



**UNIVERSITE ABDELMALEK ESSAADI**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES - Tanger**

**Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur**  
**Formation Doctorale : Sciences et Techniques de l'Ingénieur**

**THESE DE DOCTORAT**

**Présentée pour l'obtention du**  
**DOCTORAT en Sciences et Techniques de l'Ingénieur**

**Par :**  
**HAMDOUCH Khaoula**

**Discipline : Sciences de la vie**  
**Spécialité : Génétique Humaine**

**IDENTIFICATION DE NOUVEAUX AUTOANTIGENES  
CENTROMERIDIQUES ET DEVELOPPEMENT D'UN ARRAY POUR LE  
DIAGNOSTIC DE LA SCLERODERMIE.**

**Soutenue le 07 Décembre 2012 devant le Jury**

<i>Pr. LAIRINI Khalid</i>	<i>(Université ABDELMALEK ESSAADI)</i>	<i>Président</i>
<i>Pr. ORTIZ SANTESTEBAN Manuela</i>	<i>(Université de Cadiz)</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Pr. HILALI Abderraouf</i>	<i>(Université Hassan 1er)</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Pr. GHAILANI NOUROUTI Naima</i>	<i>(Université ABDELMALEK ESSAADI)</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Pr. BARAKAT Amina</i>	<i>(Université ABDELMALEK ESSAADI)</i>	<i>Examineur</i>
<i>Pr. VALDIVIA Manuel</i>	<i>(Université de Cadiz)</i>	<i>Co-Directeur</i>
<i>Pr. BENNANI MECHITA Mohcine</i>	<i>(Université ABDELMALEK ESSAADI)</i>	<i>Co-Directeur</i>

**Structure de recherche accréditée d'accueil :**  
**UAE/E20FST : Equipe de Recherche en Génétique Humaine de la FST de Tanger**

## REMERCIEMENTS

Des rencontres, des découvertes, des encouragements des réussites et des échecs... mais le moment attendu grâce à dieu est arrivé.... Et là je me lance pour remercier tous ceux qui m'ont aidé jusqu'au aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse :

Mr BENNANI Mohcine, pour la confiance que vous m'avez accordé ceci fait à peu près 8 ans, vous étiez pour moi une source de motivation, de courage, d'ambition et bien souvent de surpassement. Merci pour vos critiques, vos conseils et pour le temps que vous m'avez toujours consacré et surtout pour la correction de ce manuscrit.

D. Manuel Valdivia, de donde voy a empezar, me acuerdo del primer día cuando fue a encontrate...

Tus consejos, tus ideas, tus ánimos que yo siempre puedo hacer mejor... ya tengo claro Manuel que no hay malos resultados que todos son resultados... tu laboratorio y tu presencia diaria han sido para mí una oportunidad para llevar a bien mi trabajo de tesis. Quiero darte las gracias por transmitir mi tu amor al centrómero, a la organización,... darte las gracias por todos los momentos agradables practicando el francés, mirando las chapas... y quiero pedir disculpas por todo que has pasado corrigiendo mi tesis en español...

J'adresse mes sincères remerciements à Mr LARINI khalid Professeur de la Faculté des Sciences et Techniques de Tanger pour m'avoir honoré par sa présence tant que président de mon jury.

Je remercie également Monsieur le Pr. HILALI Abderraouf de l'Université Hassan 1<sup>er</sup> que rien pour le devoir scientifique a accepté de lire et juger mon travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame le Pr. GHAILANI NOUROUTI Naima et madame le Pr. BARAKAT Amina de Faculté des Sciences et Techniques de Tanger pour avoir accepté de juger mon travail. Mesdames vous aviez toujours un beau et tendre mot à me dire à chaque fois que vous me rencontriez.

Me gustaría expresar mi agradecimiento a los doctores Carmen Rodríguez, José Pérez-Venegas por sus colaboraciones.

Quiero dar las gracias también a Da. Manuela Ortiz, siempre tenias palabras para animar me. Gracias por ser amiga mía y darme siempre buenos consejos. Yo sé que puedo contar contigo! ( No olvidare jamás nuestro viaje, tu primero a África).

Concha respecto todo en ti, la madre que eres, siempre de buen humor... eres una persona de excepción muchas gracias por tus invitaciones, tus bonitas palabras y tu apoyo... te deseo lo mejor y que sigues siempre feliz (por favor no hace falta corregir mi español).

*Almudena mi vecina de laboratorio por tu simpatía y por estos momentos en la puerta charlando.*

*Gracias también a Antonio Astola por resolver siempre mis dudas con informática, y sobre todo por coger mi mano hasta que aprendí la técnica de ECL.*

*Elena, ánimo no te queda mucho, me acordare siempre de nuestras conversaciones que llamábamos "entre mujeres".*

*Je remercie aussi mes amies, Ihssan HArrak et Sara chakir pour les moments partagés. La futur Maman meriem, Hajira, Naoual et Lamiae pour leur fidélité.*

*Mes pensées vont particulièrement à ma famille surtout à mes parents, merci mes chers pour tous vos sacrifices, votre patience, votre support moral et financier constant ainsi que pour vos encouragements et confiance. Si aujourd'hui je suis là, c'est grâce à vous.*

*Merci à mes grands parents dont les prières sont en partie source de ma réussite.*

*J'aimerais aussi remercier ma belle famille, pour leur gentillesse et tendresse, et mes remerciements les plus vifs s'adresse à Monsieur le professeur Simohamed AHACHAD.*

*Vivre avec quelqu'un qui fait un doctorat est une tache pas vraiment facile, pour ceci j'aimerai bien remercier ma cousine Yasmina, et aussi, et en particulier un merci pour lala Salma, lala Halima, lala Maha, moulay Ahmad, et sidi Anas pour votre soutien, vos délires, votre joie partagée, et votre solidarité. Un grand merci à Maha pour son aide précieux au moment de l'impression de ce manuscrit.*

*Le candidat a bénéficié d'une bourse d'excellence octroyée par le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique et ce dans le cadre du programme des bourses de recherche initié par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur, de la Formation des Cadres et de la Recherche Scientifique.*

## **Abstract**

Scleroderma is an autoimmune disease characterized by the presence of antinuclear autoantibodies (ANA) produced against different structures and cell components such as DNA, histones and centromeric proteins. Anticentromere antibodies and specifically anti CENPB antigen are used as markers in the clinical diagnosis of scleroderma. The centromere of human chromosomes is a structure in which have been identified more than 80 proteins and some have been described as centromeric autoantigens in certain diseases such as scleroderma. The centromere at the cellular level ensures attachment of chromosomes to the mitotic spindle microtubules to direct segregation during cell division.

In our work, we have expressed in bacteria, different recombinant centromeric proteins such as CENPI, CENPH, CENPK, CENPM and CENPP. By immunofluorescence (IF) and Western blot techniques we have demonstrated that different sera of patients with scleroderma have not only reaction against the major autoantigen CENPB but also against autoantigens CENPI, CENPH, CENPK, CENPM and CENPP. Our results also suggest a possible correlation between the production of autoantibodies anti-CENPI and the presence of primary biliary cirrhosis.

Nowadays there is no definitive treatment for scleroderma, most of treatments are based on the clinical manifestations and potential observed pathologies in each patient. The application of better therapies can be achieved if known better autoantibody profiles in each patient. For this reason a part of our work is devoted primarily to identify novel autoantigens in scleroderma and then to develop a centromeric autoantigens arrays which could have an important role in the diagnosis and prognosis of disease. This test system allows us to identify from humans sera, with high accuracy, specificity and reproducibility, the presence of autoantibodies Nt-CENPB, CENPB and Nt-Ct-CENPI.

## RESUME

La sclérodermie est une maladie auto-immune caractérisée par la présence des autoanticorps antinucléaires (ANA) produits contre différentes structures et composants cellulaires comme l'ADN, les histones et les protéines centromériques. Les anticorps anti-centromère et spécifiquement contre l'antigène CENPB, sont utilisés comme marqueur dans le diagnostic clinique de la sclérodermie. Le centromère des chromosomes humains est une structure dans laquelle on a identifié plus de 80 protéines dont certaines ont été décrites comme des autoantigènes centromériques dans certaines maladies comme la sclérodermie. Au niveau cellulaire le centromère assure l'union des chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique pour diriger la ségrégation des chromosomes pendant la division cellulaire.

Lors de notre travail, nous avons exprimé dans un système bactérien, différentes protéines centromériques comme CENPI, CENPH, CENPK, CENPM et CENPP. En utilisant des techniques d'immunofluorescence (IF) et de western blot nous avons démontré que dans différents patients atteints de sclérodermie les sérums de ces derniers présentent une réaction auto-immune non seulement contre l'autoantigène majoritaire CENPB mais aussi contre les autoantigènes CENPI, CENPH, CENPK, CENPM, CENPP. Nos résultats suggèrent aussi une corrélation possible entre la production de l'autoanticorps anti-CENPI et la présence d'une cirrhose biliaire primaire.

De nos jours on ne dispose pas d'un traitement définitif de la sclérodermie, la plupart des traitements sont proposés en fonction des manifestations cliniques et des pathologies possibles observées chez chaque patient. L'application de meilleures thérapies peut être atteinte si on arrive à identifier le spectre des auto-anticorps et les différents profils qui en résultent chez chaque patient. Pour cela nous avons consacré d'abord une grande partie de notre travail à l'identification de nouveaux autoantigènes dans la sclérodermie et postérieurement à développer un système de puces à autoantigènes centromériques qui pourraient avoir un rôle très important dans le diagnostic et le pronostic de la maladie. Ce système d'analyse nous permet d'identifier à partir de plusieurs sérums humains à la fois, avec une grande précision, spécificité et reproductibilité, la présence des autoanticorps anti Nt-CENPB, Ct-CENPB, et Nt-CENPI.

## SOMMAIRE

### INTRODUCTION

I-Phénomènes d'auto-immunité humaine .....	2
I-1 Concepts de tolérance .....	2
I-2 Facteurs pouvant conduire à une réponse auto-immune .....	3
II- La sclérodermie .....	10
II-1 Étiologie de la sclérodermie .....	11
II-2 La réponse cellulaire durant une sclérodermie .....	13
II-3 Les changements de la réponse humorale durant une sclérodermie ..	17
II-4 Aspects cliniques de la sclérodermie .....	17
II-5 Technique et méthodes d'analyses de la sclérodermie .....	18
II-6 Traitement de la sclérodermie.....	21
III-Auto anticorps .....	21
III-1 Auto anticorps nucléaires: AAN.....	23
III-2 Anticorps anti centromère: ACA.....	25
III-3 Types des auto-anticorps chez des patients souffrant d'une Sclérodermie.....	27
IV- Organisation moléculaire du centromère humain .....	41
IV-1 Structure du centromère .....	41
IV-2 Composition moléculaire du kinétochore .....	42
IV- 3 Fonction du centromère .....	49
V- Objectifs du travail.....	52

### MATERIEL ET METHODES

I-Antécédents expérimentales .....	53
II- Techniques liées aux acides nucléiques .....	53
II-1 Amplification enzymatique des fragments d'ADN par la réaction de polymérase en chaîne (PCR).....	53
II-2 Purification des fragments d'ADN et d'ADN plasmidique.....	58
II-3 Clonage d'ADN codifiant pour les protéines CENPM, CENPH, CENPK et CENPI.....	59
II-4 Séquençage de l'ADN.....	62
III- Expression et purification de protéines centromériques .....	65
III-1 Transformation bactérienne et expression des protéines centromériques.....	65
III-2 Extraction et purification des protéines recombinantes.....	68
IV- Culture cellulaire et immunofluorescence .....	70
IV-1 Culture et multiplication des cellules Hela .....	70
IV-2 Technique d'immunofluorescence indirecte (IF).....	70
V- Technique de western blot .....	72
V-1 Électrophorèse en gel SDS-PAGE.....	72
V-2 Immuno-détection des protéines centromériques par western blot..	74
VI- Développement d'une puce spécifique aux auto-antigènes centromériques .....	75

VI-1 Préparation des antigènes CENPB y CENPI.....	75
VI- 2 Préparation duMicroCaster: le micro échantilleur .....	76
VI-3 Dépôt des protéines Nt CENPB, Ct CENPB et Nt CENPI .....	76
VI-4 étapes de la puce .....	78
VI-5 Propriétés de la puce.....	79

## RESULTATS

I-Expression de cADN codifiant pour les protéines CENPs.....	82
I-1 Expression des protéines centromériques Ct CENPB, Nt CENPB, CENPC, CENPH y Nt CENPI .....	82
I-2 Expression des protéines CENPK, CENPM, CENPP, Int CENPI y Ct CENPI.....	84
II- Purification des protéines CENPs exprimées .....	88
II-1 Purification par colonne d'affinité .....	88
II-2 Purification à partir du gel de polyacrilamide .....	88
III – Etude de la spécificité des sérums anti-CENPs .....	90
III-1 Essais des sérums spécifiques par IF .....	90
III-2 Essai des sérums spécifiques par western Blot .....	90
IV- Etude des sérums humains auto-immuns.....	92
IV- 1 Echantillonnage des sérums des patients avec maladies auto immunes. ....	92
IV-2 Analyse des sérums humains auto-immunes par la technique du western blot face aux antigènes CENPI et CENPB.....	95
IV- 3 Identification de possibles épitopes auto-immunes chez des patients présentant des réactions face à la protéine CENPI.....	98
IV-4 Analyse par western blot de la réponse auto-immune des sérums des patients avec hépatopathies face aux antigènes Nt CENPB et Nt CENPI.....	98
IV-5 Identification de nouveaux auto antigènes centromériques chez des patients sclérodermiques .....	101
V- Développement d'un système d'array pour l'identification des auto-antigènes centromériques durant la sclérodemie .....	101
V-1 Quantification des auto antigènes CENPs .....	104
V-2 Les premiers essais .....	104
V-3 Validation de la méthode .....	107
V-4 Caractérisation de la réponse auto-immune de sérums sclérodermiques on utilisant un array à auto antigènes CENPB y CENPI.....	112

## DISCUSSION

I- Identification et caractérisation du CENPI comme un nouveau autoantigène dans les sérums humains des patients sclérodermiques.....	116
II. Étude initiale de CENPI comme possible marqueur de la Cirrhose Biliaire Primaire .....	120
III- Identification de nouveaux autoanticorps impliqués dans la réponse auto-	123

immune chez des patients sclérodermiques .....	
IV- Développement d'une puce à auto-antigènes centromériques comme nouvelle technique de diagnostique et de suivi de la réponse auto-immune durant la sclérodermie .....	127
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	132
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	134
<b>Annexes</b> .....	152



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Interaction entre différents types cellulaires durant une sclérodémie.....	<b>16</b>
<b>Figure 2.</b>	Exemples des aspects de l'immunofluorescence de type ANA dans des cellules Hela.....	<b>24</b>
<b>Figure 3.</b>	Exemples d'immunofluorescence avec coloration centromérique sur cellules Hela.....	<b>26</b>
<b>Figure 4.</b>	Observation par microscopie électronique des chromatides et du kinétochore.....	<b>44</b>
<b>Figure 5.</b>	Modèle d'organisation moléculaire du kinétochore dans les cellules des vertébrés.....	<b>47</b>
<b>Figure 6.</b>	Union des microtubules au centromère dans des cellules humaines.....	<b>51</b>
<b>Figure 7.</b>	Carte du vecteur pBiex utilisé pour l'expression des protéines centromériques CENPK, CENPM, Int CENPI et Ct CENPI.....	<b>61</b>
<b>Figure 8.</b>	Photo de la chambre de culture (Heraeus) utilisée pour la culture et la multiplication des cellules Hela. ....	<b>71</b>
<b>Figure 9.</b>	Différents composants utilisés pour le développement de l'array.....	<b>77</b>
<b>Figure 10.</b>	Coloration au bleu de Coomassie des gels de polyacrilamide qui montrent les corps d'inclusion après expression des protéines CENPs.....	<b>83</b>
<b>Figure 11.</b>	Produits de réaction de polymérisation en chaine PCR des deux fragments correspondants au domaine intermédiaires et carboxyle terminal de la protéine CENPI.....	<b>85</b>
<b>Figure 12.</b>	Gel SDS-PAGE d'expression des domaines Int CENPI et Ct CENPI. ....	<b>86</b>
<b>Figure 13.</b>	Expression des protéines centromériques recombinantes CENPK, CENPM et CENPP.....	<b>87</b>
<b>Figure 14.</b>	Purification des protéines Nt CENPI et CENPP à travers une colonne d'affinité de Nikel.....	<b>89</b>
<b>Figure 15.</b>	Purification des protéines CENPs purifiées à partir de gels de polyacrylamide.....	<b>91</b>

<b>Figure 16.</b>	Analyse par technique d'immunofluorescence des sérums spécifiques anti Nt CENPB et anti Nt CENPI sur des cellules HeLa.....	<b>96</b>
<b>Figura 17.</b>	Analyse par technique du western blot de la réaction des protéines CENPs exprimés et purifiés face aux sérums spécifiques.....	<b>99</b>
<b>Figure 18.</b>	Résultats de l'immunofluorescence indirecte sur cellules HeLa on utilisant des sérums de patients souffrant de maladies sclérodermiques.....	<b>96</b>
<b>Figure 19.</b>	Western Blot des sérums humains avec maladies auto-immunes face aux protéines centromériques recombinantes Nt CENPB, Nt CENPI.....	<b>99</b>
<b>Figure 20.</b>	Analyse de divers épitopes auto-immunes de la protéine centromérique CENPI par Western blot.....	<b>102</b>
<b>Figure 21.</b>	Résultats des analyses par la technique du western blot face aux protéines Nt CENPB et Nt CENPI des sérums humains de patients avec hépatopathies.....	<b>103</b>
<b>Figure 22.</b>	La réaction des sérums humains sclérodermiques obtenus par la technique de western blot face aux protéines CENPH, CENPK, CENM, CENPP.....	<b>105</b>
<b>Figure 23.</b>	Quantification de la protéine Nt CENPB par coloration du gel au bleue de Coomassie.....	<b>106</b>
<b>Figure 24.</b>	Premiers essais pour le développement d'une puce à l'auto antigène Nt CENPB.....	<b>108</b>
<b>Figure 25.</b>	Essais pour évaluer la sensibilité et la reproductibilité d'une puce à l'antigène CENPB.....	<b>110</b>
<b>Figure 26.</b>	Quantification de la protéine Nt CENPI par coloration au bleue de Coomassie d'un SDS PAGE.....	<b>111</b>
<b>Figure 27.</b>	Essai pour évaluer la sensibilité et la reproductibilité de puce on utilisant la protéine Nt CENPI.....	<b>113</b>
<b>Figure 28.</b>	Essais de spécificité et de reproductibilité de puce pour antigènes centromériques.....	<b>28</b>
<b>Figura 29.</b>	Etude des sérums humains avec maladies auto-immunes par une puce aux auto-antigènes CENPB et CENPI.....	<b>116</b>

## LISTE DE TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b>	Association des antigènes oxydés avec certaines maladies auto-immunes.....	<b>6</b>
<b>Tableau 2.</b>	Association entre le polymorphisme HLA et certaines maladies rhumatoïdes.....	<b>8</b>
<b>Tableau 3.</b>	Critères de classification des formes précoces de la sclérodermie systémique limitée.....	<b>14</b>
<b>Tableau 4.</b>	Traitements utilisé en général face à diverses manifestations cliniques durant une sclérodermie.....	<b>22</b>
<b>Tableau 5.</b>	Association entre le type des anticorps, le phénotype le rôle pathogène et la signification clinique des anticorps durant une sclérodermie.....	<b>29</b>
<b>Tableau 6.</b>	Prévalence de certains auto-anticorps non spécifiques communs entre la sclérodermie et d'autres maladies autoimmunes.....	<b>36</b>
<b>Tableau 7.</b>	Résumé des différents fragments d'ADN et de protéines centromériques exprimés durant notre travail.....	<b>54</b>
<b>Tableau 8.</b>	Les amorces utilisées dans ce travail.....	<b>56</b>
<b>Tableau 9.</b>	Enzymes de restriction utilisées pour chaque ADNc.....	<b>61</b>
<b>Tableau 10.</b>	Résumé des conditions optimales d'expression des différentes protéines centromériques. ....	<b>67</b>
<b>Tableau 11.</b>	Quantités et volumes requis pour la préparation d'un gel SDS-PAGE de dimensions 10x11 cm à différentes concentration.....	<b>73</b>
<b>Tableau 12.</b>	Taille réelle et apparente des protéines exprimées Nt CENPB, Nt CENPB, Ct CENPB, CENPC, Nt CEPNI y CENPH.....	<b>83</b>
<b>Tableau 13.</b>	Caractéristiques des fragments codifiant pour les protéines Int CENPI et Ct CENPI exprimées.....	<b>85</b>
<b>Tableau 14.</b>	Caractéristiques des protéines centromériques recombinantes CENPK, CENPM et CENPP exprimées.....	<b>86</b>
<b>Tableau 15.</b>	Divers patrons de fluorescence obtenus.....	<b>97</b>

