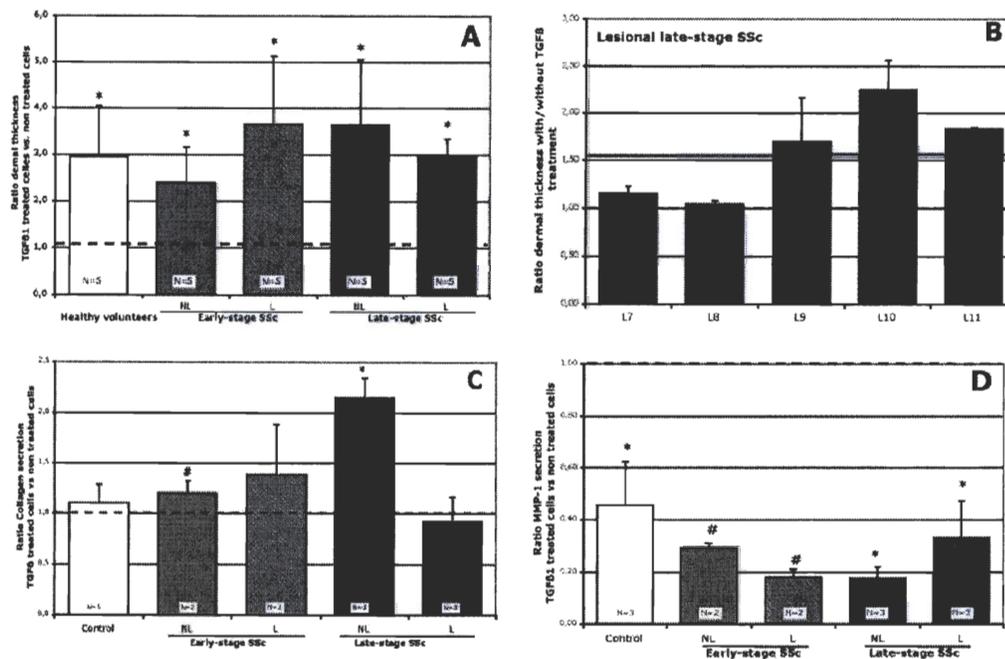
**Figure 7.** Representative experiment showing thickness of reconstructed dermis (RD) using tissue engineering method with two control fibroblast populations (H1 and H3), early-stage SSc patient cell population (E5) from non-lesional biopsy (NL) or lesional biopsy (L), late-stage SSc patient cell population (L7) from non-lesional biopsy (NL) or lesional biopsy (L). A: Histology of RD cultured for 8 weeks. Microtome sections were stained with Masson's Trichrome and dermal thickness (arrowheads) was measured using Metaview Imaging System software. B: Dermal thickness of RD. Values are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of a representative experiment (N=3). Black line represents mean of results obtained with control cells. Statistical analysis was performed using Student's t-test to compare means of triplicate SSc thickness vs controls: \*: P < 0.05.



**Figure 8:** Ratio of the thickness of reconstructed dermis (RD) of each SSc cell population compared with control fibroblasts used in the same experiment. A: non lesional early-stage SSc cells vs control cells; B: lesional early-stage SSc cells vs control cells C: non lesional late-stage SSc cells vs control cells; D : lesional late-stage SSc cells vs control cells. Dotted line represents a ratio of 1 (similar thickness of the RD reconstructed with SSc and control fibroblasts) and triple line, the mean of all the five SSc patient's RD of each type of fibroblasts. The one-sample Student t test was performed for each of the 4 types of fibroblasts to test if the mean ratio was equal to 1, \* :  $P < 0.05$ .. Rodnan scores reflect the clinical evaluation of the fibrosis: a high Rodnan score ( $>20/51$ ) is considered very high and such patients show severe fibrosis lesions.



**Figure 9.** Collagen type I (A), MMP activity (B) and MMP-1 (C) quantification in supernatants of reconstructed dermis (RD). Results are expressed as a ratio vs control. Dotted line represents a ratio of 1 (similar measure on the RD reconstructed with SSc and control fibroblasts) and triple line, the mean of all the combined columns for each category. When possible, the one-sample Student t test was performed for each of the 4 types of fibroblasts to test if the mean ratio was equal to 1, \* :  $P < 0.05$ .



**Figure 10:** TGFβ1 action on dermal reconstruction. A: Mean of ratios of thickness of the reconstructed dermis (RD) of each type of fibroblasts treated or not with TGFβ1 (1ng/ml) during dermis formation. Results represent mean of results obtained with 5 cell populations. B: Ratio of dermal thickness from each lesional late-stage SSc cell population treated or not with TGFβ1. C: Collagen secretion and D: MMP-1 secretion ratio of each type of fibroblasts treated or not with TGFβ1. Results are mean obtained for N=2 to 5 cell populations in each category. Dotted lines represent a ratio of 1 (similar measure in the presence or absence of TGFβ1) and triple line (in B) represents the mean of the five lesional late-stage SSc fibroblasts. N is the number of cell population included in the calculation and statistical test of the mean ratio; When possible, the one-sample Student t test was performed for each of the 4 types of fibroblasts to test if the mean ratio was equal to 1, \* :  $P < 0.05$ . #: means that no statistical analyses can be performed as N inferior to 3.

**Chapitre 3**  
**Résultats complémentaires**

### 3.0 Résumé

Ensuite, nous avons tenté d'expliquer pourquoi les fibroblastes L au stade tardif ont reconstruits des dermes plus épais que les dermes contrôles, en évaluant la quantité de TGF- $\beta$ 1 sécrétée par les différentes populations de fibroblastes. De plus, pour étudier l'effet de d'autres facteurs de croissance sur les fibroblastes sclérodermiques, nous avons reconstruit des dermes avec des fibroblastes ayant été pré-traités pendant 4 semaines avec du TGF- $\beta$  avant de reconstruire des dermes en présence de CTGF. Nous avons aussi reconstruit des dermes en présence de CTGF et d'insuline. Finalement, nous avons voulu déterminer si la présence à long terme du TGF- $\beta$ 1 pouvait être responsable des changements phénotypiques stables des fibroblastes sclérodermiques au stade précoce, en traitant les cellules pendant 4 ou 6 semaines avant de reconstruire des dermes par auto-assemblage. Les résultats obtenus dans ce chapitre sont préliminaires et des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour les confirmer.

## **3.1 Matériel et méthodes**

### **3.1.1 Culture de fibroblastes**

Les populations de fibroblastes sont les mêmes que celles utilisées dans le chapitre 2 de ce mémoire (voir tableau 1).

### **3.1.2 Dermis reconstruits par auto-assemblage**

Les fibroblastes pré-traités ou non avec du TGF- $\beta$ 1 ont étéensemencés dans des plaques 12 puits (28 000 cellules/puits) contenant des ancrages de papier Wattman. Les cellules ont été cultivées avec du DME 10% SVF contenant 50  $\mu$ g/ml d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada), pour favoriser la formation de feuillets manipulables. Après 35 jours de culture, les feuillets ont été empilés 2 à 2, puis remis en culture pendant 21 jours pour permettre leur adhésion. À la fin des 56 jours de culture, les dermes ont été fixés au Bouin pendant 24 heures.

### **3.1.3 Histologie et mesure d'épaisseur des dermes reconstruits**

Pour chaque derme reconstruit, 2 biopsies ont été prélevées, enrobées dans la paraffine, coupées au Microtome (5  $\mu$ m) et colorées au trichrome de Masson. Pour chaque biopsie, 10 mesures d'épaisseur ont été effectuées avec le logiciel Metaview Imaging System, pour un total de 20 mesures par derme.

### **3.1.4 Pré-traitement des fibroblastes avec le TGF- $\beta$ 1**

Pour étudier l'effet sur les fibroblastes de la présence à long terme du TGF- $\beta$ 1, des fibroblastes ont étéensemencés dans des plaques 6 puits (20 000 cellules/puits) et cultivés dans du DME 10% SVF. Pendant 4 semaines, les cellules ont été cultivées en monocouche, en

présence de 1 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 (eBioscience, San Diego, CA, USA), puis trypsinées et réensemencées lorsqu'elles étaient à confluence.

### **3.1.5 Traitement des fibroblastes**

Différents facteurs de croissance : TGF- $\beta$  (1 ng/ml) (eBioscience, San Diego, CA, USA), CTGF (2 ng/ml) (RDI, Concord, MA, USA), insuline (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada), ou une combinaison insuline (10 ng/ml) et CTGF (2 ng/ml), ont été ajoutés au milieu de culture des fibroblastes afin d'étudier leur effet.

### **3.1.6 Prolifération cellulaire**

L'effet de différents facteurs de croissance sur la prolifération cellulaire des fibroblastes a été évalué par le test MTT. Ce test est basé sur le principe que la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes réduit l'anneau de tétrazolium du sel de tétrazolium, le MTT (Bromure de 3-(4,5-Diméthiazol)-2,5-Diphényl Tétrazolium), en formazan. Par cette réduction, la molécule passe de la couleur jaune à la couleur bleue, et ce, de façon proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes (Mosmann, 1983; Denizot and Lang, 1986). Les fibroblastes ont été préalablement ensemencés dans des plaques 96 puits (20 000 cellules/puits) et cultivés dans du milieu DME 10% SVF. Différents facteurs de croissance ont été ajoutés au milieu de culture 24 heures après l'ensemencement des cellules. Après 24 heures de traitement, les cellules ont été rincées avec du PBS (100  $\mu$ l/puits) et 125  $\mu$ l du réactif MTT (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules ont ensuite été remises à 37°C et 8% CO<sub>2</sub> pour trois heures. Finalement, les surnageants ont été aspirés et les cristaux ont été dissous dans 100  $\mu$ l d'isopropanol. Une lecture au spectrophotomètre (entre 540 et 700 nm) a été effectuée.