<b>Tableau 16.</b>	Résumé des caractéristiques cliniques du groupe de patients CENPI positives.....	<b>100</b>
<b>Tableau 17.</b>	Résumé des divers patrons de fluorescences obtenus. ....	<b>103</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AAC:</b>	Anticorps Anti-Centromère
<b>AAN:</b>	Anticorps Anti-Nucléaires
<b>AAT:</b>	Anticorps Anti-ADN-Topoisomérase I
<b>AECA:</b>	Anticorps Anti-Cellules Endothéliales
<b>ADN:</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AMA :</b>	Anticorps antimitochondriales
<b>Anti RNP:</b>	Anticorps anti-RNA polymérase
<b>ARN:</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNi:</b>	ARN Interférence
<b>ASMA:</b>	Anticorps anti-cellules musculaires lisses
<b>BET:</b>	Bromure d'éthidium
<b>CATD:</b>	CENPA Targeting Domain
<b>CBP:</b>	Cirrhose Biliaire Primaire
<b>CCAN:</b>	Constitutive Centromere Associated-Network
<b>CENPA:</b>	Protéine centromérique A
<b>CENPB:</b>	Protéine centromérique B
<b>CENPC:</b>	Protéine centromérique C
<b>CENPE:</b>	Protéine centromérique E
<b>CENPF:</b>	Protéine centromérique F
<b>CENPG:</b>	Protéine centromérique G
<b>CENPH:</b>	Protéine centromérique H
<b>CENPK:</b>	Protéine centromérique K
<b>CENPM:</b>	Protéine centromérique M
<b>CENPO</b>	Protéine centromérique O
<b>CENPP:</b>	Protéine centromérique P
<b>CMH:</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CMV:</b>	Cytomegalovirus
<b>CREST:</b>	Calcinose, phénomène de Raynaud, dysfonctionnement oEsophagien, Sclérodactylie, Télangiectasie

<b>Cy3:</b>	Cyanine 3
<b>Cy5:</b>	Cyanine 5
<b>ddGTP:</b>	Dideoxynucleotides
<b>dNTP:</b>	Désoxyribonucléotides triphosphates
<b>DMEM:</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DO:</b>	Densité optique
<b>FITC:</b>	Fluorescein Isothiocyanate
<b>GvH:</b>	Maladie du greffon contre l'hôte (Graft Versus Host disease)
<b>HAC:</b>	Chromosome artificielle humain (Humain artificiel chromosome)
<b>Hela:</b>	Henrietta Lacks
<b>HEp-2:</b>	<i>Human Epithelioma Larynx no.2</i>
<b>HLA:</b>	Human Leukocyte Antigen (Antigène leucocytaire humain)
<b>HTAP:</b>	Hypertension Artérielle Pulmonaire
<b>IF:</b>	Immunofluorescence
<b>IgG:</b>	Immunoglobuline de type G
<b>INCENP:</b>	Inner Centromere Protein
<b>ICEN 39:</b>	Interphase Centromere Complex 39
<b>IL:</b>	Interleukine
<b>IRF:</b>	Interferon Regulatory Receptor
<b>Kb:</b>	Kilo-base
<b>kDa:</b>	Kilo Dalton
<b>LB :</b>	<i>Lysogeny broth</i>
<b>LDL:</b>	Low density Lipoproteines (Lipoprotéines de base densité)
<b>LED:</b>	Lupus érythémateux disséminé
<b>LES:</b>	Lupus érythémateux systémique
<b>MAI:</b>	Maladie auto-immune
<b>MAPK:</b>	<i>Mitogen-activated-protein kinase</i>
<b>MCP:</b>	Monocyte chemoattractant protein
<b>MEC:</b>	Matrice extracellulaire
<b>NaCl:</b>	Chlorure de Sodium
<b>NOR:</b>	Régions d'organisation de nucléole
<b>PDGF:</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>Pb:</b>	Paires de bases

<b>PEC:</b>	Progéniteurs Endothéliaux Circulants
<b>PTPN22:</b>	Protein Tyrosin Phosphatase Non receptor 22
<b>RA:</b>	Polyarthrite Rhumatoïde
<b>ROS:</b>	Reactive Oxygen Species
<b>ScS:</b>	Sclérose systémique
<b>ScSl:</b>	Sclérose systémique limitée
<b>ScSd:</b>	Sclérose systémique diffuse
<b>SDS:</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>SDS-PAGE:</b>	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>SNP:</b>	Single nucleotide polymorphism
<b>TBE:</b>	Tris Borate EDTA
<b>TCR:</b>	Récepteur des cellulés T
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	<i>Tumor necrosis factors alpha</i>
<b>UCTD:</b>	Maladies indifférenciée du tissu conjonctif

## *Introduction*



Le système immunitaire joue un rôle très important dans le fonctionnement général du corps humain. Entre autres plusieurs fonctions il protège contre les infections virales et bactériennes. Le système immunitaire reconnaît aussi toutes les molécules modifiées ou cellules endommagées comme dans le cas du cancer et il essaie de toutes les éliminer sans affecter les cellules propres de l'organisme en lui acquérant ainsi une tolérance envers le soi.

### *Immunité innée*

L'immunité innée est définie comme étant la première ligne de défense face aux corps étrangers. C'est une immunité naturelle non spécifique qui ne fait aucune distinction entre les agents pathogènes les uns des autres. Les défenses non spécifiques sont présentes chez tous les animaux. Les barrières physiques et anatomiques comme la peau, les muqueuses, les larmes, la salive et bien d'autres types de sécrétions assurent à l'organisme une protection contre la pénétration et la multiplication des agents pathogènes et une défense contre l'infection. Toutefois, quand un agent pathogène échappe à ces différents types de défenses, il se heurte encore à d'autres types de défenses innées, tels que :

Défense physiologique : Les barrières physiologiques incluent la température, le pH, l'oxygène, et divers facteurs et protéines solubles dans l'estomac, comme les lysosomes des cellules et dans la circulation comme l'interféron. Elles contribuent également à compléter l'immunité non spécifique.

Défense par phagocytose : La phagocytose est le processus de l'ingestion des macromolécules et des particules extracellulaires et des micro-organismes par des cellules spécialisées. Les cellules impliquées dans la phagocytose sont les monocytes, les neutrophiles, et les macrophages.

Défense par réaction inflammatoire : C'est une réponse à une agression d'origine exogène ou endogène. C'est une composante de la réaction naturelle et elle favorise l'induction d'une réponse spécifique.

- *Immunité Acquisse*

Il s'agit d'une protection développée par le corps face à certains micro-organismes ou substances étrangères en produisant des anticorps. C'est le résultat de l'action du système immunitaire du corps après avoir entré en contact avec un antigène.

Contrairement à l'immunité innée, l'immunité acquise se caractérise par la spécificité, la diversité, la mémoire et la différenciation entre le soi et le non soi.

Le système immunitaire est capable de générer une réponse immunitaire différente et spécifique face aux différentes molécules et antigènes étrangers. Une fois le système immunitaire répond à un antigène il développe une mémoire et c'est lors d'une deuxième rencontre avec le même antigène qu'une réaction immunitaire est induite. Une défaillance dans la discrimination entre le soi et le non soi peut conduire à une réponse inappropriée face aux antigènes propres au soi, provoquant ainsi des conséquences qui peuvent être dramatiques. Dans ce cas se développent les maladies auto-immunes.

Les deux types de réponses immunitaires innée et acquise dépendent de la capacité du système immunitaire à reconnaître et à distinguer entre les molécules du soi et du non soi. Plusieurs mécanismes de tolérance nous protègent des maladies auto-immunes.

## **I- Phénomènes d'auto-immunité humaine**

### **I-1 Concept de tolérance**

La tolérance se définit comme la capacité de l'organisme à distinguer entre le soi, le non-soi et le soi altéré. Il s'agit d'un état actif (et non pas seulement une absence de réponse), doté de spécificité et de mémoire. Les antigènes qui induisent cet état de tolérance sont appelés tolérogènes pour les distinguer de ceux qui provoquent la réponse immunitaire (immunogènes) (Schwartz RS et al, 1993).

On peut distinguer entre la tolérance centrale et la tolérance périphérique. La tolérance centrale est celle qui se produit au niveau des organes lymphoïdes primaires et affecte des lymphocytes immatures. Ce processus doit survenir de façon continue, puisqu'aussi la production de lymphocytes T et B l'est. Vu que tous les peptides existants ne sont pas tous présentés aux lymphocytes T dans le thymus au cours de la régulation de la tolérance centrale, un second contrôle de tolérance périphérique qui se développe après la naissance est nécessaire. Cette tolérance est produite quand le lymphocyte T en circulation rencontre un antigène et peut être traduit par différents processus tels que l'ignorance immunitaire, la délétion clonale, l'inhibition ou la suppression. L'échec de la tolérance centrale et périphérique, pourrait conduire à un développement possible d'une auto-immunité. Pendant ce processus il y'a une perte de

l'anergie clonale (perte de réponse face à un antigène), échec de la mort cellulaire induite par activation, perte de l'immunosuppression, libération d'antigènes séquestrés et expression des propres déterminants antigéniques cryptiques et propagation d'épitopes (Oppezzo P et al, 2003).

## **I-2 Facteurs conduisant à une réponse auto-immune**

Les maladies auto-immunes sont des maladies inflammatoires chroniques initiées par une perte de tolérance immunologique à l'égard du soi. Certaines expériences ont démontré que chez les animaux, une maladie auto-immune peut être induite artificiellement par injection des antigènes du soi provenant des tissus d'autres animaux génétiquement identiques en les mélangeant avec un adjuvant contenant des bactéries. Chez les humains l'auto-immunité est généralement initiée d'une manière spontanée. Bien qu'il n'existe pas encore d'essais définitifs sur l'origine de déclenchement de cette réponse, certaines maladies auto-immunes sont le résultat d'un agent infectieux.

Pour qu'une maladie soit définie comme étant auto-immune les dommages causés au niveau des tissus doivent être le résultat d'une réponse immunitaire face aux antigènes de soi. Les dommages causés au niveau des tissus dérivent de la formation du complexe immun ou suite au déclenchement d'une réaction inflammatoire locale. La classification des maladies auto-immunes est un processus difficile à établir surtout en l'absence d'une connaissance précise des causes de ces maladies. On distingue deux grandes familles de maladies auto-immunes : Maladies auto-immunes limitées où l'expression de l'auto-immunité est limitée à certains organes spécifiques et maladies auto-immunes systémiques dans lesquelles l'agression implique plusieurs types de tissus dans tout l'organisme. Les maladies auto-immunes sont un groupe de plus de 80 maladies différentes, caractérisées par une auto réactivité immunitaire anormale où participent les lymphocytes B et T. De multiples facteurs contribuent au développement d'une réponse auto-immune, comme les différences au niveau des génotypes, le milieu hormonal, les facteurs environnementaux et l'infection par des virus, bactéries et autres agents pathogènes. Nous définissons ci-dessous ces facteurs de manière générale.

### **I-2-1 Mimétisme moléculaire**

Dans ce processus, un antigène viral ou microbien avec un certain degré d'homologie avec les peptides du soi peut stimuler les cellules T auto réactives dans l'organisme infecté. Ce phénomène responsable de l'auto-immunité est connu sous le nom de mimétisme moléculaire. Ce concept a été décrit pour la première fois par Fujimani et Oldstone (Fujimani RS et Oldstone MB, 1989). La reconnaissance de l'antigène par le récepteur des cellules (TCR) est déguisée, permettant l'activation des cellules T par différents peptides liés à un ou même plusieurs complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Ainsi, les réponses aux antigènes étrangers peuvent conduire à l'activation des cellules T qui peuvent avoir des réactions croisées avec les antigènes du soi (Ohtsuka T et al, 2001).

La flexibilité de la reconnaissance des antigènes par le TCR est considérée fondamentale pour la capacité du système immunitaire à reconnaître et à répondre à la majorité des peptides dérivés des agents pathogènes, mais l'effet secondaire de cette déguisement est l'induction potentielle de l'auto-immunité par les antigènes microbiens ou viraux.

### **I-2-3 Microchimérisme**

Le Microchimérisme est le résultat d'un mouvement des cellules fœtales (certaines hypothèses incluent les cellules mères), à travers le placenta vers la circulation maternelle. La persistance de ces cellules tout au long du temps pourrait causer dans certains cas le développement d'une sclérodémie. La réponse immunitaire responsable de déclencher une sclérodémie dans ce cas est très similaire à celle qui se produit dans le cas de la maladie du greffon contre l'hôte (Graft Versus Host disease GvH), après une greffe d'un tissu ou des cellules. La rupture de la tolérance face aux cellules fœtales et le déclenchement d'une réponse auto-immune impliquent plusieurs mécanismes qui interagissent (Evans PC et al, 1999).

### **I-2-3 Stress oxydatif**

Les molécules dérivées du métabolisme de l'oxygène peuvent être très réactives. Ces molécules incluent les radicaux libres, les ions d'oxygène et de peroxydes organiques et inorganiques qui ont un rôle important dans la signalisation cellulaire. (Cave CA et al, 2006). Toutefois, en période de stress les niveaux de ces métabolites peuvent augmenter, ce qui peut entraîner des dommages au niveau des structures cellulaires. Il a été décrit la modification par oxydation de nombreux antigènes impliqués dans plusieurs maladies auto-immunes et quelques exemples sont résumés dans le tableau 1 (Biji T et al, 2008).

### **I-2-4 Antigènes cryptiques**

Les antigènes cryptiques sont des molécules, normalement protégées de la reconnaissance du système immunitaire, qui peuvent être exposées à ce système et se transformer en molécules immunogènes qui sont les antigènes.

Après des lésions tissulaires, mort cellulaire, stress oxydatif et production de radicaux libres lors de diverses infections, les protéines qui sont normalement reconnues comme soi sont considérés comme des antigènes étrangers et provoquent une réponse auto-immune. Cela se produit comme conséquence des changements dont souffrent les protéines après des modifications dans leur expression, modifications post-traductionnelles, dénaturation, pliage ou mutations. Ces protéines peuvent être exposées au système immunitaire et se transformer en antigènes cryptiques accessibles aux lymphocytes T. Plusieurs études ont décrit la production des autoantigènes oxydés durant d'une sclérodémie, en présence d'ions métalliques et dans des conditions de stress oxydatif. Ces autoantigènes modifiés peuvent initier un processus d'auto-immunité à travers les épitopes cryptiques (Sfriso P et al, 2010).

### **I-2-5 Superantigènes**

Les superantigènes se comportent comme des molécules puissantes stimulantes de la réponse auto-immune. Les superantigènes sont des protéines produites par de nombreux microorganismes, spécialement des bactéries, des mycoplasmes ou des virus

**Tableau 1.** Association des antigènes oxydés avec certaines maladies auto-immunes.

<b>Antigènes Oxydés</b>	<b>Maladies auto-immunes</b>
LDL Oxydé et oxydeoxyguanine 8	Lupus systémique érythémateux
IgG modifiés avec produit de glycation	Arthrite rhumatoïde
LDL Oxydé	Athérosclérose
Acide glutamique hydroxylase	Diabète I
LDL Oxydé	Syndrome de Beckett

qui peuvent infecter les cellules et se lier aux récepteurs TCR des lymphocytes T indépendamment de leur spécificité antigénique. Cette union entraîne l'activation d'un grand nombre de lymphocytes T avec différentes spécificités antigéniques.

### **I-2-6 Facteurs génétiques**

Il existe plusieurs indices sur l'existence d'éléments génétiques communs de prédisposition aux maladies auto-immunes. Les résultats de ces études mettent en évidence des familles dans lesquelles il ya eu une forte incidence d'auto-immunité (Jennifer L S et al, 2008). Ainsi, on peut observer la présence de plusieurs maladies auto-immunes chez des membres de la même famille ou chez un même individu. Des données fournies par ce qu'on appelle les balayages systématiques du génome contribuent à cet aspect. Lors de ces études on analyse l'ensemble du génome humain par une technique de suivi qui permet d'identifier des régions chromosomiques spécifiques associées à certaines maladies. Ainsi, il a été identifié de nombreuses régions chromosomiques qui sont associées à plusieurs maladies auto-immunes, telles que la région 1p13 qui est associée à une prédisposition génétique à la polyarthrite rhumatoïde (PA), le lupus érythémateux disséminé (LED) et la maladie de Crohn. En outre, des études d'expression génique ont montré l'existence de motifs d'expressions géniques altérés très similaires pour les différentes maladies auto-immunes. Toutes ces données soutiennent l'hypothèse d'une base étiopathogénique commune partagée entre les différentes maladies auto-immunes (Smyth DJ et al, 2008).

Les maladies auto-immunes sont génétiquement complexes et il est supposé que les gènes HLA avec d'autres facteurs génétiques entraînent une prédisposition génétique à ces maladies (Tableau 2). Dans le cas des maladies auto-immunes les gènes impliqués seraient de bons candidats dans les mécanismes moléculaires et cellulaires altérés (comme l'activation des cellules T et la présentation des antigènes) ou ceux en rapport avec le déséquilibre entre les médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Actuellement, il a été décrit par plusieurs groupes de recherche que les polymorphismes génétiques de certains gènes impliqués dans la régulation de l'activation des lymphocytes sont associés à différents processus auto-immunes. Le polymorphisme du gène *STAT4* (Signal Transducer and Activators of Transcription-4) a été associé à la présence de polyarthrite rhumatoïde et au lupus systémique disséminé (Remmers et al,

2007). Un autre polymorphisme dans le gène *PTPN22* (*Protein Tyrosin Phosphatase Non receptor 22*) a été associé à une susceptibilité accrue à développer certaines maladies auto-immunes. Le gène *PTPN22* code pour une phosphatase spécifique de lymphocytes qui catalyse la déphosphorylation intracellulaire dans des résidus tyrosine et contribue ainsi à l'inhibition de l'activation des lymphocytes T. Au niveau du gène *PTPN22* il a été décrit une variante génétique qui consiste en un changement d'une seule base (single nucleotide polymorphism [SNP]) en position 1858 (C1858T). Il a été récemment démontré que l'allèle T du polymorphisme 1858 entraîne un gain de fonction enzymatique de *PTPN22* qui donnerait lieu à une augmentation du seuil d'activation des lymphocytes T. Ceci peut entraîner une fuite thymique des lymphocytes T auto-réactifs ou une diminution de l'activité des cellules T régulatrices, processus qui conduiront à une auto-immunité. Tout ceci fait du gène *PTPN22* un candidat très intéressant dans le développement de l'auto-immunité (Begovich et al, 2004; Gourh et al, 2006).



**Tableau 2.** Association entre le polymorphisme HLA et certaines maladies rhumatoïdes.

<b>Maladies</b>	<b>antigène leucocytaire humain (HLA)</b>
Lupus systémique Erythémateux	DR3, DR2, DQw1
Lupus Erythémateux subcutané	DR3
Lupus Erythémateux induit par les médicaments	DR4
Syndrome de Sjögren primaire	DR2, DR3, DRw52
Syndrome de Sjögren associé au Lupus systémique Erythémateux.	DR3, DQw1/DQw2, DRw52
Sclérodémie	DR5
CREST	DR3
Anti-centromère positif	DR1

## I-2-7 L'apoptose

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée en réponse à des signaux tels que Fas et son ligand Fas, sont des mécanismes essentiels pour maintenir l'homéostasie. La mort cellulaire implique certains changements morphologiques tels que la condensation des chromosomes, la fragmentation nucléaire et la génération des corps apoptotiques.

L'élimination des cellules apoptotiques est un processus crucial pour empêcher et limiter la réponse immunitaire contre les antigènes générés. Ces antigènes produits durant le processus de l'apoptose ou par chacun de ses mécanismes peuvent conduire à la production de cellules T auto réactives. Il a été démontré que la dérégulation de l'apoptose est reliée au développement des maladies auto-immunes mais sans établir le rôle pathogénique de l'apoptose. Trois différents processus ont été démontrés en rapport avec le développement d'une réponse auto-immune face aux phénomènes de l'apoptose : Premièrement l'apoptose est la forme d'élimination des cellules par la réponse immunitaires par le biais de la reconnaissance et l'ingestion des cellules apoptotiques par les macrophages. Deuxièmement un excès de l'apoptose peut être une source de la génération des fragments antigéniques et le développement des maladies auto-immunes. Troisièmement un défaut génétique dans les voies de l'apoptose peut aussi provoquer une maladie auto-immune.

Dans le cas de mutations génétiques au niveau des gènes codant pour Fas et son récepteur Fas-L, un syndrome lymphoprolifératif et des manifestations auto-immunes ont été démontré aussi bien chez des humains que chez des souris. FAS constitue la voie extrinsèque de déclenchement de l'apoptose. La différence la plus importante entre l'ingestion des cellules apoptotiques et la phagocytose d'un agent pathogène, est la réponse auto-immune qui se traduit par la réaction inflammatoire qui normalement a lieu après une phagocytose. L'absence d'une réponse pro inflammatoire après ingestion des cellules apoptotiques est considérée comme l'un des points clés de la destruction et de l'élimination des cellules mortes. Une libération altérée des cellules apoptotiques est fortement liée à la production des auto-anticorps et au développement d'une auto immunité (Rock KL, 2002).

Par ailleurs des données récentes ont mis en rapport l'apoptose et l'absorption des cellules apoptotiques par les macrophages et par certains sous-ensembles des cellules dendritiques, avec le maintien de la tolérance immunitaire périphérique. Il a été aussi

décrit, que quand les cellules mourront par nécrose (lorsque la mort cellulaire se produit au hasard et non programmée), le contenu cellulaire libéré dans le milieu cellulaire attire des cellules du système immunitaire en provoquant une activation des cellules présentatrices d'antigènes et l'induction d'une réponse immunitaire (Irene C B Vioritto et al, 2007).