### **3.1.7 Évaluation du collagène I sécrété**

#### **3.1.7.1 Précipitation des protéines à l'ammonium persulfate**

Une purification partielle des protéines présentes dans les surnageants a été effectuée par la méthode de précipitation à l'ammonium persulfate (Trelstad et al., 1976). Cette purification a été réalisée pour quantifier la quantité de collagène I sécrétée par les fibroblastes suite à leur traitement avec différents facteurs de croissance. Les fibroblastes ont été ensemencés dans des plaques 12 puits (12 000 cellules/puits) et cultivés dans du milieu DME 10% SVF. Lorsque les cellules étaient à confluence, un mélange de 50 µg/ml d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada), de 50 µg/ml de β-aminopropionitrile (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) et de différents facteurs de croissance ont été ajoutés au milieu de culture. Après 48 heures de traitement, 800 µl de surnageant ont été récupérés. Par la suite, 16 µl de Complete 50X (Hoffman-La Roche Ltd, Mississauga, ON, Canada), et 544 µl d'ammonium persulfate (Bio-Rad Laboratories (Canada), Ltd, Mississauga, ON, Canada), pour avoir une précipitation à 40%, ont été ajoutés aux surnageants. Les surnageants ont été placés sous agitation toute une nuit à 4°C, puis centrifugés à 40 000g pendant 30 minutes à 4°C. Les précipités récupérés ont été dissous dans 50 µl de PBS Complete (Hoffman-La Roche Ltd, Mississauga, ON, Canada), et 5 µl de la solution ont été conservés pour le dosage des protéines. Finalement 45 µl de tampon d'échantillon 2X (Tris, Glycérol, SDS) ont été ajoutés aux précipités dissous, puis ces derniers ont été chauffés à 95°C. Afin de permettre de rapporter la quantité de protéines sécrétées par une quantité fixe de cellules, les cellules de chaque puits ont été trypsinées le jour de la récolte du surnageant, puis un compte au Coulter a été effectué.

#### **3.1.7.2 Dosage des protéines par la méthode Bradford**

Les échantillons protéiques ont été dosés par la méthode de Bradford. Cette méthode consiste au changement de spectre d'absorption du bleu de Coomassie suite à sa liaison aux acides aminés aromatiques et aux résidus hydrophobes des acides aminés (Compton and Jones, 1985). Le changement d'absorbance passe de 465-470 nm à 595 nm de façon proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon (Reisner et al., 1975).

### 3.1.7.3 SDS-Page et Immunobuvardage de type Western

Des gels de 7,5% polyacrylamide (Bio-Rad Laboratories (Canada), Ltd, Mississauga, ON, Canada) et d'une épaisseur de 1,5mm ont été fabriqués afin d'évaluer la quantité de collagène I dans les échantillons protéiques. Les échantillons contenant une quantité fixe de protéines, du bleu de bromophénol (1/25, Bio-Rad Laboratories (Canada), Ltd, Mississauga, ON, Canada) et du  $\beta$ -mercaptoéthanol (1/20, Bio-Rad Laboratories (Canada), Ltd, Mississauga, ON, Canada) ont été déposés dans les puits. Une tension électrique de 125V-200V a été appliquée et les protéines ont migrées dans le gel selon leur poids moléculaire. L'application d'une tension électrique de 10V pendant une nuit complète à 4°C a permis aux protéines dans le gel d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). Les membranes ont été bloquées (1 heure) avec du PBS 0,05% Tween + 5% lait, puis hybridées (1 heure) avec un anticorps primaire polyclonal anti-collagène I (1/25 000, Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA, USA). Ensuite elles ont été lavées 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS 0,05% Tween. Finalement les membranes ont été hybridées (1 heure) avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase (1/2000, Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, IL, USA), lavées 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS 0,05% Tween et révélées avec le Super Signal (Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, IL, USA). Les signaux chimioluminescents ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ.

### 3.1.8 Sécrétion de TGF- $\beta$ 1

La quantité totale de TGF- $\beta$ 1 dans les surnageants de culture gardés pendant 48 heures en présence des dermes cultivés depuis 56 jours a été évaluée par la technique d'immunoessais (Promega Corporation, Madison, WI, USA). L'anticorps utilisé dans cet immunoessais reconnaît seulement la forme active du TGF- $\beta$ 1. Afin de doser la quantité totale de TGF- $\beta$ 1, les surnageants ont été préalablement acidifiés pour activer le TGF- $\beta$ 1 présent sous forme latente.

### 3.1.9 Analyses statistiques

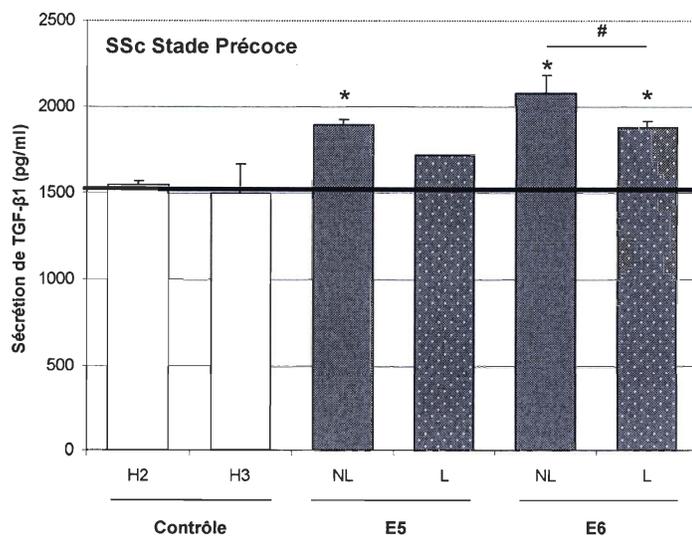
La plupart des résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. Lorsque le nombre de données était suffisant, une analyse statistique avec le test de *t* Student a été effectuée. Les résultats ont été considérés significatifs pour une valeur de  $P < 0.05$  (Scherrer, 1984).

## **3.2 Résultats**

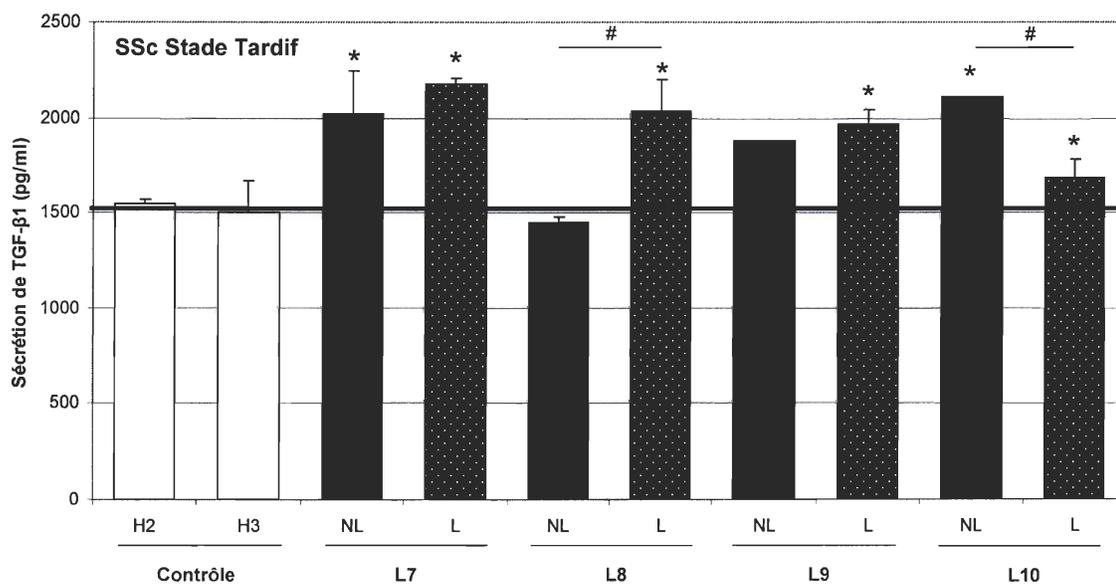
### **3.2.1 Quantité de TGF- $\beta$ 1 sécrétée par les fibroblastes**

La quantité de TGF- $\beta$ 1 sécrétée par les différentes populations de fibroblastes a été dosée par immunoessais. Des surnageants de culture gardés pendant 48 heures en présence des dermes cultivés depuis 56 jours ont été utilisés pour les dosages. La majorité des populations de fibroblastes sclérodermiques, tant au stade précoce qu'au stade tardif, sécrètent plus de TGF- $\beta$ 1 que les fibroblastes de sujets sains (Figure 11). De plus, certaines populations de fibroblastes non-lésionnels (E6 et L10) sécrètent significativement plus de TGF- $\beta$ 1 que les populations de fibroblastes lésionnels provenant des mêmes patients, alors que les fibroblastes lésionnels provenant du patient L8 sécrètent plus de TGF- $\beta$ 1 que les fibroblastes non-lésionnels.