## **II-La sclérodemie**

La sclérodemie constitue un groupe de maladies auto-immunes qui produit une croissance anormale du tissu conjonctif. Les cellules de ce tissu sont séparées par la matrice extracellulaire (MEC), contrairement aux épithéliums où les cellules sont jointives. Le tissu conjonctif, complètement absent chez les animaux les plus primitifs constituent la majorité de la masse du corps des organismes évolués (2/3 du volume total chez l'homme). Le tissu conjonctif est impliqué dans des fonctions de soutien, de protection, de mouvement, de réponse immunitaire et de croissance. Les fibroblastes constituent un composant cellulaire principal du tissu conjonctif, elles synthétisent les macromolécules protéiques et polysaccharidiques de la MEC de ce tissu. Les fibroblastes sont aussi capables de sécréter de nombreuses autres molécules (cytokines, facteurs de croissance, enzymes) et jouent un rôle important dans les processus de réparation des tissus organiques et dans le maintien des réactions inflammatoires. On trouve aussi, dans le tissu conjonctif, des cellules qui appartiennent principalement au système immunitaire de l'organisme comme les macrophages, les granulocytes et les lymphocytes, etc. (Gu. Stephanie et al, 2008).

### **II-1 Etiologie de la sclérodemie**

La sclérodemie (sclérose systémique) (SSc) est une maladie complexe dont les symptômes cliniques sont hétérogènes et dont l'étiologie demeure encore inconnue. L'atteinte cutanée est la plus fréquente, mais c'est l'atteinte viscérale qui détermine le pronostic de cette maladie assez rare qui touche principalement les femmes (Karassa FB et al, 2008). Elle est caractérisée par des problèmes de vaisseaux sanguins, une fibrose interstitielle vasculaire progressive et une surproduction de collagène vasculaire, entraînant des interactions anormales entre les cellules endothéliales, les fibroblastes et

les cellules mononuclées, en particulier les lymphocytes et les monocytes, sans pouvoir être en mesure d'identifier l'une de ces cellules comme seule responsable de la maladie (Figure 1) (J.-P. Zuber C et al, 2006). Durant la sclérodermie on observe certaines anomalies fondamentales touchant trois types de cellules responsables des manifestations cliniques et pathologiques de cette maladie ce sont : 1) les cellules du système immunitaire, en particulier les lymphocytes T et B ; 2) les fibroblastes ; 3) les cellules endothéliales. Les modifications fonctionnelles de ces cellules aboutissent à une triade de caractéristiques histopathologiques: A) des infiltrats inflammatoires composés de cellules mononuclées, observés au stade précoce de la maladie ; B) une oblitération de la lumière des petites artères et des artérioles et C) une fibrose cutanée et viscérale progressive et sévère. Jusqu'à présent, il n'y a aucune hypothèse pathogénique expliquant tous les aspects de cette maladie. L'hypothèse admise actuellement est que chez des patients avec une prédisposition génétique, certains facteurs environnementaux pourraient engendrer des perturbations de l'immunité cellulaire et humorale ainsi que des altérations de la microvascularisation aboutissant à une fibrose. Une composante cruciale dans la pathogénie de la sclérodermie est l'activation persistante des gènes codant pour les différents types de collagène. Ces gènes sont stimulés par de multiples cytokines produites en particulier par les lymphocytes T (Nicole F et al, 2002). De nombreuses études de gènes candidats ont impliqué de multiples facteurs génétiques qui augmentent le risque des personnes à développer une sclérodermie (Agarwal SK et al, 2008). Ces études sont souvent limitées par les petites cohortes et par l'hétérogénéité clinique de la SCS. L'antigène leucocytaire humain HLA est la région polymorphe la plus étudiée du génome. Récemment, une série d'études d'association possible entre HLA classe II et la sclérodermie a été réalisée sur différentes populations (Blancs, Noirs et des Hispaniques) (Arnett FC et al, 2010). Il a été démontré une association négative de la susceptibilité de la sclérodermie chez les blancs et les hispaniques, avec l'haplotype HLA-DRB1-0701, DQA1-0201, DQB1-0202 et l'haplotype DRB1-1501. La sclérodermie chez les Noirs a été associée aux allèles HLA-DRB1-0804, DQA1-0501, DQB1-0301. Les haplotypes HLA-DPB1-1301 et HLA-DRB1-1104 sont fortement associées à la présence des auto-anticorps anti-topo-isomérase (ATA), tandis que HLA-DQB1-0501 et DQB1-26 est fortement lié à la présence des anticorps anti-centromère (AAC). Ces données ont été récemment confirmées dans une étude en Espagne, qui a rapporté que l'allèle HLA-DRB1-11 était associé à une susceptibilité à développer une

SCS, tandis que l'allèle HLA-DRB1-0701 a eu un effet protecteur (Siméon et al. 2009). Ces chercheurs ont également rapporté une association de l'allèle HLA-DRB1-1104 avec la présence des autoanticorps anti topo-isomérase alors que les haplotypes HLA-DRB1-01 et HLA-DRB1-05 sont associés à la présence des anticorps anticentromère (Mchugh NJ et al, 1994). En plus de l'implication de HLA dans le développement d'une SCS, d'autres travaux de recherche ont décrit l'implication d'autres gènes comme le facteur de régulation de l'interféron 5 (IRF5), (Interferon Regulatory Factor 5). Celui-ci est un facteur de transcription dans le processus d'activation des gènes de l'interféron et son polymorphisme a été associé à la possibilité de développer une sclérodermie (Simeon CP et al, 2009). D'autres travaux de recherche ont montré que les facteurs génétiques peuvent également être importants pour la génération des anticorps anti centromère (AAC). Une fréquence plus élevée des allèles HLA-DRI, HLA-DR4 et HLA-DRw8 a été associée à la présence des AAC. Une étude plus récente a suggéré que la principale association du CMH classe II en présence des AAC est due à la deuxième région hypervariable de la chaîne HLA-DQB1. L'absence d'un résidu leucine hydrophobe en position 26 du premier domaine de HLA-DQB1 (non DQB1: 26: L) a été identifiée chez tous les patients AAC positifs (Arnett et al, 2010).

Au cours des dix dernières années, plusieurs classifications de la sclérodermie ont été proposées. La classification du Collège Américain de Rhumatologie (American College of Rheumatology : ACR) présente la classification de référence qui inclut différents critères. La sclérodermie peut être divisée en deux classes: la sclérodermie localisée et la sclérodermie systémique. En 1988, LeRoy et al, ont individualisé deux formes principales de ScS, les formes diffuses observées chez environ 40 % des patients, auxquelles l'atteinte cutanée affecte la partie proximale des membres et/ou le tronc, et les formes limitées auxquelles l'atteinte cutanée ne remonte pas au-dessus des coudes et des genoux. LeRoy et Medsger en 2001, ont proposé de nouveaux critères pour les formes débutantes de ScS, permettant de distinguer entre les sclérodermies cutanées limitées où l'épaississement cutané reste distal, en aval des coudes et des genoux, et les sclérodermies limitées sans atteinte cutanée (Tableau 3). Ces critères accordent une importance à la capillaroscopie et aux autoanticorps spécifiques de la ScS. Les Sclérodermies limitées pourraient constituer des formes très précoces de la sclérodermie. Cependant, certains patients répondant aux critères de LeRoy et Medsger ne développeront jamais de lésions cutanées de sclérose. Le syndrome de CREST, qui

associe Calcinose, phénomène de Raynaud, atteinte oEsophagienne, Sclérodactylie, Télangiectasies, est une forme de Sclérodermie cutanée limitée (Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association 1980; LeRoy EC et al, 1988; LeRoy. EC y col 2001).

## **II- 2 La réponse cellulaire durant une sclérodermie**

L'activation du système immunitaire est un événement précoce dans la sclérodermie, bien qu'on ignore s'il s'agit de l'événement initial ou d'un processus secondaire. Il a été décrit que les cellules mononuclées dans la peau des patients sclérodermiques sont formées par des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> et par des macrophages. Ces lymphocytes CD4 produisent de façon préférentielle de l'interleukine 4 (IL-4), et produisent aussi des taux importants de cytokines telles que l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-17. L'IL-4, l'IL-13 et le TGF- $\beta$  sont connus comme étant des stimulateurs fibrogéniques majeurs de la SSc (Saito S et al, 2000), en augmentant la production du collagène par les fibroblastes et en induisant la production de TGF- $\beta$  et l'IL-17 qui se trouvent surexprimés dans le sang et la peau de patients sclérodermiques (Hasegawa M et al, 1997). D'autres cytokines profibrotiques incluent le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) et le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) qui stimulent la synthèse de collagène, et les cellules Th1 (productrices de l'interféron-gamma) qui l'inhibent. Par conséquent on observe un taux élevé des IL4, IL6, IL10 et IL13 dans le sérum des patients avec sclérodermie, tandis que le taux de l'INF gamma est réduit on le comparant avec des personnes saines. Toutefois, Chizzolini et al, en 1998, ont montré que l'interaction entre les lymphocytes T et les fibroblastes dermiques de patients sclérodermiques pourrait induire une diminution de la synthèse de collagène et que cette inhibition dépend en partie de TNF- $\alpha$ . Cette étude suggère qu'une stratégie thérapeutique destinée à bloquer le TNF- $\alpha$  pourrait être contre indiquée dans la SSc (Chizzolini et al, 1998).

**Tableau 3.** Critères de classification des formes précoces de la sclérodermie systémique limitée.

**Sclérodermie systémique limitée sans atteinte cutanée**

- Phénomène de Raynaud documenté objectivement par l'examen clinique, le test au froid ou le test de Nielsen

***Plus***

- soit une anomalie capillaroscopique (dilatation capillaire et/ou zones avasculaires) ;
- soit la présence d'anticorps spécifiques de la sclérodermie systémique (anticentromère, antitopo-isomérase I, antifibrillarine, anti-PM-Scl, antifibrine ou anti-RNA polymérase III.)

**Sclérodermie systémique cutanée limitée**

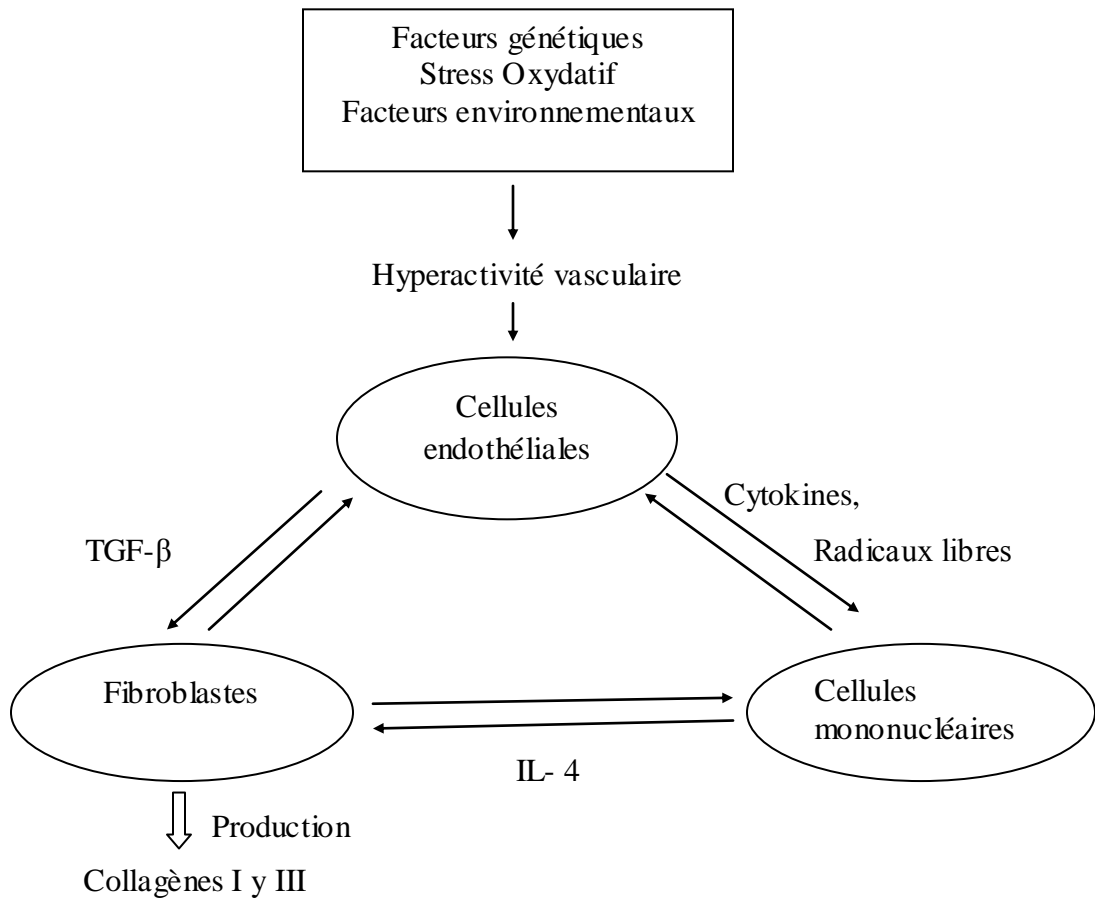
- En plus des critères précédents, les patients ont une infiltration cutanée distale en aval des coudes et des genoux (l'épaississement de la peau peut toucher les doigts, les mains, les avant-bras, les pieds, les orteils, le cou et la face en absence d'infiltration cutanée des bras, du thorax, de l'abdomen, du dos et des cuisses).

Il a été décrit que durant la sclérodermie l'existence des phénomènes d'hyperactivité vasculaire et des modifications de la microcirculation, jouent un rôle très important dans l'apparition de multiples lésions. L'équilibre de la synthèse des prostaglandines vasoconstrictrices et vasodilatatrices est perturbé au cours de cette maladie. Par conséquent, la production d'endothéline 1 est augmentée, tandis que la synthèse de prostacycline et de radicaux libres par les cellules endothéliales est diminuée. Une prolifération endothéliale et un épaississement de l'intima contribuent à la survenue d'un rétrécissement de la lumière vasculaire pouvant entraîner une oblitération luminale. Les cellules endothéliales sont vacuolisées, et peuvent subir des phénomènes de dégénérescence nucléaire et de nécrose cellulaire. Ces phénomènes contribuent à accroître la perméabilité vasculaire et entraînent la formation d'un infiltrat inflammatoire péri vasculaire qui va probablement contribuer à la genèse des lésions de la sclérose. Un autre type cellulaire a été décrit actif durant la sclérodermie, sont les monocytes détectés dans des biopsies cutanées à la phase précoce de la ScS, tandis qu'à ce stade les lymphocytes T sont présentes en petites quantités. Les monocytes jouent un rôle pathogène important à un stade très précoce de la maladie. On a suggéré que les mastocytes peuvent être des initiateurs importants de la fibrose cutanée au cours de la Sclérodermie (Figure 1) (Luc Mouthon et al, 2002).

### **II-3 Les changements de la réponse humorale durant une sclérodermie**

L'immunité humorale est caractérisée par la production des anticorps par les lymphocytes B. Ces dernières sont connues par leur production de l'IL-6 et l'IL-2 qui induisent une réponse immunitaire des cellules Th2. La surexpression de la molécule de transduction CD19 sur la surface des lymphocytes B et l'activation des lymphocytes B mémoire, sont caractéristiques de la sclérodermie. Cette surexpression de la molécule CD19 induit la production des auto-anticorps et détruit la tolérance des lymphocytes B envers les antigènes du soi mais le mécanisme provoquant cette surexpression est toujours mal connu. En outre les lymphocytes B activées expriment aussi, un taux très élevé de CMH II qui possède une forte capacité de présentation des antigènes presque égale à celle que possèdent les cellules dendritiques. Les lymphocytes B stimulent la réponse des Th1 par production de l'IL-12, tandis qu'elles stimulent la réponse des cellules Th2 par production de l'IL6.





**Figure 1.** Interaction entre différents types cellulaires durant une sclérodemie (Luc Mouthon, 2002).

Chez les patients atteints d'une sclérodermie le nombre des lymphocytes B et lymphocytes B mémoire augmente alors que le nombre des plasmocytes diminue par apoptose. Cette diminution conduit à une production accrue des lymphocytes B afin de maintenir l'homéostasie (Parel Y et al, 2007).

Une autre caractéristique bien connue de la SCS, donnant preuve d'une activation de l'immunité humorale, est la fréquence élevée des auto-anticorps, même lorsque le nombre de lymphocytes B mémoire, dirigées contre des antigènes ubiquistes diminue. En particulier, il a été détecté la présence d'anticorps antinucléaires chez plus de 90% des sérums de patients. Des études récentes suggèrent que les lymphocytes B jouent un rôle crucial dans la pathogenèse de la sclérodermie (Whitfield M.L et al, 2003).

#### **II-4 Aspects cliniques de la sclérodermie**

Le spectre clinique de la Sclérodermie comprend différents événements cliniques, caractérisés par différentes manifestations à l'égard de l'atteinte cutanée, viscérale, la rapidité de progression de la maladie et la survie. Cliniquement on connaît deux sous-groupes principaux de la sclérodermie, la forme limitée et la forme cutanée diffuse. Les sclérodermies diffuses ou systémiques sont caractérisées par un ensemble de manifestations cliniques, certaines sont dermatologiques (comme les sclero-atrophie cutanée, les troubles pigmentaires, les acroscléroses), caractérisées aussi par le syndrome de CREST et par certains troubles endocriniens, des atteintes œsophagiennes, pulmonaires, rénales et cardiaques. Par ailleurs les sclérodermies localisées sont des affections essentiellement dermatologiques qui sont observées aussi bien chez les enfants que chez les adultes. Quatre grandes formes de sclérodermie localisée sont classiquement décrites : la Morphée ou sclérodermie en plaques, la sclérodermie en bande, la sclérodermie en gouttes et la sclérodermie annulaire (Silman AJ, 1991). Le phénomène de Raynaud est une ischémie digitale provoquée principalement par le froid et peut être observé chez 3 à 4% de la population générale. Toutefois, il est particulièrement associé aux maladies du tissu conjonctif, et il est observé dans 98% des patients avec sclérodermie. Au cours du Phénomène de Raynaud ce sont les petites artères des extrémités qui se rétrécissent anormalement. Le syndrome de Raynaud est responsable d'une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire, de l'occlusion

vasculaire et de l'épaississement de la membrane basale. Il provoque une baisse de la pression de perfusion, une augmentation de la viscosité sanguine et une diminution du calibre (spasme) de l'artère digitale. Dans la sclérodermie, un déséquilibre dans les signaux de l'endothélium, une modification des mécanismes vasodilatateurs, une agrégation plaquettaire élevée et des niveaux anormaux de certains neuropeptides tel que la substance P, la neurokinine A et le neuropeptide Y conduisent à la propension vasospastique bien caractéristique de la maladie (Thompson AE et al, 2001).

## **II-5 Techniques et méthodes d'analyse et de diagnostic de la sclérodermie**

Les techniques utilisées pour le diagnostic des maladies auto-immunes se sont considérablement améliorées au long du temps. Durant les années 50, existaient des méthodes telles que la fixation du complément, l'immunoprécipitation et l'immunofluorescence qui généraient des informations qualitatives sur la présence ou l'absence de certains auto-anticorps. Par la suite des outils de diagnostic se sont mis en place permettant, selon divers critères, la classification des maladies auto-immunes (Renato T, 2007). Actuellement, les stratégies du diagnostic n'identifient pas seulement un seul marqueur biologique de la maladie, sinon l'analyse essaie d'inclure la majorité des modifications qui concernent tout le profil des auto-anticorps impliqués. Les cliniciens commencent souvent le diagnostic d'une sclérodermie avec un questionnaire suivi des examens et analyses cliniques. Parmi les techniques utilisées pour le diagnostic de cette maladie on note : l'immunofluorescence indirecte, le western blot, ELISA et récemment les puces à protéines.

### **II-5-1 Immunofluorescence indirecte (IF)**

L'inventeur de la technique d'immunofluorescence est Coons en 1941. Au début son intention était d'identifier les antigènes présumés étrangers dans les tissus affectés par certaines maladies. La technique a été développée par d'autres groupes, et c'était en 1964 que Beutner et Jordan ont utilisé l'immunofluorescence indirecte pour démontrer la présence d'autoanticorps dans les sérums des patients atteints de pemphigus.

L'immunofluorescence indirecte est une technique d'immunomarquage utilisée pour mettre en évidence la présence d'une molécule bien déterminée, par utilisation d'un anticorps marqué et étiqueté par un fluorochrome (en routine on utilise l'isothiocyanate de fluorescéine: FITC ou la rhodamine isothiocyanate Tertamethyl: TRITC). Cet anticorps marqué réagit face à une préparation biologique et ensuite l'échantillon ainsi traité sera exposé à une source de lumière de longueur d'onde courte (UV ou bleu), laquelle génère un phénomène de fluorescence au niveau de la molécule de signalisation fluorescente qui, à son tour émet une lumière à une longueur d'onde plus longue.

La détection des autoanticorps nucléaires dans les maladies auto-immunes est une étape déterminante. C'est une étape qui sert seulement à fournir des informations sur la présence ou l'absence de certains AAN. Dans le cas d'un patient suspect ou confirmé d'avoir une sclérodemie, la première étape du diagnostic est la réalisation d'une immunofluorescence sur son sérum (Mohan K.H et al, 2008).

Les résultats de la technique d'IF sont différents selon le spectre des anticorps antinucléaires détectés. Ainsi, la présence des anticorps anti-topoisomérase par exemple est révélée par une fluorescence que l'on appelle "homogène" qui colore le noyau tout entier. La présence des anticorps anti ARN-polymérase dans les sérums de patients sclérodermiques se traduit, dans des cellules en interphase, par un aspect moucheté au niveau des régions de l'organisation du nucléole (NOR) et au niveau des chromosomes mitotiques par la présence de granules de petites tailles. Les anticorps antinucléaires sont à l'origine d'une fluorescence nucléaire homogène et d'une coloration faible de certains autres composants nucléaires tels que le nucléoplasme. L'aspect de la fluorescence permet d'orienter le diagnostic, il évoque un ou plusieurs antigènes cibles et une ou plusieurs pathologies associées à l'aspect de la fluorescence obtenue (Youinou MD, 1997).

## **II-5-2 Western Blot**

Des techniques de biochimie tels que l'immunoélectrophorèse, l'immunodiffusion double d'Ouchterlony, l'immuno-précipitation et bien d'autres techniques, ont été utilisées depuis les années 50 comme outils de diagnostic de maladies auto-immunes. Ces différentes techniques sont capables d'identifier un antigène particulier dans un échantillon biologique. C'était en 1981 que Brunette a

développé une nouvelle technique appelée la technique du western blot ou immunoblot. C'est une technique d'une grande utilité qui permet l'identification et la caractérisation des protéines à partir d'un extrait biologique. Récemment, plusieurs études se sont intéressées à la caractérisation des autoantigènes impliqués dans de nombreuses maladies auto-immunes, y compris la sclérodermie. Grâce à la technique de western blot ces études ont décrit que plus de 90% des sérums qui présentent des auto-anticorps anti centromères positifs ont une réaction face aux 3 protéines constitutives du centromère: CENPA, CENPB et CENPC. La protéine CENPB est considérée comme un marqueur sérologique pour le diagnostic de la sclérodermie limitée (MacPhee D.J, 2010). Il a été décrit également grâce à la technique de western blot, qu'un petit pourcentage de sérums AAC positifs contiennent des autoanticorps dirigés contre les protéines CENPD, CENP E, CENPF (Michael Mahler et al, 2011). Autres autoantigènes impliqués dans la réponse auto-immune durant une sclérodermie, ont été détectés pour la première fois grâce à cette technique, comme la protéine Sci170 et les anticorps anti ARN. En se basant sur la technique du western blot et celle utilisant des protéines recombinantes, plusieurs kits sont actuellement commercialisés afin de diagnostiquer d'une manière plus rapide et plus efficace certaines maladies auto-immunes.

### **II-5-3 Les arrays ou puces à autoantigènes**

Durant ces dernières années, la biopuce ou microarray est devenu un outil extrêmement puissant d'analyse dans divers domaines. Les puces à ADN ou biopuces ont montré une grande efficacité dans les études d'expression génique et de certaines maladies humaines. Actuellement, il a été mis au point des puces à protéines ou peptides, à anticorps, à carbohydrate et aussi à agents infectieux, permettant ainsi le diagnostic et l'identification des biomolécules impliquées dans plusieurs processus. Le premier essai de développement d'une puce à autoantigènes était celui du groupe de Joons et al en 2000. Ils ont décrit une puce à autoantigènes utilisée pour la détection des autoanticorps et pour le diagnostic des sérums des patients souffrant de maladies auto-immunes. Les sérums testés appartenaient à différentes maladies, entre elles la sclérodermie. Cette puce permet la détection d'un nombre limité des autoantigènes comprenant seulement la protéine centromérique CENPB et autres autoantigènes non centromériques. Un autre travail pertinent de Robinson et al en 2002, a été le

développement d'une puce contenant 196 autoantigènes définis comme de forts autoantigènes dans différentes maladies auto-immunes. Cette puce a été testée face à différents sérums de patients souffrant de maladies auto-immunes afin de montrer la complexité, la spécificité et la diversité de cette technique (Villalta. D et al, 2007).

## **II-6 Traitements de la sclérodermie**

Les traitements de fond de la sclérodermie sont proposés en fonction du type des symptômes cliniques et des éventuelles atteintes viscérales. L'efficacité de certains traitements à diminuer la gravité de quelques symptômes a été démontrée. Dans ce contexte une attention particulière doit être prêtée aux traitements pharmacologiques symptomatiques qui pourraient influencer sur l'évolution de la maladie. Actuellement des thérapeutiques non médicamenteuses sont mises en place. (Mitchel.H et al, 1997; Postlethwaite A.E et al, 2010). Le tableau 4 résume les traitements utilisés actuellement.

## **III-Autoanticorps**

Les autoanticorps sont des anticorps dirigés contre les molécules propres du soi. Grâce à l'application de la technique d'immunofluorescence développée en 1953 par Albert Coons et en utilisant une lampe UV archaïque, George Friou a pu montrer que le sérum des malades lupiques se fixe sur les noyaux des cellules. En 1961 l'anglais J.S Beck a décrit les différents profils (patterns) d'immunofluorescence correspondant à différents anticorps quand ils s'unissent à différents antigènes. Jusqu'à présent, les techniques de clonage et d'expression de protéines recombinantes, de Western Blot et d'immunofluorescence ont permis d'identifier une grande variété d'autoanticorps. Chaque type d'autoanticorps spécifiques est associé généralement à une famille de maladies auto-immunes, de là surgit l'idée d'utiliser ces autoanticorps pour le diagnostic de chacune de ces maladies. Les principales classes des autoanticorps impliqués dans la réponse auto-immune durant la sclérodermie sont définies ci-dessous.

**Tableau 4.** Traitements utilisé en général face à diverses manifestations cliniques durant une sclérodermie.

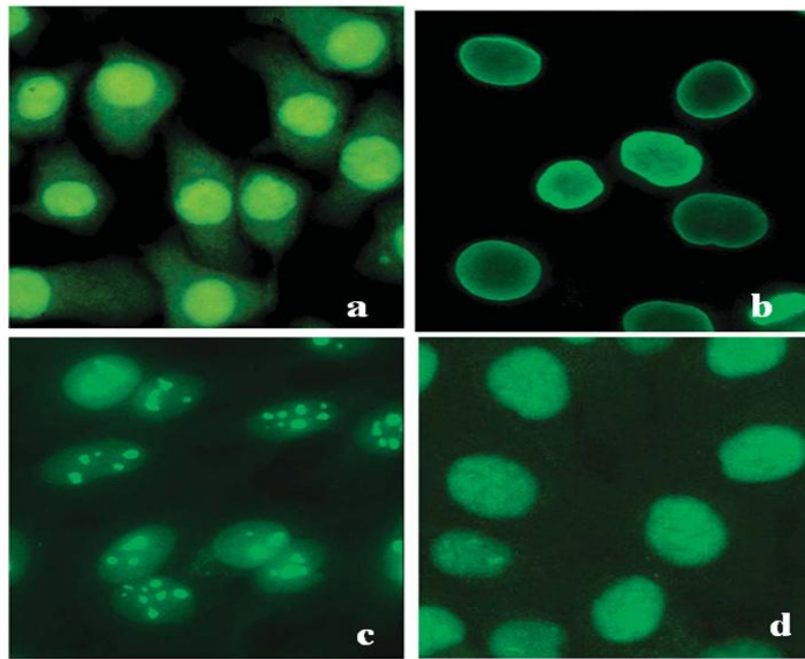
Manifestations	Traitements
Phénomène de Raynaud	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Traitements pharmacologiques (les Vasodilatateurs, Inhibiteurs calciques).</li> <li>- Traitements non pharmacologiques (Protection du froid et Arrêt du tabac).</li> </ul>
Ulcères digitaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Traitement local (Détersion et Nettoyage des plaies).</li> <li>- Traitement pharmacologiques de l'ulcération active (Inhibiteurs calciques, Analogues de la prostacycline, Antagoniste de l'endothéline).</li> <li>- Traitement chirurgical : Réduction chirurgicale du volume d'une calcification.</li> </ul>
Atteintes articulaires et péri- articulaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-inflammatoires non Stéroïdiens et des corticoïdes.</li> </ul>
Pneumopathie infiltrative diffuse	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Traitements symptomatiques (Arrêt définitif du tabac, Oxygénothérapie, Vaccination contre le virus de la grippe).</li> </ul>
Traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Traitement non spécifique (Traitement anticoagulant et diurétique, Oxygénothérapie).</li> <li>- Traitement spécifique (inhibiteur de calcium, prostacycline intraveineuse, Analogue de la prostacycline, analogues des récepteurs de l'endothéline, inhibiteurs de la phospho-diestérase type V).</li> </ul>
Atteintes cardiaques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibiteurs du calcium et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, anti-arythmiques et diurétique.</li> </ul>
Crise rénale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine,</li> <li>- Inhibiteurs calciques par voie intraveineuses</li> <li>- purification extra- rénale.</li> </ul>

### **III-1 Autoanticorps anti nucléaires: AAN**

Les autoanticorps anti nucléaires ou AANs sont des autoanticorps dirigés contre le noyau et/ou ses constituants (Figure 2) (Beck et al, 1962). Ces autoanticorps synthétisés durant un phénomène d'auto-immunité présentent une grande variété allant des maladies infectieuses, inflammatoires, néoplasiques aux maladies auto-immunes où ils sont plus fréquents, tel que le lupus, la sclérodermie, le syndrome de Sjörgren et bien d'autres.

En Avril 1943, l'hématologue Malcom Hargraves a remarqué, dans la moelle sternale d'un malade, la présence de cellules particulières constituées de polynucléaires neutrophiles ayant phagocyté le noyau d'une autre cellule. Ce n'est cependant qu'en 1949 qu'il fut démontré que ces cellules étaient associées au lupus érythémateux et elles furent, pour cette raison, appelés cellules LE. Les études se sont poursuivies et en 1957 H.G Kunkel et al ont démontré que le facteur LE du sérum pouvait également être absorbé par le complexe ADN- histones constituant des nucléosomes, et que ce pouvoir adsorbant était aboli après un traitement des nucléoprotéines par la DNase. La même année trois équipes différentes révélaient que le sérum des patients lupiques réagissait avec l'ADN. A partir de cette date les anticorps anti-ADN étaient devenus le marqueur sérologique spécifique du lupus. On trouve les AAN chez plus de 90% des patients atteints d'une sclérodermie. Leur rôle potentiel dans la pathogénèse de la sclérodermie et leur relation avec la fibrose, ne sont pas encore complètement élucidés. Les AAN présentent une spécificité variée qui est produite essentiellement face à des antigènes impliqués dans le processus de la régulation transcriptionnelle (protéines centromériques, topoisomérase, ARN polymérase). Leur rôle pathogène est fortement associé au phénotype de la maladie. Certains de ces anticorps sont spécifiques de la sclérodermie et constituent un outil de diagnostic. Ainsi, dans une sclérodermie on trouve des anticorps anti-topo-isomérase (anti-Scl 70) (AAT), anti-centromère (AAC) et anti-ARN polymérase (ARNP III) (Martial K et al, 2007).



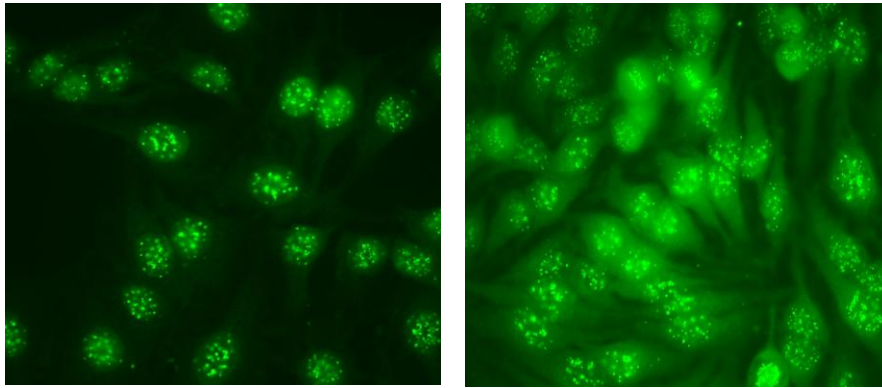


**Figure 2. Exemples des aspects de l'immunofluorescence de type AAN dans des cellules HeLa.** Les modèles classiques qui peuvent être obtenus en général: a) coloration homogène, b) coloration homogène anti ADN avec signal intense périphérique, c) fluorescence nucléolaire, d) fluorescence mouchetée.

## II-2 Anticorps anticentromère : AAC

Les autoanticorps anticentromère ont été décrits par Moroi et al, en 1980. Dans une immunofluorescence indirecte (IF) les AAC apparaissent comme des spots ponctuels dispersés au niveau nucléaire pendant l'interphase et sous forme localisé au niveau du centromère (au niveau du kinétochore) des chromosomes pendant la métaphase (figure 3). La technique du western Blot a permis l'identification de divers auto-anticorps dirigés contre certains antigènes centromériques tel que la protéine CENPA, CENPB et CENPC (Earnshaw W, 1986 ; Muro Y et al, 1990). Ces anticorps et spécialement ceux contre l'antigène CENPB, sont utilisés comme marqueur dans le diagnostic clinique de la sclérodémie. En combinaison avec le syndrome de Raynaud, la présence des AANs permettent de prévoir l'évolution d'une Sclérodémie (Tan.EM et al, 1980). On parlera avec plus de détails de chacun de ces anticorps majoritaires durant une sclérodémie, dans le paragraphe III-3.

Les AAC sont des marqueurs hautement spécifiques pour la sclérodémie mais peuvent être détectés dans d'autres maladies. Les études ont montré que les AAC sont présentes jusqu'à 3% dans les sérums des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (SLE), 3-30% des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR), et 10 - 30% des patients atteints de cirrhose biliaire primitive (CBP). D'autres auto-anticorps anticentromères ont été décrits dans différentes maladies auto-immunes comme les autoanticorps anti CENPH. La Protéine CENPH a été identifiée pour la première fois comme une composante des centromères dans des cellules de souris (Sugata et al, 1999). En 2000, le même groupe a décrit la CENPH avec la CENPC et CENPA comme composants essentiels fondamentaux du kinétochore interne. La CENPH est requise pour l'incorporation et l'union de CENPC de Mis 12 et de la plupart des protéines du complexe CCAN, au niveau du centromère. L'absence de la protéine centromérique H provoque une ségrégation défectueuse des cellules, une aneuploïdie et la mort cellulaire. La fonction exacte de la protéine CENPH demeure encore non claire. Des études récentes ont décrit que la surexpression de cette protéine est impliquée dans plusieurs types de cancer (pulmonaire, naso-pharyngal) et elle est présente au cours de la maladie de Sjorgen (Hsu Tc et al, 2006 ; Xian-Zhi Guo et al, 2008).



**Figure 3. Exemples d'immunofluorescence avec coloration centromérique dans des cellules HeLa.** Les AAC apparaissent comme des spots ponctuels dispersés au niveau nucléaire durant l'interphase et sous forme localisé au niveau du centromère (au niveau du kinétochore) lors de la métaphase.

Le groupe de Yasushi Tomita (Akikko S et al, 2009), ont révélé la présence d'un autre type d'autoanticorps présent dans les sérums de patients sclérodermiques, il s'agit de l'anticorps anti CENPO. La protéine CENPO est une protéine constitutive du centromère, présente durant tout le cycle cellulaire, qui est impliqué dans l'union des chromatides sœurs et dans la réparation des erreurs d'union aux microtubules. (Hori T et al, 2007 ; Saito A et al, 2009).

### **III-3 Les types des auto-anticorps chez des patients atteints d'une sclérodermie**

Il a été démontré pendant les 15 dernières années que les auto-anticorps spécifiques de la sclérodermie, la topo isomérase I et les AAC, sont les marqueurs immunologiques les plus communs de cette maladie. Chacun de ces autoanticorps est associé à un groupe de patients ayant des caractéristiques et des phénotypes cliniques particuliers. Ces anticorps contrairement à ce qui est observé dans certaines maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique (LES), sont détectées tout au long de la maladie et persistent sous traitement. Deux groupes d'autoanticorps ont été identifiés dans la sclérodermie : des autoanticorps spécifiques et non spécifiques.

#### **III-3-1 Autoanticorps spécifiques**

Durant une sclérodermie les anticorps présents renseignent souvent sur les symptômes cliniques et la sévérité de la maladie. Les patients qui souffrent d'une sclérodermie ont tendance à avoir des autoanticorps anti-topoisomérase I, des anticorps anti-centromère, et des U3RNPs anti-ARN polymérase (y compris la fibrilarine). Les auto-anticorps anti-topo isomérase sont les plus fréquents et sont associées à la fibrose pulmonaire, à certaines complications cardiaques et à certains cancers. Les autoanticorps anti-ARN polymérase III sont associés à de graves complications cutanées et à des crises rénales tandis que les anti-fibrilarine sont associées à l'hypertension artérielle et à des complications cardiaques. Les patients atteints du syndrome de CREST ou une sclérodermie limitée présentent des anticorps anti-centromère ou anti Th/ To RNPs. (Tableau 5)

### **III-3-1-1 Anticorps anti-topoisomérase**

Les anticorps anti-topoisomérase sont nommés aussi anticorps anti-«ScI70 » car ils ont été découverts chez des patients atteints par la sclérodermie. L'antigène spécifique de ces anticorps est la topoisomérase I. Dans les cellules eucaryotes l'état topologique de l'ADN est modulé par deux enzymes connues sous les noms de topoisomérase I et II. La topoisomérase I est une protéine basique non histone, responsable de la structure hélicoïdale de l'ADN pendant sa transcription et sa duplication. Des études qui datent de 1986 et 1987 ont montré que bien que la topoisomérase I ne soit pas nécessaire pour la viabilité de la cellule elle semble jouer un rôle important dans l'organisation de la chromatine durant la mitose, au cours de la réplication, la recombinaison et la transcription de l'ADN. La topoisomérase I est une protéine associée à la matrice nucléaire dans le nucléoplasme, dans le nucléole et les régions d'organisation du nucléole (NOR). La fonction de la topoisomérase I est de libérer ou de décompacter la chromatine de sa structure superenroulée en une structure relâchée permettant l'accès des ARN polymérase pour transcrire les séquences et initier la transcription correspondante. La forme native de cette enzyme a un poids moléculaire (PM) de 100 kDa avec un produit de dégradation de 70 kDa.

Après sa découverte l'autoanticorps ScI-70 a été considérée comme un marqueur sérologique des patients avec Sclérodermie (Muryoi T et al, 1992 ; Kato.T et al, 1993). Depuis leur découverte en 1986, toutes les études portant sur les anticorps anti-ScI70 sont focalisées surtout sur leur spécificité dans les formes diffuses des sclérodermies, bien qu'ils ont été observés dans quelques cas de syndrome de CREST. Le taux de ces autoanticorps ne semble pas évoluer au cours de la maladie. Ainsi, leur suivi n'a en théorie aucun intérêt pour le pronostic de la maladie. La présence des anti-topoisomérase I est liée à la fibrose pulmonaire. Ces autoanticorps, en combinaison avec les phénomènes de Raynaud, présentent une valeur prédictive avant que la sclérodermie soit développée (Weiner ES et al, 1991).

**Tableau 5.** Association entre le type des anticorps, le phénotype le rôle pathogène et la signification clinique des anticorps durant une sclérodermie.

<b>Antigène</b>	<b>Antigène cible</b>	<b>Sous groupe</b>	<b>Phénotype</b>
Topoisomérase I (Scl-70)	Protéine de 100 kDa Relaxation de l'ADN compact.	Diffuse	Fibrose pulmonaire, problèmes cardiaques, cancer.
ARN polymérase III	Protéine de 145 et 220 kDa	Diffuse	Problèmes cutanées, Crise rénale.
Protéines centromériques	Protéines de différents poids moléculaires.	Limitée (CREST)	Perte ischémique au niveau des doigts, Sicca.
U3-RNP (fibrillarin, Mpp1, hU3-55k)	Protéine de 34 kDa des U3RNP.	Diffuse ou limitée	Hypertension pulmonaire, maladies pulmonaires.
Th/To-RNP	Protéines nucléolaires et cytoplasmiques de 40 kDa associées aux ARN 7-2S et 8-2S.	Limitée	Maladies pulmonaires, complication viscérales
PM/Scl	11 protéines de 11 à 110 kDa.	Chevauchement	Myosites (inflammation musculaire)
U1-RNP	ARN et protéine de 70 kDa, protéine A de 33 KDa, protéine C de 22KDa.	Chevauchement	LES et sclérodermie

### **III-3-1-2 Anticorps anti-ARN polymérase (anticorps anti-ARNP)**

Les ARN polymérase (I, II, III) sont des complexes enzymatiques formés de multiples sous-unités, les plus fréquentes de 120 kDa et 190 kDa pour le type I, 220 et 145 kDa pour le type II, 155 et 138 kDa pour le type III. Les anticorps anti-ARN polymérase I ont été décrits en 1982 alors que les types II et III ont été décrits durant les années 90. (Hirakata M et al, 1993). Les anticorps anti-ARN polymérase de type I, par immunofluorescence indirecte dans des cellules HEP2 génèrent dans des cellules en métaphase un aspect nucléolaire moucheté ou ponctué au niveau des Régions d'Organisation du Nucléole (NOR). Au niveau des chromosomes durant la phase mitotique ils génèrent des grains de petite taille associés aux NOR. La majorité des sérums avec anticorps antipolymérase de type I ont aussi des anticorps anti-ARN type II ou III (Reimer G et al, 1987). Les patients présentant des anti- polymérase I, II et III ont un pronostic plus sévère en comparaison avec les patients présentant des anticorps anti-Sc170.