A



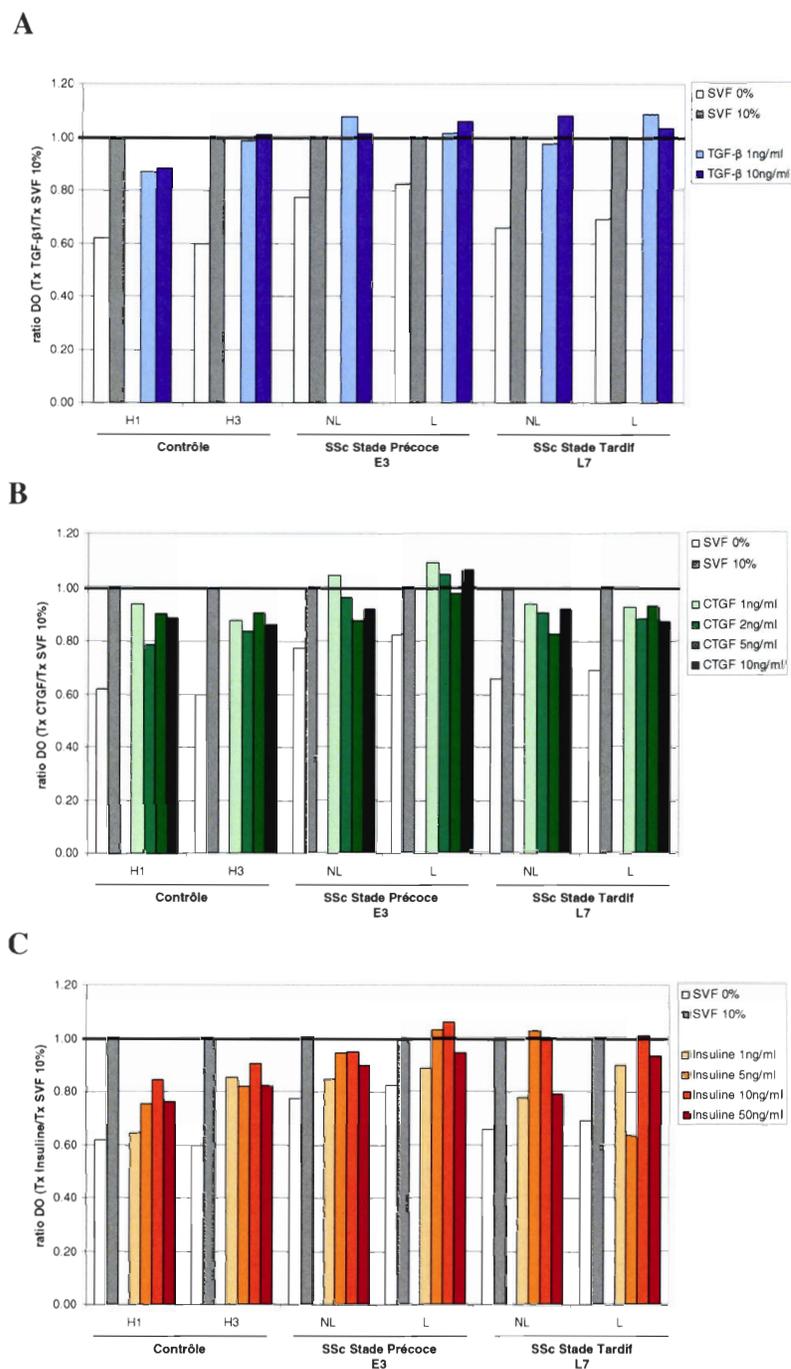
B



**Figure 11: Dosage de la quantité de TGF-β1 sécrétée par les différentes populations de fibroblastes.** Les graphiques présentent la quantité de TGF-β1 sécrétée, en pg/ml, par les fibroblastes lésionnels (L), les fibroblastes non-lésionnels (NL) et les fibroblastes de sujets sains (H2 et H3). La ligne noire représente la concentration moyenne de TGF-β1 sécrétée par les fibroblastes de sujets sains. Le graphique **A** montre les résultats obtenus avec les fibroblastes au stade précoce de la maladie et le graphique **B**, les résultats obtenus avec les fibroblastes au stade tardif de la maladie. \* :  $p < 0,05$  vs contrôle (H2 et H3); # :  $p < 0.05$  entre les deux colonnes désignées par le court trait noir. N=1

### **3.2.2 Effet des différents facteurs de croissance sur la prolifération cellulaire**

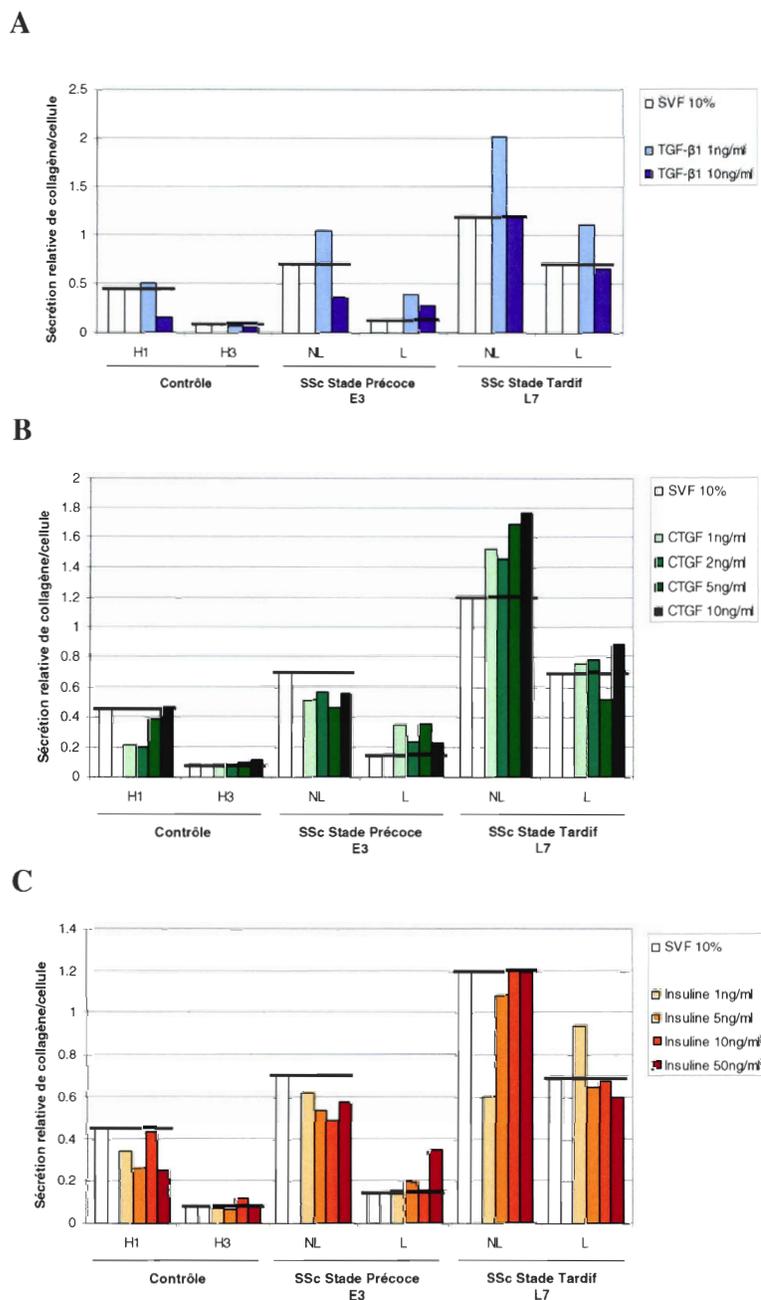
L'effet des différents facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , CTGF et insuline) sur la prolifération cellulaire a été évalué par le test MTT. Ce test a permis d'évaluer et de comparer la viabilité des populations cellulaires ayant reçu un traitement pendant 24 heures à celles n'ayant reçu aucun traitement. Les facteurs de croissance ont été testés dans un milieu contenant 10% SVF, ce milieu étant utilisé pour la réalisation des tissus reconstruits. L'ajout d'un test sans SVF (SVF 0%) a permis de vérifier la réponse des cellules (contrôle négatif). Aux concentrations testées, les différents facteurs de croissance semblent n'avoir aucun effet sur la prolifération cellulaire des différentes populations de fibroblastes (Figure 12).



**Figure 12 : Effet des différents facteurs de croissance sur la prolifération cellulaire** Les graphiques présentent le ratio des densités optiques (DO) obtenues avec les populations ayant été traitées pendant 24 heures comparativement aux densités optiques (DO) obtenus avec celles n'ayant reçu aucun traitement (SVF 10%). La ligne noire représente un ratio de 1. L'effet des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ /CTGF/insuline), à différentes concentrations, a été testé sur les populations cellulaires : fibroblastes non-lésionnels (NL) et lésionnels (L) au stade précoce et au stade tardif de la maladie et fibroblastes de sujets sains (H1 et H3). Le graphique **A** montre les résultats obtenus après le traitement avec différentes concentrations de TGF- $\beta$ 1, le graphique **B**, ceux obtenus après le traitement avec le CTGF et le graphique **C**, les résultats obtenus après le traitement avec l'insuline. N=1

### 3.2.3 Effet des différents facteurs de croissance sur la quantité de collagène I sécrétée

L'effet des différents facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , CTGF et insuline) sur la quantité de collagène I sécrétée a été évalué en traitant les populations de fibroblastes pendant 48 heures avec différentes concentrations de facteurs de croissance en présence de 10% SVF. Les surnageants ont ensuite été récupérés et leur contenu en collagène I a été évalué par immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus ont été exprimés en quantité relative de collagène I sécrétée/cellule. Le traitement des différentes populations de fibroblastes sclérodermiques avec 1 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 semble augmenter leur quantité de collagène I sécrétée (4 fois sur 4), alors qu'un traitement avec 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 semble avoir peu d'effets sur la quantité de collagène I sécrétée. Dans 3 cas sur 4, aucune différence n'a pu être observée alors que dans 1 cas (E3 NL), on peut noter une diminution de la quantité de collagène sécrétée en présence de TGF- $\beta$ 1. De la même façon, peu d'effets ont été observés à la suite du traitement des fibroblastes de sujets sains avec du TGF- $\beta$ 1 quelque soit la concentration testée (Figure 13a). Ces résultats pourraient s'expliquer par les limites de la technique utilisée pour évaluer la quantité de collagène sécrétée. De plus, cette expérience a seulement été réalisée une fois. Le traitement avec du CTGF ne semble avoir aucun effet sur la quantité de collagène I sécrétée par les différentes populations cellulaires, sauf sur les fibroblastes non-lésionnels au stade tardif où le traitement avec du CTGF augmenterait la quantité de collagène I sécrétée de façon concentration-dépendante (Figure 13b). Finalement, le traitement des différentes populations avec de l'insuline ne semble avoir aucun effet sur la quantité de collagène I sécrétée (Figure 13c).



**Figure 13 : Effet des différents facteurs de croissance sur la quantité de collagène I sécrétée**

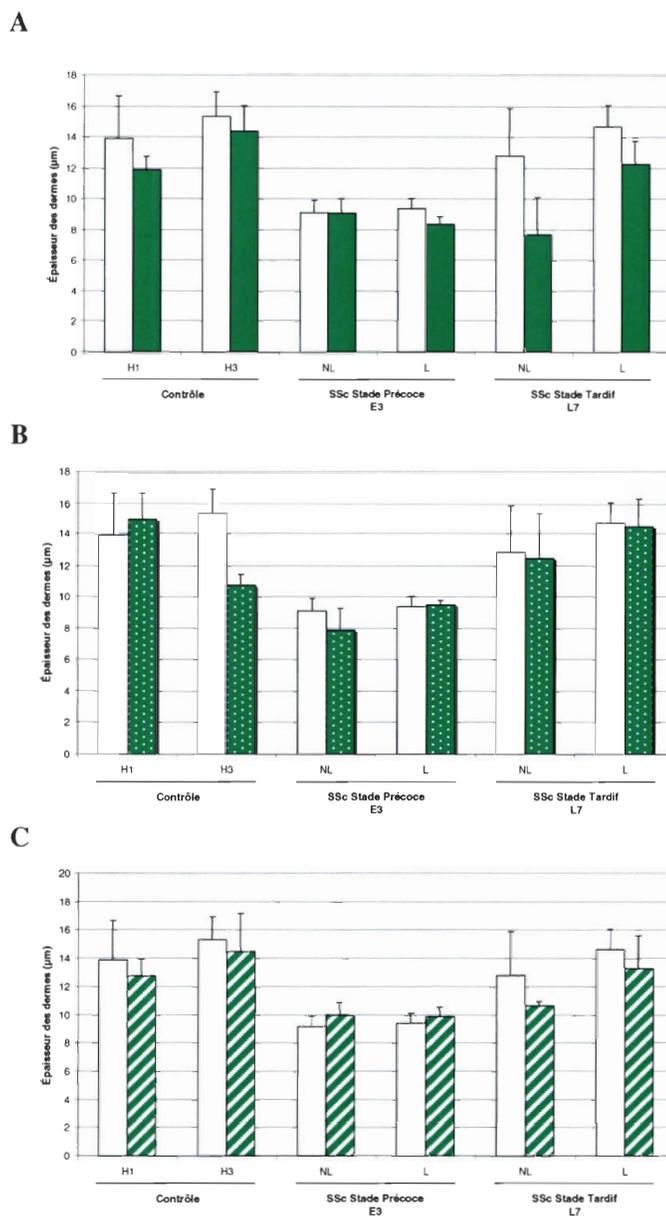
Les graphiques présentent la quantité relative de collagène I sécrétée/cellule pour les différentes populations cellulaires : fibroblastes non-lésionnels (NL) et lésionnels (L) au stade précoce et au stade tardif de la maladie et fibroblastes de sujets sains (H1 et H3). La ligne noire représente la quantité de collagène I sécrétée par les populations cellulaires n'ayant reçu aucun traitement (SVF 10%). Le graphique A montre les résultats obtenus après le traitement des cellules avec du TGF- $\beta$ 1, le graphique B, ceux obtenus après le traitement avec du CTGF et le graphique C, les résultats obtenus après le traitement avec l'insuline. N=1

### **3.2.4 Effets de différents facteurs de croissance sur l'épaisseur des dermes reconstruits**

Afin d'étudier l'effet du CTGF sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec les différentes populations de fibroblastes, 2 ng de CTGF ont été ajoutés au milieu pendant tout le temps de culture des dermes (35 jours au lieu de 56, en raison des problèmes techniques survenus). Les résultats sont les mêmes que ceux obtenus précédemment (Chapitre 2) : le CTGF n'a eu aucun effet sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec les différentes populations de fibroblastes (Figure 14a).

Pour étudier l'effet d'un pré-traitement au TGF- $\beta$ 1 suivi d'un traitement au CTGF, les différentes populations de fibroblastes ont été traitées avec 1 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 pendant 4 semaines avant de reconstruire des dermes en présence de 2 ng/ml de CTGF (35 jours de culture au lieu de 56). Cette séquence de traitements ne semble avoir eu aucun effet significatif sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec les différentes populations de fibroblastes (Figure 14b).

Finalement, une combinaison de facteurs de croissance, 2 ng/ml de CTGF et 10 ng/ml d'insuline, a été ajoutée au milieu de culture pour les 35 jours de culture totale. Cette combinaison de facteurs ne semble avoir eu aucun effet sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec les différentes populations de fibroblastes (Figure 14c).

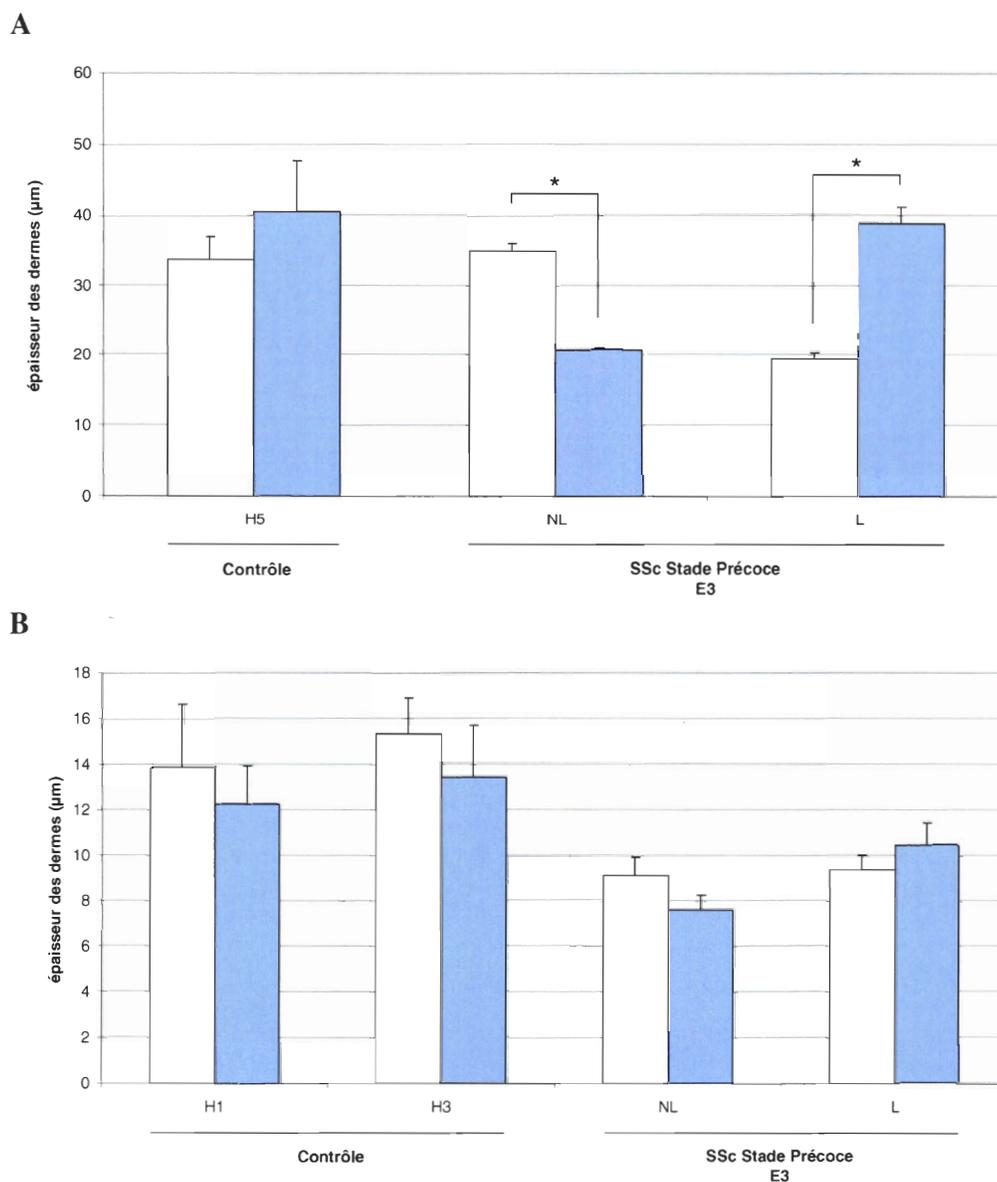


**Figure 14: Effets de différents facteurs de croissance sur l'épaisseur des dermes reconstruits.** Les graphiques présentent l'épaisseur des dermes reconstruits avec différentes populations cellulaires : fibroblastes lésionnels (L) et non-lésionnels (NL) au stade précoce et au stade tardif de la maladie et fibroblastes de sujets sains (H1 et H3). Les bandes vertes représentent l'épaisseur des dermes reconstruits en présence de différents facteurs de croissance et les bandes blanches, l'épaisseur des dermes reconstruits sans la présence de ces facteurs de croissance. Le graphique **A** montre les résultats obtenus lorsque les cellules étaient traitées avec le CTGF (2 ng/ml), le graphique **B**, ceux obtenus en utilisant des cellules pré-traitées en monocouche pendant 4 semaines avec du TGFβ1 (1 ng/ml) avant de reconstruire des dermes en présence de CTGF (2 ng/ml) et le graphique **C**, les résultats obtenus après le traitement avec la combinaison CTGF (2 ng/ml) et insuline (10 ng/ml) lors de la formation des dermes. \* :  $p < 0,05$ . N=1

### **3.2.5 Effet de la présence à long terme du TGF- $\beta$ 1 sur le phénotype des différentes populations cellulaires**

Ines Boufaied, l'étudiante travaillant précédemment sur ce projet, avait étudié de façon préliminaire, l'effet à long terme du TGF- $\beta$ 1 sur le phénotype des différentes populations cellulaires. Elle avait obtenu des résultats intéressants en traitant les cellules pendant six semaines avec du TGF- $\beta$ 1 avant de reconstruire des dermes par auto-assemblage. En effet, ce pré-traitement au TGF- $\beta$ 1 avait entraîné une diminution de l'épaisseur des dermes reconstruits avec les fibroblastes non-lésionnels (NL) au stade précoce, alors qu'il avait augmenté l'épaisseur de ceux reconstruits avec les fibroblastes lésionnels (L) au stade précoce. Le pré-traitement au TGF- $\beta$ 1 n'avait eu, par contre, aucun effet sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec les fibroblastes de sujets sains (Figure 15a).