### **III-3-1-3 Autoantigènes centromériques : CENPs**

Les premières protéines centromériques ont été identifiées grâce aux anticorps anti-centromère à partir des sérums de patients atteints de ScS. En utilisant les techniques d'immunofluorescence, on a localisé Les protéines CENPA, B et C, au niveau du centromère le long du cycle cellulaire et durant toutes ses phases. Je commenterai ensuite les connaissances générales dont on dispose actuellement sur 3 auto-antigènes centromériques identifiés à partir des sérums des patients atteints d'une sclérodermie.

#### **III-3-1-3-1 CENPA**

Les chromosomes de la majorité des cellules eucaryotes contiennent une structure protéique : le kinétochore qui forme la surface entre l'ADN centromérique et les microtubules permettant la séparation des chromosomes vers les pôles pendant la division cellulaire. Un type unique de nucléosomes spécifiques de la chromatine

centromérique fournit la base pour la formation de kinétochore. Il existe une variante d'histone H3 présente au niveau des nucléosomes centromériques, la protéine CENPA qui a été montrée comme un marqueur épigénétique de la structure du centromère.

Les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment un octamère globulaire (2H2A, H2B, H3, H4) qui permet l'enroulement d'environ 150-200 paires de bases d'ADN en un tour trois quart afin de former un nucléosome ou "collier de perles". Le premier degré de condensation de l'ADN (11 nm) de l'histone H1, permet à son tour, la compaction des nucléosomes et condense alors la structure hélicoïdale obtenue (l'obtention d'un solénoïde de condensation de l'ADN de 30 nm). Il y a environ deux cents paires de bases entre deux nucléosomes, cette valeur varie selon les espèces (par exemple, on en compte 165 paires de base pour la levure). Le second niveau de compaction de l'ADN paires de bases d'autres protéines dites « non histones ». Le degré de condensation de l'ADN autour des nucléosomes, des histones et des protéines non histones est variable le long des chromosomes. Le degré de condensation de la chromatine varie et il est faible dans l'euchromatine pour qu'elle soit accessible à la machinerie de l'ARN polymérase. Ce degré est élevé dans l'hétérochromatine, qui est considérée en général « inaccessible » à la machinerie de transcription. Le degré de condensation des nucléosomes est régulé par des modifications des extrémités N-terminales des histones, comme la phosphorylation, acétylations, méthylation, ubiquitination, sumoylation, etc. Toutes ces modifications sont catalysées par des enzymes spécifiques. La modification covalente des histones peut agir soit directement en modifiant la compaction de l'enroulement de l'ADN autour des nucléosomes, soit indirectement par la création des signaux permettant l'union de protéines capables de modifier la structure de la chromatine. La protéine CENP-A est une protéine de 18 kDa identifiée en premier chez les humains par les auto-anticorps présents dans le sérum des patients atteints d'une sclérodermie. C'est une protéine de 140 acides aminés, avec 51% de séquence identique aux histones H3. De la levure *Saccharomyces Cerevisiae* aux êtres humains la protéine centromérique A (CENPA) possède un domaine NH<sub>2</sub>-Terminal qui diffère complètement de celui des Histones H3, et qui paraît être important pour l'interaction avec les autres composants du kinétochore. En revanche, le domaine COOH-terminal présente 62% d'homologie avec les H3 du nucléosome. Un autre domaine faisant partie aussi du COOH-terminal a été défini comme nécessaire pour la liaison au centromère, c'est le domaine CATD (CENPA Targeting Domain). La localisation de la CENPA par



microscopie électronique a démontré qu'il occupe un domaine compact au niveau du kinétochore interne sous forme de disque d'un diamètre de 0,5 et 1  $\mu\text{m}$ .

Les techniques d'immunoprécipitation, ont permis d'identifier l'ADN humain associé à l'ADN de la protéine CENPA comme ADN alpha satellite. Des homologues de la protéine CENPA ont été étudiés et caractérisés chez plusieurs espèces comme la levure, les nématodes, les plantes, les amphibiens, les oiseaux, les mammifères, les rats, et les souris. Des expériences ont montré chez les levures que la protéine CENPA peut être structurellement et fonctionnellement substituée par la CENPA humaine, ce qui suggère fortement que cette protéine est conservée entre les levures et les mammifères (Valdivia MM et al, 2009). D'autres expériences ont montré que l'absence du gène CENPA est létale lors des premiers stades de la vie embryonnaire des souris. Des embryons affectés ont montré de graves problèmes mitotiques, tel que la formation des micro et macro noyaux, la fragmentation de la chromatine et son hypercondensation, ainsi qu'une dispersion des CENPB et CENPC dans le noyau. La CENPA est une protéine clef pour l'assemblage et l'organisation de la chromatine du centromère et du kinétochore. Il assure la construction du complexe CCAN. La réduction du niveau de la protéine CENPA semble affecter le niveau du reste des protéines CENPs. Des études récentes ont démontré que la localisation de la protéine CENPA est affectée par les autres protéines CENPs et spécialement associée au complexe CENPH/I (Marinela P et Fukagawa T, 2011).

Chez les humains, à l'inverse des variantes Histones 3.1 et histones 3.2 qui sont incorporés dans le cycle exclusivement durant la phase S, la protéine CENPA est incorporée sur la chromatine centromérique après la sortie de la mitose et durant les premières heures de la phase G1 de cycle cellulaire. Chez d'autres espèces comme *Arabidopsis Thaliana* on a démontré que l'incorporation de la protéine centromérique A, se produit pendant la phase G2 (Lermontova et al, 2006).

Plusieurs essais d'expression de la protéine recombinante CENPA ont été réalisés en utilisant différents vecteurs et sous des conditions variées. Un travail de récent a décrit la substitution des codons majeurs du gène codant pour le CENPA par d'autres codons mineurs optimisés pour améliorer le niveau d'expression de cette protéine dans *E.coli*. La protéine CENPA recombinante purifiée a été utilisée dans plusieurs essais Elisa pour le diagnostic de la sclérodermie. Cependant les kits de diagnostic commercialisés utilisant cette protéine recombinante sont peu nombreux.

Certaines études ont décrit cette protéine comme un marqueur sérologique précoce du développement d'une sclérodémie (Mahler et al, 2011).

Différents groupes de recherche se sont intéressés à déterminer les épitopes de la CENPA, impliqués dans la réponse auto-immune durant une sclérodémie. La région des 45 premiers acides aminés a été définie comme la région antigénique majeure de la protéine CENPA et contient divers épitopes (Muro et al, 1996 ; Akbarali Y et al, 2007), ont décrit que 86% des patients sclérodermiques AAC positifs ont une réaction face à la région antigénique allant de l'acide aminé 3 jusqu'au 17 de la protéine CENPA et que 87% des mêmes patients présentent aussi une réaction face à la région antigénique allant de l'acide aminé 25 jusqu'au 38 de cette protéine. En 1998, Valdivia et al ont été capables de produire dans des lapins, un anticorps spécifique à la région antigénique allant de l'acide aminé 3 jusqu'au 17, confirmant ainsi l'antigénicité de la région N-terminal de la protéine CENPA (Valdivia M M et al, 1998).

### **III-3-1-3-2 CENPB**

En 1984, Earnshaw et al, ont décrit un antigène qui l'ont nommé au début CREST 77, qui par la suite a été nommé CENP B (Earnshaw et Rothfield, 1985). CENPB est une protéine de 80 kDa localisée au niveau du centromère en métaphase. Valdivia et Brinkly ont confirmé ces résultats en affirmant que cet antigène est très résistant à l'extraction avec les nucléases, l'héparine, les détergents et partiellement résistant à l'extraction avec 2M d'urée. Earnshaw et al ont démontré que la protéine CENPB est un produit d'un ARNm d'une taille de 2,9 kb, et que son gène codant ne contient pas d'introns. Le produit de ce fragment est de 64 kDa qui ne coïncide pas avec la mobilité électrophorétique apparente de 80 kDa. Les chercheurs ont attribué cet effet à la présence de deux régions très riches en résidus acides (des acides glutamiques), plus spécifiquement, c'est le fragment de 151 acides aminés de la partie carboxyl-terminal qui altère la mobilité électrophorétique de 16 à 21 kDa.

Durant la division cellulaire la protéine CENPB est nécessaire pour l'établissement, mais pas pour le maintien de la chromatine centromérique, et aussi paraît avoir un rôle dans l'élimination des centromères ectopiques formés en dehors du lieu de formation habituelle ou spécifique (Okada et al, 2007). CENPB est une protéine constituée de trois domaines :

- Une région de liaison à l'ADN au niveau de la partie amine terminal (Yoda et al, 1992), et qui se lie spécifiquement à une séquence de 17pb appelée boîte CENPB. On trouve la boîte CENPB chez tous les chromosomes, à l'exception du chromosome Y chez les êtres humains, les chimpanzés, les gorilles, et les Orangs-outans (Haaf et al, 1995).

- Un domaine central, localisé entre les acides nucléiques 208 et 253 à travers lequel elle se lie aux autres protéines CENPB, pour la formation des dimères.

- Le domaine carboxyle terminal à travers lequel l'interaction avec les autres molécules a lieu, en créant une structure condensée de chromatine. (Okada et al, 2007).

L'antigène CENPB est considéré comme marqueur sérologique de la sclérodémie limitée, et cet antigène est présent dans plus de 80% des cas. Un pourcentage important des patients qui présentent des anticorps anti-CENPB souffrent d'une hypertension artérielle pulmonaire et des ulcérations digitales. Une étude de Robitaille.G et al, en 2009 a présenté une nouvelle hypothèse qui a tenté de mettre en rapport directement la présence de l'anti-CENPB et le développement d'une hypertension pulmonaire durant une sclérodémie. La protéine CENPB pourrait avoir un rôle important dans la stimulation de la migration de certains types cellulaires (tel que les cellules musculaires lisses vasculaires), et pourrait avoir un potentiel d'activation de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires qui activent des molécules intracellulaire comme les kinases MAP, Src, P38 et le facteur de croissance ERK1/2 (Robitaille.G et al, 2009).

### **III-3-1-3-3 CENPC**

A côté de l'antigène CREST 77 nommé ensuite CENPB, Earnshaw et al en 1984 ont détecté la présence d'un autre antigène qu'ils ont nommé CREST 110 qui est connu de nos jours sous le nom de CENPC. L'ADN qui code pour la protéine CENPC est une séquence de 3113 paires de bases qui se trouve en un seul loci. Cette séquence code pour une protéine d'un poids moléculaire de 170 kDa différent de poids moléculaire apparent de 140 kDa obtenu après sa migration sur gel de polyacrylamide. La protéine CENPC est une protéine hydrophile basique localisée sur la couche interne du kinétochore, sur lequel le domaine responsable de l'union au centromère se situe au niveau des premiers 537 acides aminés et l'expression du fragment entre 638 et 829 a.a

été définie comme responsable de la localisation nucléolaire de cette protéine (Saitoh et al, 1992). La protéine CENPC joue un rôle important dans la mitose et dans le contrôle du cycle cellulaire. Son expression augmente à partir de la phase S à travers la G2 et la mitose, atteignant un maximum en G1, et la même chose a été observée pour les niveaux d'expression l'ARNm. Cette protéine présente aussi un domaine de liaison à l'ADN qui est localisé au niveau de la région hydrophile entre la position 398 et 498 (Yang CH et al, 1996).

On a détecté la présence des auto-anticorps anti CENPC dans les sérums de patients atteints d'une sclérodermie. Ces sérums qui sont sclérodermiques et qui sont AAC positifs produisent une réponse auto-immune face aux protéines CENPA, CENPB et CENPC. Tandis que dans le cas des patients atteints du syndrome de Sjogren, bien que la fluorescence génère un signal centromérique, la réponse auto-immune est produite seulement face à l'autoantigène CENPC et ne comprend pas l'antigène CENPB (Gelber A C et al, 2006).

### **III-3-2 Autoanticorps non spécifiques**

C'est un groupe d'autoanticorps hétérogènes dont certains sont dirigés contre différents composants nucléaires tels que la fibrilarine, PM-Scl, Th/Tho, et d'autres sont dirigés contre certaines cellules, organites ou constituants cellulaires, tel que les cellules endothéliales, les annexines et les mitochondries. Ces auto-anticorps ne sont pas seulement présents dans les sérums de patients atteints d'une sclérodermie mais aussi, dans les sérums de patients souffrant de différentes maladies auto-immunes. Le tableau 6 résume la prévalence de certains auto-anticorps non spécifiques dans divers processus auto-immunes.

#### **III-3-2-1 Anticorps anti-endothéliale**

L'endothélium vasculaire est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins en contact avec le sang. La fonction la plus évidente de l'endothélium est de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Les nouveaux vaisseaux peuvent se former chez l'adulte par bourgeonnement des cellules endothéliales (angioblastes préexistantes) (angiogenèse) ou via le recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC)

(vasculogénèse) (Bordrona A et al, 2001). Les PEC jouent un rôle important dans la vasculogénèse et pourraient être impliqués dans les manifestations systémiques des rhumatismes inflammatoires. L'apoptose des cellules endothéliales est un événement primaire dans la sclérodermie qui peut être liée à une infection virale par le cytomégalo-virus. En relation avec cette donnée on a observé un taux élevé d'anticorps anti-cytomegalo-virus (CMV) durant une Sclérodermie (Konstantin V et al, 1996). On a observé aussi de grandes similitudes entre les vasculopathies causées par CMV et les problèmes vasculaires causés dans une sclérodermie (Avouac J et al 2008). Plusieurs chercheurs ont décrit la présence des anticorps anti-cellules endothéliales (AECA) chez des patients atteints de ScS. La prévalence de ces anticorps varie entre 28 à 85% chez une population atteinte d'une SSc, de 15 à 88% dans le cas d'une SLE et jusqu'à 87% dans le cas d'une AR (Hill MB et al, 1996).

### **III-3-2-2 Anticorps anti-nucléolaires**

De nombreux autoanticorps mis en évidence au cours de la sclérodermie sont dirigés contre des protéines nucléolaires. Il s'agit des anticorps anti-fibrillarine, anti-Th/To et anti-PM/Sc1.

#### **III-3-2-2-1 Anticorps anti-fibrillarine**

Les « small nucleolar RNP » (snRNP) sont des complexes formés par des protéines et de l'ARN, qui se localisent dans les régions fibrillaires denses et granulaires du nucléole. L'U3 RNP est le plus abondant des snRNP et se compose d'un ARN de 217 nucléotides et de plusieurs protéines dont la fibrillarine. Celle-ci est une protéine basique de 34 kDa, qui fait partie de l'U3 RNP et intervient dans la formation de l'ARN ribosomal. La fibrillarine est hautement conservée entre les espèces (Aris JP et al, 1991). Les anticorps anti-fibrillarine sont à l'origine d'une fluorescence nucléolaire spécifique sans coloration du nucléoplasme. Les anticorps anti-fibrillarine semblent être préférentiellement associés aux haplotypes HLA DRB1-1302, DQB1-0604. Les anticorps anti-fibrillarine sont présents chez 5 à 8% des patients atteints de Sclérodermie et sont souvent associés à des complications cutanées diffuses, des complications viscérales sévères, une hypertension artérielle pulmonaire grave et une

**Tableau 6.** Prévalence de certains autoanticorps non spécifiques communs entre la sclérodémie et d'autres maladies auto-immunes.

Auto-anticorps non spécifiques	Prévalence
Fibrilarine (U3 –RNP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- - 10% Syndrome de CREST</li> <li>- - 5% forme diffuse de la sclérodémie</li> </ul>
Th/To (7-2MRP RNP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 8-19% syndrome de CREST</li> <li>- 1-11% forme diffuse de la sclérodémie</li> <li>- 3% Polymyosites et sclérodémie</li> <li>- 3% syndrome de Raynaud I</li> <li>- Dans des cas rares du lupus</li> </ul>
Fibrilline	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 49% syndrome de CREST</li> <li>- 37% formes difuses de la sclérodémie</li> <li>- 35% syndrome de sharp</li> <li>- 6% syndrome de Sjorgen</li> </ul>
Cellules endothéliales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 28 à 85% durant la sclérodémie</li> <li>- 0 à 87% durant une arthrite rhumatoïde</li> <li>- 19 à 81% durant une granulomatose de Wegener</li> </ul>

insuffisance gastro-intestinale modérée. La coexistence des anticorps anti fibrillarine avec les AAC ou les AAT, est rare. Ces anticorps ne sont pas spécifiques de la sclérodermie et peuvent être détectés durant d'autres maladies auto-immunes tels que les Lupus érythémateux disséminés, la polyarthrite Rhumatoïde, le syndrome de Sharp et le syndrome de Sjörger (Takeuchi K et al, 1995).

### **III-3-2-2-2 Anticorps anti-Th/To**

Les anticorps anti Th/To sont dirigés contre une protéine nucléolaire de 40 kDa. Ces anticorps sont présents chez 4% des malades atteints d'une ScS, et aussi dans des sérums de patients avec le syndrome de Raynaud (Okano Y et al, 1990). Leur détection chez des malades sclérodermiques est associée à une atteinte digestive, des lésions cutanées plutôt limitées, une fibrose pulmonaire et une diminution de la survie (Falkner D et al, 1998).

### **III-3-2-2-3 Anticorps Anti-PM / Scl**

Les anticorps anti-PM/Scl représentent un marqueur sérologique spécifique des patients souffrant d'une sclérodermie et d'une polymyostis. Les anticorps anti-PM/Scl sont les premiers antinucléolaires identifiés en 1977. Le complexe antigénique PM/Scl comprend 11 à 16 polypeptides différents. Plusieurs de ces protéines peuvent être la cible des anticorps PM/Scl, et les deux protéines de 75 kDa et 100 kDa ont été identifiées comme la partie antigénique majeure (Mahler M et al, 2005).

Les anticorps anti-PM/Scl, sont à l'origine d'une fluorescence nucléolaire homogène avec une faible coloration du nucléoplasme sur des cellules Hep2, et sont dirigés contre un complexe de protéines ribosomales. La fréquence des anti-PM/Scl varie selon le groupe ethnique et plusieurs études ont démontré une association des anticorps anti-PM/Scl avec l'haplotype HLA DR3-DQ2 (Falkner D et al, 1998). Ces anticorps sont présents chez 3% des malades atteints de Sclérodermie et sont associés à la survenue d'arthrite, d'une myopathie inflammatoire et d'une atteinte cutanée limitée. Ils ne sont pas spécifiques de la maladie et peuvent être détectés au cours des polymyosites, dermatomyosites, des syndromes de chevauchement entre myosite et sclérodermie et ainsi au cours de syndrome de Raynaud de forme isolée. Lors de l'IF le

profil obtenu après fixation des auto-anticorps PM/Scl est similaire à celui obtenu lors de la localisation nucléaire générée par le VIH. Ceci indique que l'antigène viral qui partage des épitopes avec l'hôte peut initier une réponse auto-immune par mimétisme moléculaire.

### **III-3-2-3 Anticorps anti-annexine V**

Les annexines constituent une famille de protéines intracellulaires, calcium dépendantes qui se lient aux phospholipides. L'annexine V est la protéine intracellulaire la plus abondante, elle présente également dans le sang et le liquide amniotique. Elle joue un rôle d'anticoagulant naturel en protégeant les phospholipides des facteurs de la coagulation. Les altérations membranaires durant l'apoptose provoquent l'extériorisation de l'annexine V, ce qui peut entraîner la production des anticorps. Il a été démontré une association entre la détection d'anticorps anti-annexine V et la survenue de phénomènes d'ischémie digitale durant la sclérodémie. Les anticorps anti-annexine V ne sont pas spécifiques de la sclérodémie et peuvent apparaître durant d'autres maladies auto-immunes tel que le Lupus (Sugiura K et al, 1999).

### **III-3-2-4 Anticorps anti-mitochondrie**

Ces anticorps sont des marqueurs sérologiques de la cirrhose biliaire primaire (CBP) et sont détectés chez les malades ayant une sclérodémie limitée avec une CBP (Akiyama Y et al, 2000).

### **III-3-2-5 Anticorps anti-collagène**

Des anticorps dirigés contre les collagènes I, III, IV, VI et la laminine ont été détectés durant la sclérodémie, surtout en phase initiale de la maladie. Leur fréquence est plus élevée dans la forme diffuse en comparaison avec la forme limitée, et peuvent réagir aussi bien contre le collagène natif que dénaturé. Les anticorps anti-collagène IV ont été associés à l'apparition d'une fibrose pulmonaire sévère (Riente L et al, 1995; Ghosh AK et al, 2002).



### **III-3-2-6 Anticorps anti-fibroblastes**

Les fibroblastes ont été largement étudiés dans la sclérodermie. Les auto-anticorps anti-fibroblastes induisent un phénotype de fibroblastes activé avec une expression de façon constitutive des molécules de la surface cellulaire et de l'internalisation ultérieure des anticorps. Ce type d'auto-anticorps a été aussi détecté chez des patients avec hypertension pulmonaire primaire (Kristin. M et al, 1994).

### **III-3-2-7 Anticorps anti-récepteur PDGF**

Le récepteur dérivé du facteur de croissance (Platelet Derived Growth Factor PDGF) est l'un des premiers facteurs de croissance identifiée. Il et fonctionne comme un fort mitogène dans les cellules mésenchymateuses et les cellules gliales. En outre, le PDGF régule la morphologie cellulaire et la circulation des cellules comme le chimiotactisme. La signalisation par PDGF est impliquée dans l'embryogénèse, la carcinogénèse, l'athérosclérose et la guérison des plaies. Le PDGF est l'un des inducteurs potentiel de la prolifération des fibroblastes au niveau du derme, des poumons et peut aussi promouvoir la chimiotaxie (Heldin CH et al, 1998).

On a démontré par immunohistochimie que les sous-unités du récepteur B du PDGF sont localisées dans les infiltrats inflammatoire péri-vasculaires de la peau des patients souffrant d'une sclérodermie, mais pas au niveau de la peau des sujets sains (Baroni SS et al, 2006).

Récemment une nouvelle classe des auto-anticorps a été découverte chez des patients souffrant d'une sclérodermie. Ces anticorps reconnaissent et activent le récepteur humain PDGF, stimulant ainsi la production d'espèces réactives d'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) par signalisation des protéines Ha-Ras et et du facteur de croissance ERK1/2 et par production du collagène. Il est clair, actuellement que le PDGF joue un rôle fondamental et central au cours d'une fibrose en général et plus particulièrement durant une sclérodermie. Il a été démontré aussi, que les espèces réactives d'oxygène (ROS) sont un élément très important dans la cascade de signalisation intracellulaire nécessaire pour l'union du PDGF à son récepteur. Les fibroblastes des patients sclérodermiques produisent des taux élevé de ROS en comparaison avec les fibroblastes des sujets normaux (Armando Gabrielli et al, 2007).

## **IV-Organisation moléculaire du centromère humain**

Après l'identification initiale des protéines CENPA, CENPB, et CENPC (Earnshaw et Rothfield, 1985), beaucoup d'études ont décrit de nouvelles protéines centromériques, environ 80 chez l'homme. Certaines de ces protéines s'assemblent sur la protéine CENPA et sont appelées "Constitutive Centromere-Associated Network" (CCAN). Ce complexe contient en plus de la protéine CENPC, 15 autres protéines distribuées en différents groupes: CENPH/I/K, CENPL/M/N, CENPO/P/Q/R/U. Une des fonctions principale du CCAN est d'assembler les diverses protéines du kinétochore externe tel que : KNL1, le complexe Mis 12 et NDC80. Puisque beaucoup de ces composants du centromère sont des antigènes de la réponse auto-immune observée dans la sclérodermie, je décrirais ensuite la structure moléculaire et la fonction de cette région chromosomique.

### **IV-1 Structure du centromère**

La répartition exacte du génome répliqué au cours de la division cellulaire est cruciale pour la viabilité cellulaire et le développement de l'organisme. La machinerie de toutes les cellules eucaryotes assure au cours de la mitose une ségrégation équitable de tous les chromosomes homologues, veillant à ce que chaque cellule fille hérite une copie unique et exacte du génome. La ségrégation des chromosomes se produit sur une structure bipolaire en forme de fuseau qui est construit à partir de microtubules.

Pour leur entrée en mitose, les chromosomes répliqués sont compactés dans le noyau afin de faciliter leur ségrégation. Simultanément, les chromosomes construisent une structure spéciale pour se lier aux microtubules (Rogers GC et al, 2005).

La détermination de la structure complète du centromère est un défi parce que la disposition de ce dernier varie d'une espèce à une autre. Il existe chez les vertébrés des séquences répétées d'ADN qui sont localisées dans la région du centromère qui dirige l'assemblage du kinétochore et capable d'unir entre 15 et 20 microtubules. Par contre, les centromères des levures sont constitués de 125 pb couvrant un espace équivalent à un nucléosome et chaque centromère est lié à un seul microtubule. En contraste les chromosomes des nématodes sont holocentriques et le kinétochore est groupé le long du chromosome. Chez les êtres humains, des régions du centromère sont enrichies de

séquences d'ADN répétées en tandem de 171 pb appelées, ADN satellite alpha. Au niveau de cette séquence il y a un motif de 17 pb de l'ADN alphanucléotidique appelé la boîte CENPB qui est le lieu d'union de la protéine CENPB au centromère (Ohzeki J et al, 2002). L'ADN satellite alpha consiste en un tandem répété riche en bases A et T formant des monomères appelés Higher Order Repeats (HOR). Ces monomères partagent entre eux 60 à 80% d'homologie de séquence (Rudd et Willard, 2004).

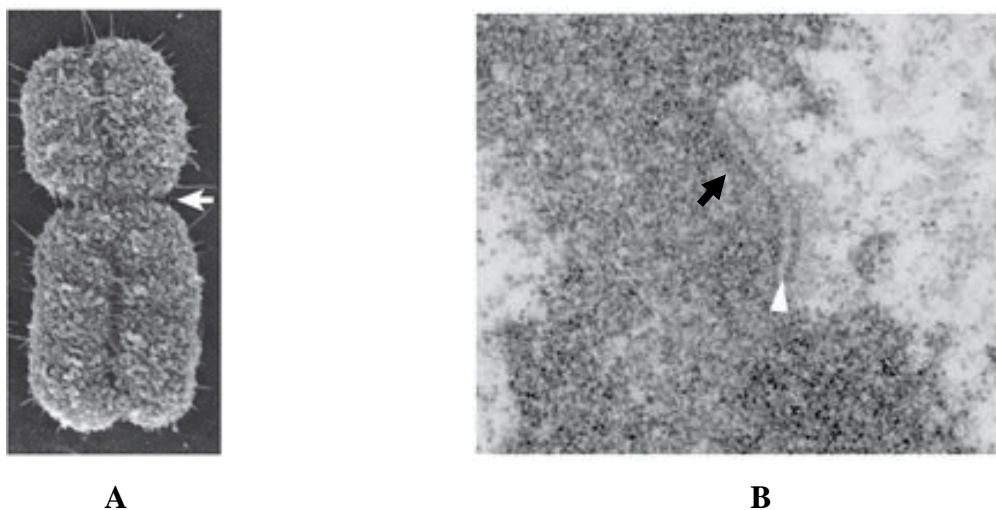
L'ADN satellite alpha et la boîte CENPB sont nécessaires pour la génération des chromosomes artificiels (HACs) dans des cellules humaines transfectées HT1080, ce qui implique une exigence de l'ADN pour ces régions durant la formation du nouveau centromère. Le premier essai effectué pour la construction d'un chromosome artificiel (HACs) date de l'année 1990. Ces chromosomes se construisent avec de l'ADN alphanucléotidique et l'ADN des télomères. Ils sont stabilisés au niveau des cultures cellulaires *in vitro* durant plusieurs cycles mitotiques et présentent la capacité de se transmettre d'un cycle à un autre. Les HACs permettent d'insérer des gènes, de les exprimer et de cloner de grands fragments d'ADN. Ces chromosomes aident dans les études de la thérapie génique et de la fonction des chromosomes (Larin Z et Mejia JE, 2002). Certaines expériences montrent que les nouveaux centromères créés peuvent être maintenus de manière stable durant la division cellulaire en absence d'une interaction entre CENPB et la boîte CENPB ou avec l'ADN satellite alpha (Amor D J et al, 2002).

#### **IV-2 Composition moléculaire du kinétochore**

Le kinétochore est une macrostructure de protéines assemblée en un complexe d'une grande importance qui relie les chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique pour diriger la ségrégation des chromosomes pendant la division cellulaire (Nasmyth K , 2002). Le kinétochore est une structure qui réagit comme un générateur de force qui conduit le mouvement des chromosomes et comme un module de signalisation pour réguler la ségrégation des chromosomes et la progression du cycle cellulaire. Plusieurs Travaux ont déjà identifiés les principales fonctions et activités du kinétochore pour assurer une ségrégation et une séparation correcte des chromosomes : il s'agit notamment de l'assemblage du kinétochore à l'ADN centromérique, l'attachement aux microtubules polaires et la division des chromosomes en deux lots identiques (Santaguida S et Musacchio A, 2009).

Le kinétochore requiert l'action coordonnée d'un nombre très complexe de protéines. La compréhension de ce mécanisme nécessite tout d'abord l'identification et la compréhension de l'organisation de tous les composants du kinétochore. La majorité des protéines du kinétochore ont un rôle structurel plutôt que catalytique, leur séquence primaire ne donne pas toute l'information relative à leur activités et reste beaucoup à découvrir pour déterminer leur contribution à ces fonctions et activités. Des travaux récents ont pu identifier plus de 80 différents composants du kinétochore humain (Cheeseman I et Desai A, 2008). Au niveau de la microscopie électronique, les procédures de fixation chimique et de section mince des chromosomes de vertébrés, ont révélé que le kinétochore contrairement au reste de la chromatine possède une morphologie tri-laminaire, en couches (Figure 4). La microscopie électronique a été la première technique utilisée pour révéler des informations sur la structure du centromère, et montre aussi, la présence d'une couche dense constituée de fibres : la couronne fibreuse qui s'étend au-delà du kinétochore externe. Les chercheurs décrivent actuellement trois parties essentielles du kinétochore : centromère interne, kinétochore interne et kinétochore externe (Julie P.I Welbum et Iam M cheeseman 2008; Fukagawa T et Marinela P, 2011).

- Centromère interne: C'est la zone d'intersection des deux chromatides sœurs, cette région est constituée par la condésine, CENPB et le complexe des protéines passagères tel que Borealin, survivine, INCENP et AuroraB.
- Kinétochore interne: La protéine CENPA contenant les nucléosomes, fournit la base pour la construction et l'assemblage du kinétochore. Le Kinétochore interne est composé du complexe connu comme CCAN qui contient les groupes (CENPC, CENP T/W/S/X, CENP N/L/M, CENP H/I/K, CENPO/P/Q/R/U). Ces protéines sont des protéines constitutives, et toute cette structure est assemblée et recrutée sur la protéine CENPA après sa mise en place (Caroll CW et al, 2009). Une des fonctions critiques du kinétochore est d'assurer le contact physique avec l'ADN chromosomique et de spécifier un site unique pour la liaison avec chaque chromosome. Les mécanismes par lesquels ceci se produit sont en grande partie



**Figure 4. Observation par microscopie électronique des chromatides et du kinétochore.** En **A** la flèche blanche indique le lieu d'intersection entre les chromatides appelé le centromère. En **B** est représentée la structure tri-laminaire du kinétochore. La flèche blanche indique la présence d'une couche externe du kinétochore, la flèche noir indique la couche externe liée à la chromatine centromérique et entre les deux, une zone intermédiaire moins dense (**A** prise de Marcin R. 2009; **B** prise de Valdivia M.M, 1994).

indépendants et la compréhension des bases moléculaires de l'activité du kinétochore serait accélérée par l'information et les données structurales de l'interface Kinétochore –ADN. De ce fait, plusieurs analyses structurales ont fourni des informations significatives sur la nature de ce contact avec l'ADN et sur les mécanismes par lesquels il est contrôlé.

- Kinétochore externe: Constitué de trois complexes : le complexe Knl1, le complexe Mis 12 (Mis12, Dsn1, Nsl1, et Nnf1) et le complexe Ndc80 (Ndc80, Nuf2, Spc24, et Spc25). Au-delà du kinétochore externe est située la couronne fibreuse contenant CENP-E et CENP-F.

#### **IV-2-1 KMN**

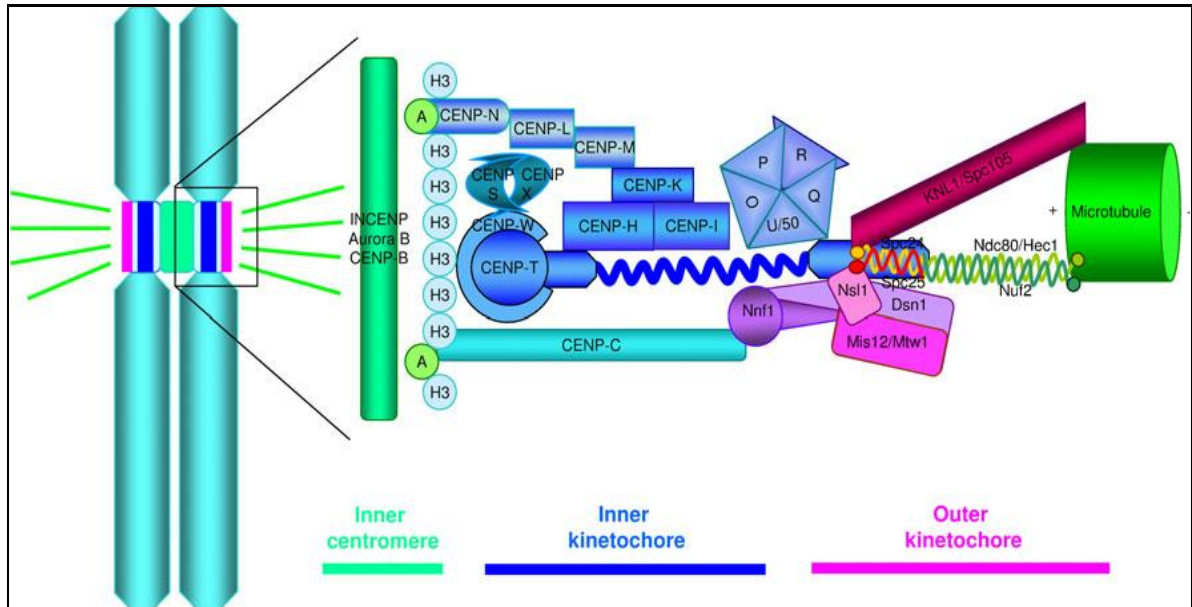
Le nom du complexe KMN dérive des trois complexes protéiques qui le constituent. Il contient les unités KNL1, le complexe Mis 12 et le complexe Ndc80 (Kwon et al, 2007). Il est un composant clef pour la formation d'un centromère fonctionnel. C'est un connecteur entre la chromatine centromérique et les microtubules. La relation entre KMN et CCAN est encore peu claire étant donné sa complexité structurale. La majorité des études indiquent que les protéines CENPs du complexe CCAN sont essentielles pour la localisation du complexe KMN. Récemment, le complexe KMN a été décrit comme un composant crucial pour la fixation et l'union des microtubules aux kinétochores. L'unité KNL1 contient un domaine d'union aux microtubules, bien que la région responsable soit encore objet de plusieurs études (Santaguida S et Musacchio A, 2009). En 2008 Burke et al, ont décrit que les protéines du complexe SAC (Spindle assembly checkpoint) impliquées dans le mécanisme responsable de la correction et du contrôle de l'union aux microtubules sont construites et assemblées sur le complexe KMN (Burke.DJ et al, 2008). L'inactivation par des méthodes expérimentales d'ARN interférence (ARNi) d'un des composants du KMN génère un kinétochore incapable de se lier aux microtubules (Cheesmen et al, 2004 ; 2006 ; Fukagawa T et Marinela P, 2011).

#### **IV-2-2 NDC 80**

Des études de cristallographie et de microscopie électronique ont révélé le rôle important du complexe Ndc80 constituant le kinétochore externe et qui interagit directement avec les microtubules. Le complexe protéique Ndc80 (appelé aussi Hec1) a un poids moléculaire de 180kDa. C'est un composant conservé des levures aux humains. Il contient quatre protéines Ndc80, Nuf2, Spc224 et spc25 et son activation cause une ségrégation défectueuse des chromosomes. Les protéines Ndc80-Nuf2 et SPC 24-25 forment des hétérodimères, le domaine globulaire du Spc 24-25 est orienté vers le kinétochore interne et s'attache au complexe Mis 12 et Knl1, tandis que le domaine globulaire du Ndc80/Nuf2 est positionné pour interagir réciproquement avec les microtubules du fuseau. Actuellement, il est évident que le complexe Ndc80 joue un rôle crucial durant les étapes de bi-orientation et de ségrégation chromosomique (Tomoyuki U Tanaka et Arshad Desai 2007; Fukagawa T et Marinela P, 2011).

#### **IV-2-3 Les protéines passagères**

Le centromère contient des protéines constitutives associées de façon permanente durant tout le cycle cellulaire comme les protéines CENPA, CENPB, CENPC qui se lient à l'ADN satellite alpha type I, ainsi que d'autres protéines qui sont passagères qui se lient transitoirement au centromère. Actuellement, la famille des protéines passagères comprend cinq protéines : INCENP, Survivine, Aurora-B, TD-60 et Boréaline (Vagnarelli P et Earnshaw WC, 2004). Ces protéines possèdent toutes le même profil de localisation cellulaire au cours de la mitose. Elles s'accumulent au niveau des centromères en prophase et métaphase pour migrer ensuite vers le sillon de division en début d'anaphase et sur le corps résiduel à la fin de cytokinèse. Une série de données suggère l'existence d'un complexe de protéines passagères. Ces complexes jouent plusieurs rôles fondamentaux chez tous les eucaryotes durant tout le cycle cellulaire. Ils sont insérés dans le processus de condensation des chromosomes mitotiques et contribuent à leur alignement et leur ségrégation tout au long de la mitose. Il est clairement établi depuis les premières études portant sur les protéines passagères que celles-ci jouent un rôle très important dans le bon déroulement de la cytokinèse.



**Figure 5.** Modèle d'organisation moléculaire du kinétochore dans les cellules des vertébrés (Pris de Fukagawa T et Marinela P, 2011).



L'inhibition ou l'absence des protéines passagères génère chez la plupart des organismes des défauts dramatiques durant la cytokinèse (Gassmann R et al, 2005).

Le premier membre de la famille des protéines passagères, qui a été décrit, est la protéine INCENP (Inner Centromere Protein) (Cooke CA et al, 1987). Cette protéine d'un poids moléculaire de 120 kDa se lie fortement aux chromosomes et se délocalise sur le cytosquelette lors de la transition métaphase/anaphase. Son rôle présumé est le recrutement et le transfert de protéines impliquées dans la mise en place du sillon de division, à travers les chromosomes mitotiques (Adams R.R et al, 2001). La protéine INCENP présente différents domaines, chacun impliqué dans une fonction bien définie (Ainsztein A M et al, 1998). Le domaine amine-terminale (environ 400 acides aminés) confère à la protéine INCENP sa capacité pour se lier aux chromosomes au niveau de l'hétérochromatine centromérique (Mackay A et al, 1993).

Un autre composant du complexe des protéines passagères est la protéine Survivine. Elle a été identifiée initialement comme une petite protéine de 17 kDa de la famille IAP (Inhibitors Apoptosis Protein) (Speliotes EK et al, 2000). La protéine survivine est impliquée dans la régulation des processus de l'apoptose et dans le contrôle du cycle cellulaire. La structure cristalline de la protéine Survivine humaine a été déterminée récemment à une résolution de 2.4 Å. Elle cristallise sous forme dimérique et présente une longue extension carboxyle-terminale structurée sous forme d'hélice.

Un autre membre de la famille des protéines passagères est la protéine Boréoline de 31 kDa très conservée chez les vertébrés. Des défauts d'attachements des microtubules aux kinétochores et des cytokinèses anormales sont observés dans des cellules quand la Boréoline est éliminée par ARN interférence (Sampath S C et al, 2004 ; Gassmann R et al, 2005).

La seule protéine passagère à activité catalytique est la kinase Aurora-B (Adams R et al, 2001). Aurora-B est responsable de la phosphorylation massive de l'histone H3 sur le résidu Ser10. Elle phosphoryle également les résidus Ser28 de H3 et Ser7 de la CENP-A. Ces modifications post-traductionnelles des histones sont étroitement associées à la condensation des chromosomes au cours de la division cellulaire, sans pour autant qu'une signification fonctionnelle soit clairement attribuée à cette modification post-traductionnelle.

Plusieurs études ont montré l'implication d'Aurora B comme composant essentiel du mécanisme de correction des erreurs d'attachements des microtubules aux kinétochores. La protéine Aurora B phosphoryle la partie N terminal du complexe Ndc80, en neutralisant ses charges positives et en réduisant son affinité pour les microtubules. La kinase Aurora-B régule l'activité de la kinésine MCAK qui dépolymérise les microtubules nécessaires à la séparation des chromatides sœurs (Andrews P.D et al, 2004; Lan W et al, 2004; Gorbsky G.J, 2004).