La même expérimentation a été réalisée une seconde fois, mais le temps de pré-traitement a été diminué à 4 semaines, car les cellules avaient un taux de croissance nettement ralenti après 6 semaines de pré-traitement. Le temps de culture a aussi été réduit à 35 jours au lieu de 56 pour des raisons techniques. Les résultats obtenus sont non significatifs mais semblent suivre la même tendance que ceux obtenus précédemment (Figure 15b).



**Figure 15 : Effet d'un pré-traitement des cellules avec du TGF-β1 (1 ng/ml) sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec différentes populations de fibroblastes.** Les graphiques présentent l'épaisseur des dermes reconstruits avec différentes populations cellulaires : fibroblastes lésionnels (L) et non-lésionnels (NL) au stade précoce et fibroblastes de sujets sains (H1, H3, H5). Les bandes bleues représentent les dermes reconstruits avec les populations qui ont reçu un pré-traitement au TGF-β1 (pendant 6 ou 4 semaines) et les bandes blanches, ceux reconstruits avec les populations non pré-traitées mais ayant été cultivées pendant 4 ou 6 semaines. Lors de la formation des dermes, aucun traitement n'était ajouté au milieu de culture. Le graphique **A** montrent les résultats obtenus après 6 semaines de pré-traitement des fibroblastes (résultats d'Ines Boufaied) et le graphique **B**, ceux obtenus après 4 semaines de pré-traitement des fibroblastes et dont les dermes n'ont pas été superposés deux à deux pour des raisons techniques (35 jours de culture au lieu de 56 jours) \* :  $p < 0,05$ . N=1

## **Chapitre 4**

### **Discussion**

## 4.0 Discussion

La sclérodermie est une maladie auto-immune du tissu conjonctif qui se caractérise par une vasculopathie des petites artères, une activation du système immunitaire et une fibrose de la peau et des organes internes (Derk and Jimenez, 2003). L'activation des fibroblastes, ou le changement d'expression de certains de leurs gènes, est un événement important de la composante fibrotique. Cependant, il n'a pas encore été établi de façon formelle dans la littérature, si cette activation était due à un stimulus exogène ou à une activation intrinsèque des fibroblastes. Certaines équipes ont suggéré qu'elle serait reliée à l'âge de la pathologie (Kuroda and Shinkai, 1997; Zurita-Salinas et al., 2004). De plus, d'autres équipes ont observé des signes précoces d'activation chez les fibroblastes provenant de peau non-lésée (Claman et al., 1991; Tan et al., 2005). Ces observations suggèrent que le processus pathologique de la fibrose pourrait se faire en plusieurs étapes.

Pour vérifier la capacité intrinsèque des fibroblastes sclérodermiques à sécréter et organiser une matrice extracellulaire *in vitro*, nous avons reconstruits des dermes avec des fibroblastes de peau lésée (L) ou non (NL) de patients atteints de sclérodermie diffuse depuis moins d'un an (stade précoce) ou depuis plus de 10 ans (stade tardif). Nous avons aussi reconstruit des dermes avec des fibroblastes de sujets sains (contrôle). Ce modèle de derme reconstruit par auto-assemblage permet de garder les cellules dans un contexte très proche de leur environnement réel.

Nous avons montré que les fibroblastes NL au stade précoce de la maladie reconstruisent des dermes *in vitro* dont l'épaisseur est semblable à celle des dermes reconstruits avec des fibroblastes de sujets sains. Ces fibroblastes NL ayant été extraits de la peau d'apparence normale, ces résultats nous suggèrent qu'au début de la maladie, les fibroblastes NL ne présenteraient aucun changement au niveau de leur phénotype. Nous avons également observé que les dermes reconstruits avec les fibroblastes L au stade précoce étaient plus minces que les dermes reconstruits avec les fibroblastes contrôles. Ces fibroblastes pathologiques ont été extraits de tissus fibrosés, c'est à dire plus épais que la peau normale. Les résultats obtenus suggèrent donc que les fibroblastes L au stade précoce

de la maladie auraient subi certains changements phénotypiques par rapport aux cellules saines puisqu'elles ne peuvent reconstruire un derme d'épaisseur normale et que la présence d'un ou de facteurs externes est nécessaire pour stimuler les cellules à produire des dermes fibrotiques.

Lorsque prélevés pendant le stade tardif de la maladie, les fibroblastes NL reconstruisent, en moyenne, des dermes dont l'épaisseur est similaire à celle des dermes reconstruits avec les fibroblastes de sujets sains. Par contre, nous avons remarqué que les fibroblastes NL provenant de patients très atteints par la fibrose (SMR>20/51) reconstruisent des dermes plus minces que les dermes reconstruits avec les fibroblastes contrôles. Ces fibroblastes NL ont aussi été extraits de la peau dont l'apparence clinique semblait normale, donc ils auraient dû reconstruire, comme les fibroblastes NL au stade précoce de la maladie, des dermes d'épaisseur semblable aux dermes contrôles. Ces observations suggèrent que les fibroblastes NL au stade tardif ne subiraient aucun changement au niveau de leur phénotype. Cependant, lorsque la maladie s'aggrave (SMR>20/51), les fibroblastes NL présenteraient certains changements phénotypiques nécessitant la présence d'un ou de facteurs externes pour reconstruire des dermes d'épaisseur normale. Finalement, nous avons observé que les fibroblastes L au stade tardif de la maladie reconstruisent des dermes dont l'épaisseur moyenne est plus élevée que celle des dermes reconstruits avec des fibroblastes de sujets sains. Cependant, seuls les fibroblastes L de patients très atteints par la maladie (SMR>20/51) reconstruisent toujours des dermes plus épais que les dermes contrôles. Ce qui signifie qu'au stade tardif de la maladie, les fibroblastes, ayant été extraits de la peau fibrosée de patients dont le SMR était plus élevé que 20/51, auraient subi des changements phénotypiques leur permettant de reconstruire des dermes fibrotiques sans la présence de facteurs extrinsèques. *In vitro*, les fibroblastes provenant de patients faiblement atteint par la maladie (SMR<20/51) ne peuvent reconstruire de dermes épais, impliquant la nécessité de stimuli extrinsèques pour former des dermes fibrotiques *in vivo*. Les résultats obtenus avec les fibroblastes sclérodermiques (stade tardif) ayant été extraits de patients dont le SMR était plus élevé que 20/51 sont à confirmer. Il faut noter qu'il est difficile d'avoir accès à des biopsies de

patients gravement atteints d'une sclérodémie diffuse depuis plus de 10 ans, car le taux de mortalité est très élevé.

Les résultats obtenus nous ont permis d'établir une nouvelle hypothèse concernant le développement de la fibrose. Au début de la sclérodémie, les fibroblastes L subiraient certains changements phénotypiques et nécessiteraient la présence de stimuli extrinsèques pour induire une fibrose. Avec le temps, les fibroblastes L auraient aussi besoin de facteurs extrinsèques pour induire des dermes fibrotiques, alors qu'ils en deviendraient indépendants lorsque la maladie s'aggrave. De plus, les fibroblastes NL seraient aussi dépendants des stimuli externes pour induire des dermes d'apparence normale lorsque la maladie s'aggrave.

La majorité des différences d'épaisseurs de dermes reconstruits avec les fibroblastes sclérodermiques semblent mieux s'expliquer par des variations dans l'équilibre synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire que par des variations dans le nombre total de cellules. En effet, nous n'avons observé aucune différence significative dans le nombre total de cellules composant les différents dermes reconstruits. De plus, nous n'avons remarqué aucune différence significative pour l'apoptose et la prolifération cellulaire entre les différentes populations de fibroblastes. Il est connu dans la littérature qu'un dérèglement dans l'équilibre existant entre le dépôt de la matrice extracellulaire et sa dégradation peut mener à une accumulation anormale de matrice extracellulaire (Kuroda and Shinkai, 1997). Pour évaluer la synthèse de matrice extracellulaire, nous avons quantifié le collagène I sécrété par les populations de fibroblastes utilisées, car le collagène I est la composante principale de la matrice extracellulaire de la peau (Gelse et al., 2003). De plus, nous avons dosé l'activité enzymatique des MMP et la quantité de MMP-1 sécrétée pour évaluer la dégradation matricielle. La MMP-1 étant l'enzyme principale responsable de la dégradation du collagène I (Sternlicht and Werb, 2001).

Nous n'avons remarqué aucune variation significative dans l'équilibre synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire lorsque nous avons comparé les fibroblastes NL au stade précoce et tardif de la maladie avec les fibroblastes de sujets sains.

En effet, ces fibroblastes extraits de peau d'apparence normale avaient reconstruit des dermes dont l'épaisseur était semblable à celle des dermes reconstruits avec les fibroblastes de sujets sains. De plus, les variations significatives observées dans cet équilibre pourraient expliquer l'augmentation d'épaisseur des dermes reconstruits avec les fibroblastes L au stade tardif de la maladie par rapport aux dermes contrôles. En effet, nous avons remarqué une augmentation de la quantité de collagène I sécrétée et une diminution de la production des MMP-1 pour les fibroblastes L au stade tardif de la maladie. De plus, nous avons observé que l'activité enzymatique de leurs MMP était diminuée.

Cependant, la quantité de collagène I et de MMP-1, ainsi que l'activité enzymatique des MMP ne peut expliquer l'incapacité des fibroblastes L à reconstruire des dermes *in vitro* de même épaisseur que les dermes contrôles. En effet, nous n'avons observé aucune différence significative dans la production de collagène I et de MMP-1 par les fibroblastes L au stade précoce et les fibroblastes de sujets sains. L'activité enzymatique des MMP chez ces deux types cellulaires demeure constante également.