#### **IV- 3 Fonction du centromère**

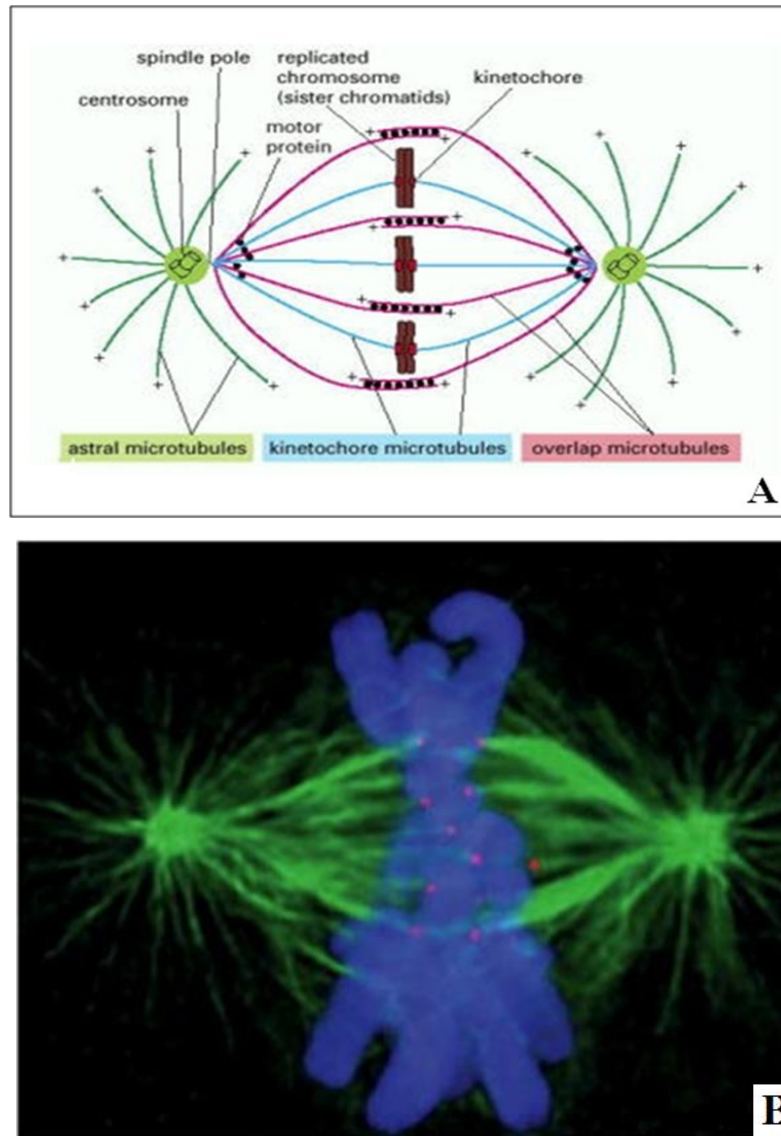
De multiples voies de signalisation régulent la fonction du kinétochore. Tout d'abord, les signaux externes doivent coordonner l'assemblage du kinétochore avec la progression du cycle cellulaire. Deuxièmement, le kinétochore doit être capable de s'attacher aux microtubules et doit corriger toute erreur pour assurer la ségrégation correcte des chromosomes. Finalement, le kinétochore doit également transmettre les signaux pour arrêter la progression du cycle cellulaire, et prévoir le début de l'anaphase, dans le cas d'un attachement anormale d'un seul chromosome.

Une fois les cellules sont en mitose et comme préparation pour le début de l'anaphase, les kinétochores doivent capturer les microtubules et relier ainsi chaque chromatide sœur de tous les chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique. La formation du fuseau mitotique se fait en plusieurs étapes. Comme, les chromosomes présentent deux kinétochores associés dos à dos, (un au niveau de chaque chromatide sœur), quand l'un d'eux est associé aux microtubules généré par l'un des deux pôles cellulaires, le kinétochore de la chromatide sœur reste exposer vers l'autre pôle cellulaire. Ainsi dans la plupart des cas le deuxième kinétochore s'associe aux microtubules du pôle opposé de sorte que les chromosomes soient « bi- orientés ». C'est une configuration fondamentale (aussi appelée amphitélique) qui assure que la ségrégation aura lieu d'une manière correcte lors de la division cellulaire (Lampson MA et al, 2004).

Les kinétochores sont impliqués dans au moins deux mécanismes de rétroaction. Le premier mécanisme permet la discrimination entre un attachement correct et erroné des microtubules aux kinétochores et corriger les erreurs. Si les kinétochores sont attachés incorrectement (par exemple, si les microtubules se lient au même pôle du

fuseau), cette connexion est corrigée avant le déclenchement de l'anaphase. Le deuxième mécanisme de rétroaction fonctionne en synchronisant les processus d'attachement des microtubules avec la progression du cycle cellulaire, plus précisément la perte de cohésion entre chromatides sœurs et sortie de la mitose par dégradation de la cycline B, deux événements contrôlés par la machinerie cellulaire. Ce mécanisme est appelé le point de contrôle (checkpoint) du fuseau mitotique (spindle checkpoint chromosom) (Cimini et al, 2003).

La capacité de discriminer entre une union correcte et incorrecte des microtubules est cruciale pour la stabilité des chromosomes durant la division cellulaire. Afin de prévoir les ségrégations aberrantes des chromosomes, la transition métaphase/anaphase est contrôlée par le point de contrôle du fuseau mitotique. Cette transition ne peut être franchie que lorsqu'une tension suffisante des microtubules s'exerce des deux côtes du fuseau mitotique et d'une façon égale pour tous les chromosomes (figure 6) (Musacchio A et Hardwick K G. 2002). Cette tension est la conséquence d'une bi-orientation du chromosome, sous l'action de deux forces opposées d'intensité égale et exercées par le fuseau mitotique en direction de chaque pôle de la cellule (attachement amphitélique), alors que les chromatides sœurs d'un même chromosome sont encore liées l'une à l'autre par les cohésines. La transition métaphase/anaphase conduit à la dégradation des cohésines centromériques par le protéasome et à l'individualisation des chromatides sœurs. L'absence de tension quand une seule chromatide d'un chromosome est attachée à un seul pôle (attachement monotélique) ou quand les deux chromatides sont attachées au même pôle (attachement syntélique), active le point de contrôle du fuseau mitotique qui bloque le cycle cellulaire en métaphase (Cleveland D W et al, 2003).



**Figure 6. Union des microtubules au centromère dans des cellules humaines.** En **A**, nous présentons un schéma simplifié des différents types de microtubules associés à chaque kinétochore. Les pôles positifs de chaque microtubule sont liés au centrosome tandis que les extrémités négatives sont liées à chacun des deux pôles du fuseau mitotique. En **B** on voit par microscopie à fluorescence, les chromosomes durant la métaphase, liés au fuseau mitotique. Les kinétochores sont indiqués en rouge, les microtubules en vert et les chromosomes en bleue (prise de Desai A, *Curr. Biol.* 10:R508, 2000. © Elsevier).

## V- Objectifs du travail

La sclérose systémique (ScS) connue sous le nom de la sclérodermie est une maladie auto-immune rare, d'étiologie et de physiopathologie encore mal comprises. Cette maladie est une affection généralisée du tissu conjonctif, essentiellement de la peau, des organes internes, des artérioles et des microvaisseaux. Elle est caractérisée par le développement de phénomènes de fibrose et d'oblitération vasculaire.

La sclérodermie est caractérisée par la production des autoanticorps spécifiques à la ScS comme les AAT, les anti-RNP et les anticentromères. Ces derniers constituent des outils importants de diagnostic et de pronostic de cette maladie. L'autoanticorps anti-CENPB dirigé contre la protéine centromérique B est l'un de ces principaux autoanticorps. Il est fortement associé à l'hypertension artérielle pulmonaire, l'une des causes majeures de décès dû à la ScS.

Malheureusement, la ScS reste encore une maladie incurable et bien que plusieurs médicaments permettent de stabiliser la maladie, voire de faire régresser certains symptômes, il n'existe, à ce jour, aucun traitement capable de la guérir complètement. Une meilleure compréhension de sa pathologie et des mécanismes impliqués dans son développement serait donc un atout primordial afin d'élaborer de nouvelles thérapies.

Notre travail de thèse s'inscrit dans ce contexte. Il a pour objectif majeur d'identifier, dans la sclérodermie, de nouveaux autoanticorps centromériques qui peuvent être de nouveaux marqueurs pour le diagnostic de la maladie. Notre travail comporte deux volets principaux :

- Etudier l'hétérogénéité de la réponse auto-immune des patients souffrant d'une sclérodermie contre d'autres protéines centromériques comme la protéine CENPI, CENPH, CENPK, CENPM et CENPP.
- Développer un array ou une puce à protéines avec certaines caractéristiques pour le diagnostic d'une sclérodermie.

## Matériel et Méthodes

## **I-Antécédents expérimentaux**

Au sein du laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire de la Faculté des Sciences de Cadix, le groupe de recherche du professeur Manuel Valdivia, durant plus de 15 ans, a effectué des études de recherche en utilisant des protéines centromériques (CENPs), et cela a permis la disponibilité de divers cADN et anticorps contre différentes protéines CENPs.

Sur la base de ces études préalables nous disposons actuellement de plusieurs plasmides pour l'expression des protéines centromériques. En outre nous avons obtenu d'autres plasmides de différents laboratoires dont les origines sont résumés dans le tableau 7.

A partir de ces cDNAs on a exprimé les différents antigènes centromériques et on a réalisé une série d'immunisations dans des lapins qui ont permis d'obtenir des anticorps, anti Nt CENPB, anti Nt CENPI, anti Nt CENPC et anti CENPH, qui ont été utilisés dans les différentes phases de ce travail de thèse.

Les différents résultats obtenus durant cette étape antérieure de production des anticorps, m'ont servi comme matériel additionnel pour réaliser une étude vaste et hétérogène des protéines centromériques impliquées dans la réponse auto-immune des patients avec sclérodémie.

## **II- Techniques utilisées liées aux acides nucléiques**

### **II-1 Amplification enzymatique des fragments d'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

La PCR est une méthode permettant la multiplication d'une séquence d'ADN à partir d'une infime quantité d'ADN génomique ou plasmidique appelé séquence cible. Aujourd'hui, cette méthode révolutionnaire basée sur l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistante permet l'obtention d'une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN. Cette technique a révolutionné, entre bien d'autres domaines d'application, le diagnostic moléculaire des maladies génétiques.

**Tableau 7.** Résumé des différents fragments d'ADN et de protéines centromériques exprimées durant notre travail.

<b>cDNAs centromériques</b>	<b>Les acides aminés exprimés</b>	<b>Nombre de nucléotides</b>	<b>Laboratoire d'origine</b>
Nt CENP B	350 a.a (aa 1 à 350)	1050 nt	H.Willard, Genome Biology Group, Duke Institute for Genome Sciences & Policy, Duke University
Ct CENP B	100 a.a	300 nt	
Full length CENPC	1-199 a.a	597 nt	K.Sullivan, Department of Cell Biology, Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA.
Full length CENP H	247 a.a	741 nt	Kazuo Todokoro, RIKEN Institute Koyabai, Tsukuba, Ibaraki, Japan.
Nt CENPI	249 a.a (aa 1 à 249)	747nt	T Yen. Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman, USA
Int CENP I	300 a.a (aa 250 à 550)	900 nt	
Ct CENP I	206 a.a (aa 551 à 707)	618 nt	
Full lenght CENP M	180 a.a	542 nt	Tatsuo Fukagawa, Department of Molecular Genetics, National Institute of Genetics and the Graduate University for Advanced Studies, Mishima, Shizuoka. Japan.
Full lenght CENP P	288 a.a	864 nt	
Full lenght CENP K	260 a.a	810 nt	



## **II-1-1 Principe**

La PCR (Polymerase Chain Reaction), est une technique d'amplification enzymatique qui utilise une enzyme ADN polymérase, capable de répliquer rapidement, *in vitro*, un fragment d'ADN. En présence des amorces adéquates permet d'obtenir un grand nombre de copies identiques à ce fragment.

Chaque cycle de PCR s'effectue en trois étapes qui sont indispensables pour toute synthèse d'ADN et qui sont répétées plusieurs fois : la dénaturation, l'hybridation des amorces et l'élongation par la polymérase. Ces étapes sont effectuées à différentes températures de façon automatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les tubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures dans la majorité des cas.

## **II-1-2 Les amorces ou primers**

Les amorces sont des séquences d'ADN complémentaires de fragments d'ADN à amplifier. Pour la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial pour la spécificité de la réaction d'amplification. Les amorces vont avoir un double rôle : en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d'ADN à amplifier et ensuite ajouter des nucléotides par l'ADN polymérase en employant l'extrémité 3'OH libre de l'amorce.

Les amorces s'hybrident avec les extrémités de la séquence qui va être amplifiée, et pour cela il faut donc connaître ces séquences (Pour faciliter le choix correct des séquences des deux amorces, il existe des logiciels d'analyse de séquences qui vont permettre ce choix). Les amorces utilisées dans ce travail, pour chaque séquence à amplifier, sont résumées dans le tableau 8.

**Tableau 8.** Les amorces utilisées dans ce travail.

<b>Séquences</b>	<b>Amorces</b>
<b>CENPM</b>	5' GCT GGA TCC CAT GTC GGT GTT 3' 5' ATG CAG CTC TCA CAG GTC CTC CAG 3'
<b>CENPP</b>	5' CCC GAG CTC GAG CTG 3' 5' GGG GTC GAC CCT CCT 3'
<b>CENPK</b>	5' ATA GGA TCC CAT GAA TCA GGA GGA 3' 5' AAC GAG CTC TTA CTG ATG GAA 3'
<b>Int CENPI</b>	5' GGG GGT CGA CTT ACA AGC GCA TTG C 3' 5'GGG GAG ATC TCT ATG ATT TCA GTA TCT 3'
<b>Ct CENPI</b>	5' CCC GGA TCC ATT GGA GAG CAA 3' 5' GGG GTC GAC TTA ATA TTG ATT GTT 3'

### **II-1-3 Températures**

Les trois étapes qui constituent un cycle de PCR sont réalisées à différentes températures qui servent à contrôler :

a) L'étape de dénaturation qui est réalisée à 95° C pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.

b) L'étape d'hybridation se fait à une température qui sera définie selon la composition des amorces (cette température varie entre 50 et 60 C°) La température d'hybridation dépend de la séquence des amorces.

c) L'étape de l'élongation ou d'extension est réalisée à 72° C. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces déjà hybridées. Les quatre nucléotides dNTPs (DésoxyNucléotidesTri-Phosphate) sont les éléments de base utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

Normalement une PCR comprend un total de 25 à 30 cycles. Lors de chaque cycle la quantité d'ADN amplifiée est doublée et par conséquent elle sera augmentée de façon exponentielle.

### **II-1-4 Tampon**

Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour l'activité de la Taq polymérase (TrisHCl à pH 8,5).

### **II-1-5 MgCl<sub>2</sub>**

Les cations sont essentielles pour l'activation de la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg<sup>2+</sup> et des cations monovalents (K<sup>+</sup>) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN.

### **II-1-6 ADN polymérase: la Taq polymérase**

L'ADN polymérase est un complexe enzymatique qui intervient dans la réplication de l'ADN. Les propriétés des enzymes thermorésistantes actuellement utilisées et constamment optimisées, présentent de hauts niveaux d'efficacité.

La réaction PCR des fragments d'ADN à sous-cloner se fait dans un volume final de 50 µl et le mélange réactionnel standard est :

Réactifs	Volume/quantité
- ADN 50ng/µL	1 µL
- Tampon 10 X	5 µL
- Amorces 25 pMol/µL	2 µL de chacune
- dNTP 10 mM chaque nucléotide	3 µL
- MgCl <sub>2</sub> 50 mM	5 µL
- H <sub>2</sub> O distillé	Compléter à 50 µL.

Le programme électrothermique (thermocycleur) utilisé pour la PCR est le suivant :

Température/ temps	Nombre de cycles
1) Dénaturation à 95° C durant 30 secondes. 2) Hybridation à 50° C durant 30 secondes. 3) Elongation à 72° C durant 2 minutes.	30 cycles
Elongation finale à 72° C durant 10 minutes.	

## II-2 Purification de l'ADN plasmidique et des fragments d'ADN qui codent pour les protéines centromériques

Les fragments d'ADN qui codent pour les protéines centromériques Ct CENPB, CENPK, CENPM, CENPP, Int CENPI et Ct CENPI et les ADN plasmidiques utilisés pour l'expression des protéines centromériques sont purifiés par le kit commercial de "QIAGEN". L'analyse de l'ADN est effectuée sur gel d'agarose à bas point de fusion (Low-melting agarose). Une fois les bandes d'ADN sont visualisées à l'aide d'un transilluminateur à lumière Ultraviolette (Vilbert Lourmat), la bande d'intérêt est

coupée et déplacée vers un tube eppendorf de 1,5ml contenant 1 ml EDTA 50 mM et un inhibiteur de protéases 1X, pour extraire le fragment d'ADN.

### **II-2-1 Analyse quantitative**

Afin d'évaluer la concentration et la pureté des échantillons d'ADN purifiés on mesure la densité optique de chaque échantillon à 260 nm et 280 nm, ainsi que le rapport 260/280.

### **II-2-2 Analyse qualitative**

Les fragments d'ADN sont analysés dans des gels d'agarose préparés à 1% en présence de TBE 0,5% et 0,5µg/ml de bromure d'éthidium, et visualisés sur un transilluminateur (Vilbert Lourmat).

## **II-3 Clonage des cDNAs codant pour les protéines centromériques CENPM, CENPH, CENPK et CENPI**

### **II-3-1 Préparation des fragments d'ADN codant pour les protéines CENPs pour le sous clonage dans le Topo10**

Le sous clonage est un groupe de techniques permettant l'insertion d'un ADN (produit amplifié par exemple) dans un vecteur. Chaque ADNc est amplifié par PCR et les deux extrémités sont digérées par deux enzymes de restriction. Cette digestion permet de générer des extrémités compatibles et capables de s'apparier et de se lier à un vecteur lors d'une étape postérieure. La digestion peut être réalisée simultanément dans un tampon compatible pour les deux enzymes ou d'une manière successive. Dans tous les cas, le volume des deux enzymes ne doit pas dépasser 10% du volume totale.

Le protocole est le suivant :

Réactifs	Volume/quantité
- ADN	0,1 – 1 µg
- Tampon	2 µl
- Enzyme de restriction	1 à 5 µl de chacune
- H <sub>2</sub> O distillée	Compléter à 20 µl

Le mélange réactionnel est incubé à 37°C durant toute la nuit. Après la digestion on procède de nouveau à purifier le fragment d'intérêt par la méthode déjà décrite en utilisant le kit commercial de QIAGEN. Pour chaque séquence on utilise deux enzymes de restriction différentes selon le tableau 9.

Les fragments ainsi préparés par PCR et clonés dans le vecteur Topo 10 sont clonés dans le vecteur d'expression : le plasmide pBiex. Nous avons utilisé principalement deux vecteurs, Topo 10 pour cloner les produits PCR et le plasmide pBiex pour exprimer les fragments d'ADN codant pour les différentes protéines centromériques.

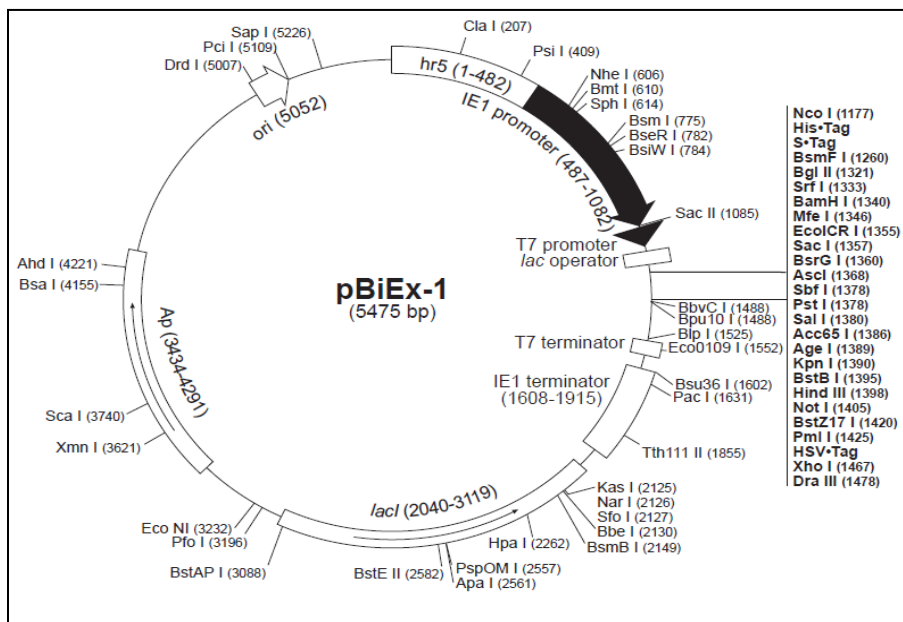
### II-3-2 Ligation de l'ADN dans le vecteur d'expression pBiex

Une fois les différents produits sont clonés dans le vecteur Topo10, les séquences insérées sont extraites par double digestion (tableau 9), et sous clonées postérieurement dans le vecteur d'expression pBiex. Chaque vecteur de clonage doit avoir des extrémités compatibles avec l'ADN à sous cloner. Pour cela les vecteurs sont digérés avec les mêmes enzymes de restriction que les fragments d'ADN.