Il est connu dans la littérature que les fibroblastes sclérodermiques produisent une plus grande quantité de collagène I que les fibroblastes de sujets sains (LeRoy, 1974). Les fibroblastes sclérodermiques sont aussi connus pour synthétiser moins de MMP-1 et pour diminuer l'activité enzymatique de leurs MMP (Takeda et al., 1994). Une partie seulement de nos résultats corrélient avec la littérature. Cependant, il faut noter que les résultats de la littérature ont été obtenus à partir de culture de fibroblastes en monocouche, où les contacts cellules-cellules sont nombreux, ce qui est moins représentatif de l'environnement réel des cellules. De plus, la plupart des études ne tenaient pas compte de l'âge de la pathologie.

Ensuite, nous avons essayé de déterminer si la quantité de TGF- $\beta$ 1 sécrétée serait responsable de l'augmentation d'épaisseur des dermes reconstruits avec les fibroblastes L au stade tardif de la maladie par rapport aux dermes contrôles. Nous avons observé que la plupart des populations de fibroblastes sclérodermiques étudiées (stade précoce et stade tardif) sécrétaient une plus grande quantité de TGF- $\beta$ 1 que les fibroblastes contrôles, suggérant que la production de TGF- $\beta$ 1 par les fibroblastes L au stade tardif pourrait être

responsable de l'augmentation d'épaisseur de leurs dermes reconstruits. Par contre, ces résultats ne corrélaient pas avec la diminution d'épaisseur des dermes reconstruits avec les fibroblastes L au stade précoce de la maladie. Les résultats de la littérature sont controversés concernant la production de TGF- $\beta$  par les fibroblastes sclérodermiques. En effet, certaines équipes ont observé que les fibroblastes sclérodermiques sécrétaient plus de TGF- $\beta$  que les fibroblastes de sujets sains (Gruschwitz et al., 1990; Snowden et al., 1994), alors qu'une autre équipe a conclu que les fibroblastes sclérodermiques et les fibroblastes de sujets sains sécréteraient une quantité similaire de TGF- $\beta$ , mais que les fibroblastes sclérodermiques exprimeraient une plus grande quantité de récepteurs au TGF- $\beta$  (Kawakami et al., 1998). De plus, l'augmentation de la production de TGF- $\beta$ 1 par les fibroblastes NL au stade précoce et tardif de la maladie nous indique que les fibroblastes NL auraient déjà des différences par rapport aux fibroblastes de sujets sains comme Tan et al. ont démontré en 2005.

Dans le chapitre 2, nous n'avons pas réussi à expliquer la diminution de l'épaisseur des dermes reconstruits avec des fibroblastes L au stade précoce de la maladie par rapport aux dermes contrôles, donc il serait intéressant d'étudier d'autres molécules de la matrice extracellulaire possiblement impliquées dans la sclérodermie : ténascine, fibronectine (Varga and Bashey, 1995).

Suite à notre hypothèse sur le développement de la sclérodermie, nous avons tenté de déterminer le ou les facteurs extrinsèques nécessaires pour induire un derme fibrotique *in vivo*. Nous avons étudié deux facteurs de croissance, le TGF- $\beta$ 1 et le CTGF, tous deux reconnus comme ayant un rôle important dans le développement de la fibrose (Denton and Abraham, 2001).

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet, sur l'épaisseur des dermes reconstruits, d'un traitement à faible concentration de TGF- $\beta$ . La présence de TGF- $\beta$  au cours de la formation des dermes a augmenté l'épaisseur de la majorité des dermes reconstruits quelque soient les populations de fibroblastes utilisées. Ces résultats nous suggèrent que le TGF- $\beta$  pourrait être un des facteurs extrinsèques nécessaires pour induire

une fibrose. Par contre, le TGF- $\beta$  n'a eu aucun effet sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec des fibroblastes L au stade tardif de patients dont le SMR était plus élevé que 20/51, suggérant qu'avec le temps et lorsque la maladie s'aggrave, les fibroblastes L deviendraient insensibles à l'action du TGF- $\beta$ . L'étude de populations supplémentaires de fibroblastes L au stade tardif de patients très atteints par la maladie est nécessaire pour confirmer ces résultats. De plus, il serait intéressant d'évaluer la quantité de smad 3 phosphorylée (smad effectrice) pour vérifier si l'insensibilité au TGF- $\beta$  est due à l'activation intrinsèque de la voie du TGF- $\beta$  puisqu'il a déjà été démontré dans la littérature que les fibroblastes sclérodermiques auraient plus de smad 3 activée que les fibroblastes de sujets sains (Mori et al., 2003).

Ensuite, nous avons tenté d'expliquer l'augmentation d'épaisseur des dermes reconstruits *in vitro* suite au traitement avec le TGF- $\beta$ . Cette augmentation s'explique surtout par une diminution de la production de MMP-1 et par la diminution de l'activité enzymatique des MMP. Il est connu dans la littérature que le TGF- $\beta$  diminue la production des MMP et augmente la synthèse de leurs inhibiteurs, les TIMP (Varga and Trojanowska, 2008). Il est surtout connu dans la littérature que le TGF- $\beta$  augmente la quantité de collagène I sécrétée par les fibroblastes (Varga et al., 1987). Cependant, nous n'avons remarqué aucune augmentation de la production de collagène I suite au traitement des populations de fibroblastes avec le TGF- $\beta$ , sauf au niveau des fibroblastes NL au stade tardif de la maladie. Il faut noter que la plupart des résultats de la littérature ont été obtenus avec des cultures de fibroblastes en monocouche. Nous avons également étudié les mêmes populations de fibroblastes avec le modèle de culture en monocouche et nous avons observé une augmentation de la production de collagène I suite au traitement avec le TGF- $\beta$  (données non présentées).

Nous avons aussi étudié l'effet du CTGF sur l'épaisseur des dermes reconstruits. À la concentration utilisée, nous n'avons remarqué aucun effet du CTGF sur l'épaisseur des dermes reconstruits quelque soient les populations de fibroblastes étudiées. Certaines équipes ont également observées qu'un traitement au CTGF n'avait aucun effet sur les fibroblastes (Gore-Hyer et al., 2003; Chujo et al., 2005). Cependant, ils ont observé une

augmentation de la production de collagène I, lorsque les cellules recevaient un pré-traitement au TGF- $\beta$  ou lorsque le traitement au CTGF était combiné à un traitement à l'insuline (Gore-Hyer et al., 2003; Chujo et al., 2005).

Nous avons préalablement testé les différents facteurs de croissance sur des cultures de fibroblastes (sclérodermiques et contrôles) en monocouche pour avoir une idée de leur effet individuel sur la prolifération cellulaire et sur la production de collagène I. Le traitement des populations de fibroblastes avec le TGF- $\beta$  a été utilisé comme contrôle positif pour la production de collagène I. Aucun effet significatif sur la prolifération cellulaire n'a été observé suite au traitement avec les différents facteurs de croissance. Toutefois, des effets mitogéniques avaient été observés au niveau des fibroblastes traités avec du CTGF (2 ng/ml) sur une période de 7 jours. Ce qui suggère qu'il serait intéressant de refaire l'expérience sur une plus longue période de temps. De plus, nous n'avons remarqué aucune différence significative pour la production de collagène I avec le CTGF ou l'insuline à l'exception des fibroblastes NL au stade tardif de la maladie. Selon Gore-Hyer et al., aucune augmentation de la production de collagène n'est observée lorsque les fibroblastes reçoivent un traitement au CTGF ou un traitement à faible dose d'insuline (10 ng/ml). Toutefois, une combinaison de traitement avec ces deux facteurs de croissance entraînerait une augmentation de la production de collagène par les fibroblastes (Gore-Hyer et al., 2003).

Par la suite, nous avons testé les deux conditions expérimentales pour le CTGF (pré-traitement des cellules au TGF- $\beta$  et traitement combiné à l'insuline), mais nous n'avons observé aucune différence significative au niveau de l'épaisseur des dermes reconstruits quelque soient les populations de fibroblastes utilisées. Cependant, l'expérience a été arrêtée, pour des raisons techniques, avant le montage des feuillets deux à deux, soit à 35 jours de culture au lieu de 56 jours. L'arrêt précipité de l'expérience pourrait aussi expliquer les résultats obtenus, en absence de facteur de croissance, qui diffèrent de ceux présentés dans l'article du chapitre 2. Il serait intéressant de reprendre cette expérience pour observer l'effet de ces deux types de traitement sur nos populations de fibroblastes.

Enfin, notre dernier objectif était de déterminer si la présence d'un facteur potentiellement fibrosant (le TGF- $\beta$ 1) pendant une longue période de temps pouvait être responsable des modifications observées au niveau de la régulation de la matrice extracellulaire. Ces modifications pourraient découler des changements de phénotype stables des fibroblastes L au stade précoce de la maladie. L'étudiante précédente à avoir travaillé sur ce projet avait obtenu des résultats intéressants suite au traitement des fibroblastes avec du TGF- $\beta$ 1 pendant 6 semaines avant de reconstruire des dermes par auto-assemblage sans la présence de facteurs de croissance. Elle avait observé que ce pré-traitement n'avait aucun effet sur l'épaisseur des dermes reconstruits avec les fibroblastes sujets sains. Par contre, l'épaisseur des dermes reconstruits avec les fibroblastes NL était diminuée lorsque les fibroblastes recevaient un pré-traitement au TGF- $\beta$ 1 pendant 6 semaines. De plus, elle avait remarqué que les fibroblastes L augmentaient l'épaisseur des dermes reconstruits suite au pré-traitement avec du TGF- $\beta$ 1. Cependant nous avons remarqué que la croissance des cellules était nettement ralentie après 6 semaines de pré-traitement au TGF- $\beta$ , laissant penser que les cellules pouvaient avoir changé de phénotype et/ou être trop vieilles lors de la formation des dermes. Nous avons donc refait l'expérience avec seulement 4 semaines de pré-traitement au TGF- $\beta$ . À la suite de ces pré-traitements, nous n'avons remarqué aucune différence significative au niveau de l'épaisseur des dermes, mais nos résultats semblent suivre la même tendance que ceux obtenus avec l'expérience précédente. Il faut aussi noter que cette expérience a été interrompue à 35 jours de culture au lieu de 56 jours pour des raisons techniques. Ces résultats préliminaires suggèrent que le TGF- $\beta$  pourrait être un des facteurs impliqués dans les changements de phénotypes stables. Cependant, des résultats supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

En conclusion, l'utilisation du modèle de derme reconstruit par auto-assemblage nous a permis de développer une nouvelle hypothèse concernant le développement de la fibrose pour la sclérodermie. Au début de la sclérodermie, les fibroblastes L subiraient certains changements phénotypiques et nécessiteraient la présence de stimuli extrinsèques pour induire une fibrose. Avec le temps, les fibroblastes L auraient aussi besoin de facteurs extrinsèques pour induire des dermes fibrotiques, alors qu'ils en deviendraient indépendants lorsque la maladie s'aggrave. De plus, les fibroblastes NL seraient aussi

dépendants des stimuli externes pour induire des dermes d'apparence normale lorsque la maladie s'aggrave.

De plus, la majorité des différences d'épaisseurs de dermes reconstruits que nous avons obtenus s'expliquent par des variations dans l'équilibre synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire. Cependant, nous ne pouvons expliquer l'incapacité des fibroblastes L au stade précoce de la maladie à reconstruire des dermes d'épaisseur semblable aux dermes contrôles. De plus, nous avons déterminé que le TGF- $\beta$  semble être un des facteurs nécessaire pour induire des lésions fibrotiques. Ce même TGF- $\beta$  pourrait être responsable, en partie, des changements stables de phénotype des fibroblastes sclérodermiques au stade précoce de la maladie. Toutefois, cette dernière hypothèse nécessite des expérimentations supplémentaires pour être confirmée.

Les perspectives pour le projet sont de tenter de confirmer les différents résultats obtenus avec les fibroblastes L (stade tardif) extraits de patients dont le SMR est plus élevé que 20/51. L'incapacité des fibroblastes L au stade précoce de la maladie à reconstruire des dermes d'épaisseur normale devrait être étudiée. Pour cela, des dermes *in vitro* pourraient être reconstruits avec des fibroblastes L au stade précoce de la maladie en présence de surnageants conditionnés par les fibroblastes L au stade tardif de la maladie. Cette expérimentation permettra de répondre à la question si les fibroblastes L au stade tardif sécrètent une ou des molécules que les fibroblastes L au stade précoce de la maladie ne sécrètent pas. Il serait aussi intéressant d'étudier d'autres molécules de la matrice extracellulaire possiblement impliquées dans la sclérodermie : ténascine, fibronectine. De plus, une quantification de l'expression des récepteurs au TGF- $\beta$  et des autres protéines impliquées dans la signalisation en aval de ces récepteurs serait importante pour la suite des travaux. Finalement, les expérimentations avec le CTGF (pré-traitement au TGF- $\beta$  et traitement combiné à l'insuline) devraient être reprises ainsi que celles de l'effet de la présence à long terme du TGF- $\beta$  sur les différentes populations de fibroblastes, étant donné que les expérimentations ont été arrêtées plus tôt (35 jours de culture au lieu de 56 jours).

**Chapitre 5**  
**Bibliographie**

## 5.0 Bibliographie

- Allanore Y, Kahan A (2006) Treatment of systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 73:363-368.
- Amital H, Rewald E, Levy Y, Bar-Dayana Y, Manthorpe R, Engervall P, Sherer Y, Langevitz P, Shoenfeld Y (2003) Fibrosis regression induced by intravenous gammaglobulin treatment. *Ann Rheum Dis* 62:175-177.
- Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD (2001) Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 44:1359-1362.
- Arnett FC, Howard RF, Tan F, Moulds JM, Bias WB, Durban E, Cameron HD, Paxton G, Hodge TJ, Weathers PE, Reveille JD (1996) Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum* 39:1362-1370.
- Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA (1998) Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 338:1186-1191.
- Asano Y, Ihn H, Kubo M, Jinnin M, Mimura Y, Ashida R, Tamaki K (2006) Clinical significance of serum levels of matrix metalloproteinase-13 in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 45:303-307.
- Assassi S, Tan FK (2005) Genetics of scleroderma: update on single nucleotide polymorphism analysis and microarrays. *Curr Opin Rheumatol* 17:761-767.
- Aumailley M, Gayraud B (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76:253-265.
- Badesch DB et al. (2000) Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 132:425-434.
- Baxter RM, Crowell TP, McCrann ME, Frew EM, Gardner H (2005) Analysis of the tight skin (Tsk1/+) mouse as a model for testing antifibrotic agents. *Lab Invest* 85:1199-1209.
- Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ (2003) [Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. Therapeutic aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)* 61:147-158.
- Bhagal RK, Stoica CM, McGaha TL, Bona CA (2005) Molecular aspects of regulation of collagen gene expression in fibrosis. *J Clin Immunol* 25:592-603.
- Black CM, Stevens WM (1989) Scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 15:193-212.
- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114:1285-1294.
- Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477:267-283.
- Chen CC, Chen N, Lau LF (2001) The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276:10443-10452.
- Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, Takigawa M, Takehara K (2005) Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene

- expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 203:447-456.
- Claman HN, Giorno RC, Seibold JR (1991) Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma. The myth of the "uninvolved skin". *Arthritis Rheum* 34:1495-1501.
- Clark DA, Coker R (1998) Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 30:293-298.
- Clements PJ (2000) Systemic sclerosis (scleroderma) and related disorders: clinical aspects. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 14:1-16.
- Clements PJ, Lachenbruch PA, Seibold JR, Zee B, Steen VD, Brennan P, Silman AJ, Allegar N, Varga J, Massa M, et al. (1993) Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J Rheumatol* 20:1892-1896.
- Clements PJ, Furst DE, Wong WK, Mayes M, White B, Wigley F, Weisman MH, Barr W, Moreland LW, Medsger TA, Jr., Steen V, Martin RW, Collier D, Weinstein A, Lally E, Varga J, Weiner S, Andrews B, Abeles M, Seibold JR (1999) High-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis: analysis of a two-year, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 42:1194-1203.
- Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151:369-374.
- Cook NJ, Silman AJ, Propert J, Cawley MI (1993) Features of systemic sclerosis (scleroderma) in an identical twin pair. *Br J Rheumatol* 32:926-928.
- Dang H, Dauphinee MJ, Talal N, Garry RF, Seibold JR, Medsger TA, Jr., Alexander S, Feghali CA (1991) Serum antibody to retroviral gag proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 34:1336-1337.
- De Keyser F, Peene I, Joos R, Naeyaert JM, Messiaen L, Veys EM (2000) Occurrence of scleroderma in monozygotic twins. *J Rheumatol* 27:2267-2269.
- Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277.
- Denton CP, Abraham DJ (2001) Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 13:505-511.
- Derk CT, Jimenez SA (2003) Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun Rev* 2:181-191.
- Derynck R, Feng XH (1997) TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1333:F105-150.
- Diot E, Lesire V, Guilmot JL, Metzger MD, Pilore R, Rogier S, Stadler M, Diot P, Lemarie E, Lasfargues G (2002) Systemic sclerosis and occupational risk factors: a case-control study. *Occup Environ Med* 59:545-549.
- Distler JH, Jungel A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE, Michel BA, Hauser T, Schett G, Gay S, Distler O (2007) Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum* 56:311-322.
- Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, ten Dijke P, White B, Wigley FM, Goldschmidt-Clermont PJ (2002) Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3908-3913.

- Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR (1999) Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 13:1774-1786.
- Falanga V, Tiegsl SL, Alstadt SP, Roberts AB, Sporn MB (1987) Transforming growth factor-beta: selective increase in glycosaminoglycan synthesis by cultures of fibroblasts from patients with progressive systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 89:100-104.
- Ferrarini M, Steen V, Medsger TA, Jr., Whiteside TL (1990) Functional and phenotypic analysis of T lymphocytes cloned from the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 79:346-352.
- Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, Bullo A, Cazzato M, Tirri E, Storino F, Giuggioli D, Cuomo G, Rosada M, Bombardieri S, Todesco S, Tirri G (2002) Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)* 81:139-153.
- Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR (1996) Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 107:404-411.
- Gardner H, Shearstone JR, Bandaru R, Crowell T, Lynes M, Trojanowska M, Pannu J, Smith E, Jablonska S, Blaszczyk M, Tan FK, Mayes MD (2006) Gene profiling of scleroderma skin reveals robust signatures of disease that are imperfectly reflected in the transcript profiles of explanted fibroblasts. *Arthritis Rheum* 54:1961-1973.
- Gelse K, Poschl E, Aigner T (2003) Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1531-1546.
- Gore-Hyer E, Pannu J, Smith EA, Grotendorst G, Trojanowska M (2003) Selective stimulation of collagen synthesis in the presence of costimulatory insulin signaling by connective tissue growth factor in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 48:798-806.
- Grassegger A, Pohla-Gubo G, Frauscher M, Hintner H (2008) Autoantibodies in systemic sclerosis (scleroderma): clues for clinical evaluation, prognosis and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr* 158:19-28.
- Grassi W, Core P, Carlino G, Blasetti P, Cervini M (1993) Labial capillary microscopy in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 52:564-569.
- Green MC, Sweet HO, Bunker LE (1976) Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 82:493-512.
- Gruschwitz M, Muller PU, Sepp N, Hofer E, Fontana A, Wick G (1990) Transcription and expression of transforming growth factor type beta in the skin of progressive systemic sclerosis: a mediator of fibrosis? *J Invest Dermatol* 94:197-203.
- Halprin KM (1972) Epidermal "turnover time"--a re-examination. *Br J Dermatol* 86:14-19.
- Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K (1997) Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 24:328-332.
- Haustein UF, Herrmann K (1994) Environmental scleroderma. *Clin Dermatol* 12:467-473.
- Hitraya EG, Jimenez SA (1996) Transcriptional activation of the alpha 1(I) procollagen gene in systemic sclerosis dermal fibroblasts. Role of intronic sequences. *Arthritis Rheum* 39:1347-1354.
- Ho KT, Reveille JD (2003) The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 5:80-93.

- Huber LC, Distler JH, Moritz F, Hemmatazad H, Hauser T, Michel BA, Gay RE, Matucci-Cerinic M, Gay S, Distler O, Jungel A (2007) Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum* 56:2755-2764.
- Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, Takehara K (1995) Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 105:280-284.
- Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR, Takehara K (1996) Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 106:729-733.
- Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K (2001) Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum* 44:474-480.
- Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Kikuchi K, Kadono T, Tamaki K, Takehara K (1997) Circulating intercellular adhesion molecule-1 in the sera of patients with systemic sclerosis: enhancement by inflammatory cytokines. *Br J Rheumatol* 36:1270-1275.
- Jelaska A, Arakawa M, Broketa G, Korn JH (1996) Heterogeneity of collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* 39:1338-1346.
- Jimenez SA, Derk CT (2004) Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 140:37-50.
- Jimenez SA, Millan A, Bashey RI (1984) Scleroderma-like alterations in collagen metabolism occurring in the TSK (tight skin) mouse. *Arthritis Rheum* 27:180-185.
- Jimenez SA, Diaz A, Khalili K (1995) Retroviruses and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 12:159-175.
- Kahaleh B (2008) Vascular disease in scleroderma: mechanisms of vascular injury. *Rheum Dis Clin North Am* 34:57-71; vi.
- Kahan A, Devaux JY, Amor B, Menkes CJ, Weber S, Venot A, Strauch G (1990) The effect of captopril on thallium 201 myocardial perfusion in systemic sclerosis. *Clin Pharmacol Ther* 47:483-489.
- Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M (1998) Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* 110:47-51.
- Kikuchi K, Kubo M, Hoashi T, Tamaki K (2002) Decreased MMP-9 activity in the serum of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 27:301-305.
- Kikuchi K, Hartl CW, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M (1992) Direct demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis fibroblasts: insensitivity to TGF beta 1 stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 187:45-50.

- Kikuchi K, Kubo M, Sato S, Fujimoto M, Tamaki K (1995) Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 33:973-978.
- Kirk TZ, Mark ME, Chua CC, Chua BH, Mayes MD (1995) Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem* 270:3423-3428.
- Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA (1995) Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 63:48-56.
- Krieg T, Meurer M (1988) Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiologic aspects. *J Am Acad Dermatol* 18:457-481.
- Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg T (1990) Co-localization of transforming growth factor beta 2 with alpha 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 86:917-922.
- Kuroda K, Shinkai H (1997) Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 289:567-572.
- Laing TJ, Gillespie BW, Toth MB, Mayes MD, Gallavan RH, Jr., Burns CJ, Johanns JR, Cooper BC, Keroack BJ, Wasko MC, Lacey JV, Jr., Schottenfeld D (1997) Racial differences in scleroderma among women in Michigan. *Arthritis Rheum* 40:734-742.
- Lakos G, Melichian D, Wu M, Varga J (2006) Increased bleomycin-induced skin fibrosis in mice lacking the Th1-specific transcription factor T-bet. *Pathobiology* 73:224-237.
- Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, Hoyle GW, Corti M, Athas G, Lungarella G, Brody A, Friedman M (1998) Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol* 275:L365-371.
- LeRoy EC (1974) Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 54:880-889.
- Leroy EC, Smith EA, Kahaleh MB, Trojanowska M, Silver RM (1989) A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. Is transforming growth factor beta the answer? *Arthritis Rheum* 32:817-825.
- LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., Rowell N, Wollheim F (1988) Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 15:202-205.
- Maloney S, Smith A, Furst DE, Myerson D, Rupert K, Evans PC, Nelson JL (1999) Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *J Clin Invest* 104:41-47.
- Marieb EN (1999) Anatomie et physiologie humaines, 2<sup>e</sup> ed. Edition. Saint-Laurent: Editions du Renouveau pédagogique.
- Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641.
- McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, Barst RJ, Black C, Galie N, Rainisio M, Simonneau G, Rubin LJ (2005) Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 25:244-249.
- Medsger TA, Jr. (1994) Epidemiology of systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 12:207-216.

- Mori Y, Chen SJ, Varga J (2003) Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 48:1964-1978.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494.
- Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69:562-573.
- Needleman BW, Choi J, Burrows-Mezu A, Fontana JA (1990) Secretion and binding of transforming growth factor beta by scleroderma and normal dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 33:650-656.
- Nihtyanova SI, Denton CP (2008) Current approaches to the management of early active diffuse scleroderma skin disease. *Rheum Dis Clin North Am* 34:161-179; viii.
- Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, Komura K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S (2004) Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 138:357-363.
- Pannu J, Gore-Hyer E, Yamanaka M, Smith EA, Rubinchik S, Dong JY, Jablonska S, Blaszczyk M, Trojanowska M (2004) An increased transforming growth factor beta receptor type I:type II ratio contributes to elevated collagen protein synthesis that is resistant to inhibition via a kinase-deficient transforming growth factor beta receptor type II in scleroderma. *Arthritis Rheum* 50:1566-1577.
- Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratzu V, Bedossa P (1999) Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 30:968-976.
- Peltonen J, Kahari L, Uitto J, Jimenez SA (1990) Increased expression of type VI collagen genes in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 33:1829-1835.
- Perez MI, Kohn SR (1993) Systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 28:525-547.
- Piccinini G, Luchetti MM, Caniglia ML, Carossino AM, Montroni M, Introna M, Gabrielli A (1996) c-myc proto-oncogene is expressed by quiescent scleroderma fibroblasts and, unlike B-myc gene, does not correlate with proliferation. *J Invest Dermatol* 106:1281-1286.
- Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P (1999) Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 13:2105-2124.
- Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C (1975) The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 64:509-516.
- Roberts AB, Sporn MB (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 8:1-9.
- Rudnicka L, Varga J, Christiano AM, Iozzo RV, Jimenez SA, Uitto J (1994) Elevated expression of type VII collagen in the skin of patients with systemic sclerosis. Regulation by transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 93:1709-1715.
- Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K (2003) Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 120:542-547.
- Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K (2000) Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with

- systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 27:149-154.
- Scherrer B (1984) *Biostatistique*, Gaëtan Morin éditeur Edition.
- Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR, Raymond Y, Senecal JL (2002) Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore)* 81:154-167.
- Siracusa LD, McGrath R, Ma Q, Moskow JJ, Manne J, Christner PJ, Buchberg AM, Jimenez SA (1996) A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res* 6:300-313.
- Snowden N, Coupes B, Herrick A, Illingworth K, Jayson MI, Brenchley PE (1994) Plasma TGF beta in systemic sclerosis: a cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 53:763-767.
- Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, Keene DR, He R, Adams HP, Vanpelt CS, Geng YJ, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2007) Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum* 56:334-344.
- Steen VD, Costantino JP, Shapiro AP, Medsger TA, Jr. (1990) Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation to availability of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Ann Intern Med* 113:352-357.
- Steen VD, Oddis CV, Conte CG, Janoski J, Casterline GZ, Medsger TA, Jr. (1997) Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982. *Arthritis Rheum* 40:441-445.
- Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y (1994) Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 103:359-363.
- Takehara K (2003) Hypothesis: pathogenesis of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 30:755-759.
- Tan FK, Hildebrand BA, Lester MS, Stivers DN, Pounds S, Zhou X, Wallis DD, Milewicz DM, Reveille JD, Mayes MD, Jin L, Arnett FC, Jr. (2005) Classification analysis of the transcriptome of nonlesional cultured dermal fibroblasts from systemic sclerosis patients with early disease. *Arthritis Rheum* 52:865-876.
- Trelstad RL, Catanese VM, Rubin DF (1976) Collagen fractionation: separation of native types I, II and III by differential precipitation. *Anal Biochem* 71:114-118.
- Trojanowska M, Wu LT, LeRoy EC (1988) Elevated expression of c-myc proto-oncogene in scleroderma fibroblasts. *Oncogene* 3:477-481.
- Uitto J, Bauer EA, Eisen AZ (1979) Scleroderma: increased biosynthesis of triple-helical type I and type III procollagens associated with unaltered expression of collagenase by skin fibroblasts in culture. *J Clin Invest* 64:921-930.
- van der Slot AJ, Zuurmond AM, Bardoel AF, Wijmenga C, Pruijs HE, Sillence DO, Brinckmann J, Abraham DJ, Black CM, Verzijl N, DeGroot J, Hanemaaijer R, TeKoppele JM, Huizinga TW, Bank RA (2003) Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. *J Biol Chem* 278:40967-40972.

- Varga J, Bashey RI (1995) Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 12:187-199.
- Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA (1987) Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 247:597-604.
- Varga JA, Trojanowska M (2008) Fibrosis in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 34:115-143; vii.
- Verrecchia F, Mauviel A, Farge D (2006) Transforming growth factor-beta signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 5:563-569.
- Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839.
- Vonk MC, Marjanovic Z, van den Hoogen FH, Zohar S, Schattenberg AV, Fibbe WE, Larghero J, Gluckman E, Preijers FW, van Dijk AP, Bax JJ, Roblot P, van Riel PL, van Laar JM, Farge D (2008) Long-term follow-up results after autologous haematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 67:98-104.
- Vuorio T, Makela JK, Vuorio E (1985) Activation of type I collagen genes in cultured scleroderma fibroblasts. *J Cell Biochem* 28:105-113.
- Walker JG, Pope J, Baron M, Leclercq S, Hudson M, Taillefer S, Edworthy SM, Nadashkevich O, Fritzler MJ (2007) The development of systemic sclerosis classification criteria. *Clin Rheumatol* 26:1401-1409.
- Xiao R, Liu FY, Luo JY, Yang XJ, Wen HQ, Su YW, Yan KL, Li YP, Liang YS (2006) Effect of small interfering RNA on the expression of connective tissue growth factor and type I and III collagen in skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 155:1145-1153.
- Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K (1999) Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 112:456-462.
- Yazawa N, Kikuchi K, Ihn H, Fujimoto M, Kubo M, Tamaki T, Tamaki K (2000) Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 42:70-75.
- Zurita-Salinas CS, Krotzsch E, Diaz de Leon L, Alcocer-Varela J (2004) Collagen turnover is diminished by different clones of skin fibroblasts from early- but not late-stage systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 24:283-290.