Le vecteur de clonage est une petite molécule d'ADN circulaire capable de se répliquer toute seule. Le système des vecteurs pBiEx (Novagen) (figure 7) sont des vecteurs d'expression conçus pour le clonage et l'expression des protéines aussi bien dans des cellules bactérienne *E.coli* que dans des cellules dérivées de l'insecte *Spodoptera* transfectées transitoirement. Dans *Escherichia coli*, la transcription du gène

**Tableau 9.** Enzymes de restriction utilisées pour chaque ADNc.

Protéines	Enzymes utilisées	
CENPM	Bam HI Sens Sac I Anti-sens	5' GCT <b>GGA TCC</b> CAT GTC GGT GTT GAGG 3' 5' ATG <b>GAG CTC</b> TCA CAG GTC CTC CAG 3'
CENPK	Bam HI Sens Sac I Anti-sens	5' ATA <b>GGA TCC</b> CAT GAA TCA GGA GGAT 3' 5' AAG <b>GAG CTC</b> TTA CTG ATG GAA AGC 3'
CENPP	Sac I Sens Sal I Anti-sens	5' CCC <b>GAG CTC</b> ATG GAC GCA GAG CTG 3' 5' GGG <b>GTC GAC</b> CTA GTT GTT CTC CTC 3'
Int CENP	Sal I Sens BglII Anti-sens	5' GGG <b>GGT CGA CTT</b> ACA AGC GCA TTG 3' 5' GGG <b>GAG ATC</b> TCT ATG ATT TCA GTA TCT 3'
Ct CENPI	BamHI Sens Sal I Anti-sens	5' CCC <b>GGA TCC</b> ATT GGA GAG CAA 3' 5' GGG <b>GTC GAC</b> TTA ATA TTG ATT GTT 3'



**Figure 7.** Carte du vecteur pBiex utilisé pour l'expression des protéines centromériques CENPK, CENPM, Int CENPI et Ct CENPI.

cloné est régulée et bien contrôlée par le promoteur T7lac, et une séquence d'union à l'accepteur de ribosome (RBS) qui dirige le déclenchement de la traduction.

La séquence d'ADN est insérée dans le vecteur grâce à la ligase. La ligation est réalisée une fois le plasmide et le fragment d'ADN à insérer se trouvent avec des extrémités compatibles. L'enzyme, la T4 ADN ligase catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'OH et 5'P des molécules d'ADN. Pour cela nous utilisons une quantité entre 50 et 100 ng du vecteur et une quantité molaire d'ADN à insérer 1 à 5 fois plus que celle du plasmide. La réaction se produit dans 10 à 15 µl du tampon 1X de la ligase en présence d'une unité de la T4 ADN ligase. La réaction se fait à 16°C durant toute la nuit. Ce vecteur est utilisé pour exprimer les protéines centromériques CENPK, CENPM, IntCENPI et CtCENPI.

Pour la protéine CENPH nous avons utilisé le vecteur pGEX-2T, et pour la protéine CENPB nous avons utilisé le vecteur pET (Novagen). Il s'agit d'un système procaryote d'expression directe, qui utilise l'ARN polymérase du bactériophage T7.

#### **II-4 Séquençage d'ADN**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Il a été inventé dans la deuxième moitié des années soixante-dix. Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert, aux Etats Unis, et l'autre par l'équipe de Frederick Sanger, en Grande-Bretagne.

Actuellement, la plupart des réactions de séquençage d'ADN sont réalisées par la méthode de Sanger, que nous avons aussi utilisé lors de nos expériences pour séquencer les fragments d'ADN. La méthode de Sanger consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce a été initialement réalisée par le fragment de Klenow, une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléase, et de nos jours par des ADN polymérases thermostables, utilisées aussi pour la polymérisation dans les réactions de PCR. Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés ainsi qu'une faible concentration de l'une des quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Ces didésoxynucléotides, agissent comme des « poisons » terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le



nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison se produit spécifiquement au niveau des nucléotides correspondant aux ddNTP incorporés dans la réaction. Pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN, on répète cette réaction quatre fois en parallèle, avec les quatre différents ddNTP. Par exemple, dans la réaction où on a ajouté du ddGTP, la synthèse s'arrête au niveau des G. Le mélange réactionnel contient dGTP et peu de ddGTP, la terminaison se fait donc de manière statistique suivant que l'ADN polymérase utilise l'un ou l'autre de ces nucléotides. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent tous au niveau d'un des G dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés ce qui permet ainsi de repérer la position des G dans la séquence.

Le processus de séquençage est de plus en plus automatisé. Le principe reste le même mais le marquage et le mode de détection sont différents. Les ddNTPs qui sont marqués avec un fluorochrome émettent dans une longueur d'onde différente de celle des dNTPs. Il est donc possible de repérer individuellement les quatre types de marquages dans un mélange, chacun était marqué d'une couleur différente. Le mélange d'ADN matrice, d'amorce, des dNTPs, de la polymérase et des quatre ddNTPs marqués, est soumis à une électrophorèse capillaire. Au fur et à mesure de la migration quatre capteurs (un pour chaque longueur d'onde différente) enregistrent la lumière émise par les molécules terminées par un ddNTP. Ces quatre graphiques sont superposés et un logiciel traduit ce pictogramme en séquence de nucléotides. Dans notre travail nous avons utilisé la technique de séquençage automatique après la réaction PCR, ce qui nous permet de vérifier la séquence d'ADN à sous cloner. Les réactions de séquençage ont été réalisées avec le kit BigDyeR Terminator V 3.1 (Applied Biosystems).

Dans des tubes à PCR on prépare le mélange réactionnel suivant :

<b>Réactifs</b>	<b>Concentration</b>	<b>Volume</b>
Ready Reaction Premix	2.5 X	4 µL
BigDye Sequencing Buffer	5X	2 µL
Amorces	3.2 pmol	-
ADN matrice	Produit de PCR *	-
Eau	-	Compléter à 20 µL

* Produit de PCR	Quantité
100 – 200 pb	1 – 3 ng
200 – 500 pb	3 – 10 ng
500 – 1000 pb	5 – 20 ng
1000 – 2000 pb	10 – 40 ng
> 2000 pb	20 – 50 ng

Ce mélange réactionnel de 20 µl est soumis à une amplification PCR, selon le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 96°C durant 10 secondes
- Hybridation : 50° durant 5 secondes
- Elongation : 60° durant 4 minutes

Pour éviter les problèmes de résultats non spécifiques et de contaminants durant le processus de séquençage, une étape de purification postérieure à la réaction PCR et avant de commencer le séquençage, est réalisée grâce aux colonnes de purification. Après hydratation de la colonne avec 0,8ml d'eau désionisée, la colonne est vortexée et laissée à température ambiante durant 2 heures ou durant toute la nuit à 4° C. La purification est réalisée selon le protocole du kit BigDyer.

### **III- Expression et purification des protéines centromériques**

#### **III-1 Transformation bactérienne avec le plasmide et expression des protéines centromériques**

Lors de nos expériences nous avons utilisé les souches *E.coli* commerciales BL21 compétentes. Les souches d'expression BL21 (DE3) (Novagen) ont été utilisées principalement pour la surexpression des protéines en utilisant le système d'expression du promoteur T7 qui leurs permet de synthétiser la protéine d'intérêt de manière contrôlée. Le terme DE3 indique que la souche porte une copie du gène de l'ARN polymérase T7 au sein de son chromosome sous le contrôle du promoteur *LacUV5*. Dans ce système d'expression la polymérase se fixe sur le promoteur T7 situé sur

l'extrémité 5' du gène d'intérêt présent dans les vecteurs d'expression. L'addition à un moment donné d'une quantité donnée d'IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) conduit à la synthèse massive de l'ARN polymérase qui va alors induire l'expression de la protéine d'intérêt sous contrôle du promoteur Lac $UV5$ .

Les plasmides d'intérêt ont été employés pour transformer les souches BL21 DE3 (Invitrogen) compétentes par un choc thermique à 42°C durant 30 secondes. Le produit de transformation est enrichi avec 250 $\mu$ l du milieu SOC et la croissance est maintenue sous agitation durant une heure. Ensuite, la culture bactérienne est étalée sur des boîtes LB/agar contenant 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline, qui sont incubées toute la nuit à 37°C.

Une fois transformées dans les souches BL21 DE, on a effectué à nouveau des essais d'expression des ADN, insérés dans le vecteur pBiex qui codent pour les différentes protéines d'intérêt CENPs. L'induction des *E.coli* se fait dans un milieu LB sélectionné par ampicilline. La température et le temps d'induction est définie pour chaque protéine à produire. Nous avons réalisé des essais d'expression à petite échelle avant d'entamer l'expression massive des protéines CENPs.

### **III-1-1 Expression à petit échelle**

On commence avec une culture de 5 à 10 colonies bactériennes transformées dans 3ml du milieu LB qui contient les antibiotiques appropriés et incubé à 37°C durant toute la nuit. Le jour suivant chacun des cultures est inoculé dans 10 ml du milieu LB avec ampicilline. Une fois la culture bactérienne, mesurée à 260nm, atteint une densité optique entre 0,6 et 1 unité, l'expression est induite par addition d'IPTG (Isoprpyl-beta-thio galactopyranoside 0,5 ou 1 mM). Celui-ci est un inducteur artificiel de l'opéron Lac qui permet l'expression maximale des gènes clonés. La culture est incubée avec agitation à 30° C ou 37° C durant 4h ou durant toute la nuit selon les protéines CENPs à exprimer. Les conditions optimales d'expression des différentes protéines CENPs sont résumées dans le tableau 10. Pour chaque expression et une fois le temps d'induction d'expression s'écoule, la culture est centrifugée à 3000 rpm (Eppendorf, modèle 5415 R), durant 10 minutes, le milieu de culture est éliminée et le culot est re-suspendu en PBS (10 mL) à 4°C en présence d'un inhibiteur de protéases. Les différents échantillons sont alors analysés dans des gels SDS-PAGE et les protéines sont colorées avec le bleu

de coomassie pour déterminer dans quelles des cultures induites s'est produite une surexpression de la protéine d'intérêt. Une fois les cultures sélectionnées, on prépare à partir de l'original une culture en glycérol en mettant 850 µl de cette culture dans 150 µl de glycérol stérile et on la conserve à -80°C jusqu'à une prochaine utilisation.

### **III-1-2 Expression à grand échelle**

Une fois les conditions optimales d'expression de chaque clone sont mises au point, on procède à son expression à grand échelle. Pour cette raison on met en croissance une colonie bactérienne d'intérêt dans 10 ml de milieu de culture LB avec ampicilline. Le jour suivant, la culture est inoculée dans 200 ml de LB avec ampicilline, et une fois la culture atteint une densité optique entre 0,6 et 1 unité, l'expression est induite par l'addition d'IPTG, et maintenue le temps nécessaire pour l'expression selon le tableau 10.

### **III-2 Extraction et purification des protéines recombinantes**

Une fois les protéines CENPs exprimées on procède à l'élimination du reste des protéines bactériennes. Le processus de lyse cellulaire est réalisé en utilisant des détergents et le PBS 1X froid. Les différentes étapes de la purification consistent à détruire la paroi microbienne, l'élimination des déchets cellulaires (membranes, organites) d'*E.coli*, l'élimination du matériel génétique et de l'ARN, l'élimination de certaines protéines bactériennes en fonction de leurs caractéristiques chimiques (taille, charge électrique, affinité), et isolement de la protéine d'intérêt exprimée et stockée dans les corps d'inclusion.

#### **III-2-1 Extraction des protéines par sonication et solubilisation**

Après le processus d'expression, les bactéries induites sont centrifugées à 3000 rpm (Thermo Scientific, modèle Legend XTR) durant 10 minutes à 4° C et le milieu est éliminé pour obtenir un culot de cellules. Le culot de bactéries induites, est re-suspendu dans un tampon de lyse et soumis à une série de sonication de 5 cycles de 30 s à 4° C par un ultra-sonicateur. Après éclatement des cellules une centrifugation à 10 000g pendant 10min à 4°C permet de séparer le culot du surnageant. Le culot contient en plus

**Tableau 10.** Résumé des conditions optimales d'expression des différentes protéines centromériques.

<b>Protéine</b>	<b>Température</b>	<b>IPTG</b>	<b>Temps d'induction de l'expression</b>
Nt CENPB	37°C	1 mM	Toute la nuit
Ct CENPB	30°C	1 mM	Toute la nuit
CENPC	37°C	1 mM	4 heures
Nt CENPI	37°C	0.5 mM	4 heures
Int CENPI	30°C	0.5 mM	4 heures
Ct CENPI	30°C	0.5 mM	4 heures
CENPH	37°C	0.5 mM	4 heures
CENPK	30°C	0.5 mM	4 heures
CENPM	30°C	0.5 mM	4 heures
CENPP	30°C	0.5 mM	4 heures

d'autres protéines bactériennes, les protéines insolubles sous forme de corps d'inclusion et les restes cellulaires des bactéries. Ce culot est d'abord lavé par un détergeant le Triton, et ensuite les corps d'inclusion contenant les protéines hautement exprimées sont solubilisés avec l'urée 8 M, de cette manière, les protéines exprimées sont totalement dénaturées par l'urée. La solubilisation est réalisée en laissant ce culot sur une roue tournante à 4°C durant une nuit. La séparation de la fraction de la protéine soluble et insoluble dans l'urée est effectuée par une centrifugation à 3000 rpm à 4°C pendant 30 minutes. Un aliquot du surnageant est prélevé pour une analyse ultérieure sur un gel SDS-PAGE et révélé par coloration avec le bleu de Coomassie. Le gel SDS-PAGE nous permet dans ce cas de comparer la préparation des protéines CENPs exprimées qui se sont solubilisées dans l'urée 8 M et celles qui restent insolubles. La réextraction du culot insoluble par des volumes supérieurs de l'urée 8 M améliore le rendement des protéines en solution.

### **III-2-2 Purification sur colonne de nickel des protéines CENPs exprimées**

La colonne Ni-NTA His Bind est une colonne contenant une séquence His-Tag préparée pour la purification des protéines par chromatographie d'affinité. La purification est basée sur le principe d'affinité entre la protéine étiquetée polyhistidine fusionnée avec la protéine d'intérêt et l'ion métallique immobilisé (le Nickel Ni<sup>2+</sup>) sur la résine Ni-NTA. Nous avons utilisé les colonnes Ni-NTA (Novagen) pour la purification des protéines centromériques CENPP, CENPM, Nt CENPI, int CENPI, Ct CENPI.

Premièrement la colonne est équilibrée avec 10 ml du Tampon A (8M urée, 0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 Tris-HCl, pH8), puis l'échantillon de la protéine CENP extraite et dissoute avec l'urée 8M est passé à travers la colonne grâce à une pompe péristaltique. L'échantillon est chargé plusieurs fois pour optimiser le processus d'union de la protéine à la résine et le filtrat est récupéré pour une analyse sur gel SDS-PAGE.

La résine est lavée avec 10 ml du Tampon B (urée 8M, 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01M Tris HCl, pH 6,3) en maintenant le flux très bas durant cette étape. L'élution de la protéine CENP retenue dans la colonne est effectuée avec 4ml du tampon E (urée 8M,

0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01M Tris Hcl pH 4.5, 250 mM imidazole) puis 5 fractions de 1 ml sont récupérées et analysées dans des gels SDS-PAGE.

### **III-2-3 Purification à partir du gel de polyacrylamide**

Pour divers objectifs de ce travail de thèse, nous avons purifié les bandes des protéines CENPs par leur extraction à partir des gels SDS PAGE. Les protéines centromériques peuvent être purifiées à partir d'un gel SDS-PAGE sans coloration en présence d'un marqueur de poids moléculaire coloré, qui sert comme référence pour couper les bandes qui correspondent à nos protéines d'intérêt. Le fragment de polyacrylamide coupé et contenant la protéine d'intérêt est placé dans un tube Eppendorf en y ajoutant 1 ml de la solution EDTA 50 mM avec inhibiteur de protéases. Le tube est incubé à 37° C durant toute la nuit. L'homogénéité de la protéine CENP extraite est analysée dans un gel SDS-PAGE et confirmée dans chaque cas par analyse par western blot avec des anticorps spécifiques.

## **IV- Cultures cellulaires et immunofluorescence**

### **IV-1 Culture et multiplication des cellules HeLa**

Les cellules HeLa constituent une lignée cellulaire qui provient d'un prélèvement effectué sur une patiente **Henrietta Lacks**, atteinte d'un cancer du col de l'utérus et décédée en 1951. Ce sont des cellules adhérentes de type épithélial. Le milieu de culture utilisé est DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec le sérum bovin fœtal 10%. Toutes les cellules sont cultivées dans des conditions standard de culture (37°C et 5% CO<sub>2</sub>), sous contrôle d'humidité en chambre de culture (Heraeus) (Figure 8). Pour la multiplication et le sousclonage, les cellules adhérentes en état de confluence sont lavées avec du PBS stérile après élimination du milieu de culture, puis traitées avec un volume de trypsine-EDTA (0,25%) jusqu'à leur décollement du fond de la plaque (le contrôle du détachement des cellules se fait par microscope). La trypsine est neutralisée par l'addition au moins de 4 volumes de milieu de culture complet pour 1 volume de trypsine. Ensuite on ajoute le milieu de culture en proportion allant de 1:2 à

1:10 en fonction de la dilution espérée des cellules qui sont déposées dans une nouvelle boîte de culture.

#### **IV-2 Technique d'immunofluorescence Indirecte (IF)**

C'est une technique qui permet la localisation intracellulaire des protéines et d'autres molécules grâce à des marqueurs fluorochromes. C'est une technique d'immuno-marquage qui nécessite un anticorps primaire dirigé contre l'antigène recherché, et ensuite un second anticorps marqué par un fluorochrome qui a une haute affinité pour l'anticorps primaire. Nous utilisons des lignées cellulaires Hela (Humaines), Indian Muntjac (chèvre), et CHO (Hamster), lesquelles croissent suivant les protocoles de routine.

La fixation des cellules est effectuée dans le méthanol absolu froid à -20°C durant 10 minutes. Après la fixation et la lyse, la préparation est lavée avec PBS1% durant 5 minutes à température ambiante. Après la lame est incubée avec le premier anticorps dilué dans le PBS1% durant 45 minutes à 37° C. Après cette incubation la préparation est lavée une deuxième fois en PBS1% durant 15 minutes à température ambiante puis incubée de nouveau à 37°C durant 45 minutes avec le second anticorps marqué avec FITC qui va reconnaître la partie constante de l'anticorps utilisé lors de la première incubation. La préparation est lavée de nouveau avec PBS 1% durant 15 minutes à température ambiante. Cette préparation est finalement déposée sur une solution de Hoechst 33258 à une concentration de 1µg/ml en PBS1% : glycérol (1:9) pour colorer la chromatine. L'observation se fait par un microscope Zeiss Axiophot équipé d'un système d'épi-fluorescence. L'acquisition des photos des cellules immunofluorescentes est réalisée avec système de prise de photo et le traitement est réalisé par le programme Spot advanced.

#### **V- Techniques de western blot**

##### **V-1 Électrophorèse sur gel SDS PAGE**

Pour l'analyse de protéines on emploie la méthode de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire à travers un gel de polyacrylamide. Dans cette technique d'électrophorèse, les protéines sont analysées en présence de





**Figure 8.** Photo de la chambre de culture (Heraeus) utilisée pour la culture et la multiplication des cellules HeLa.

$\beta$ -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures, et de SDS qui dénature et homogénéise la charge des protéines en leur conférant une charge uniquement négative. Ainsi, toutes les protéines traitées vont migrer dans la même direction sous un champ électrique et peuvent être séparées seulement en fonction de leur poids moléculaire à travers un gel de polyacrylamide. Pour déterminer la taille approximative des différentes protéines de l'échantillon déposé, un mélange de protéines colorées dont le poids moléculaire est connu, est déposé sur le même gel. Le pourcentage en acrylamide du gel généralement utilisé oscille entre 7 et 15%. Le choix de la concentration d'acrylamide se fait en fonction de la taille de la protéine d'intérêt qu'on veut séparer. Les quantités et les volumes indiqués dans le tableau 11 correspondent à la préparation d'un gel avec les dimensions 10x11x0.12 cm. Après électrophorèse le gel est coloré en le submergeant dans une solution de bleu de Coomassie (bleu de Coomassie (R250) 0,25%, méthanol 50%, acide acétique 10%) pendant au moins 30 minutes sous agitation. L'excès de coloration est éliminé avec des lavages successifs dans une solution de décoloration (méthanol 26%, acide acétique 7%). Les bandes bleues présentes dans le gel correspondent aux protéines contenues dans l'échantillon.

## **V-2 Immunodétection des protéines centromériques par western blot**

Une fois l'électrophorèse est terminée, les protéines sont séparées le long du gel de polyacrylamide. Afin de rendre ces protéines accessibles à la détection par les anticorps, elles sont transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose. Le principe du transfert consiste à placer la membrane face-à-face avec le gel et un courant électrique est appliqué aux plaques sur les deux côtés. Les protéines, après leur séparation, sont toujours entourées par le SDS et donc sous l'influence d'un champ électrique, elles vont migrer depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Les protéines chargées négativement en présence de SDS migrent vers l'anode sous un champ électrique (1mA/cm<sup>2</sup> de gel) (Towbin et al, 1992). Le temps de transfert dépend de l'épaisseur du gel et il est aux alentours de 2h30 à 200 mA pour nos gels. Après le transfert, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant une heure à température ambiante avec une solution de blocage PBS-Tween 0,05%, lait déshydraté 5% (Possibilité d'incubation à 4° C durant toute la nuit). La membrane est ensuite incubée pendant 1h face à l'anticorps primaire spécifique pour la

**Tableau 11.** Quantités et volumes requis pour la préparation d'un gel SDS-PAGE de dimensions 10x11x0,12 cm à différentes concentration.

	<b>7%</b>	<b>10%</b>	<b>12,5%</b>	<b>15%</b>
Tampon de séparation 2X	6.25 mL	6.25 mL	6.25 mL	6.25 mL
Polyacrylamide	2.9 mL	4.15mL	5.2 mL	6.25mL
H <sub>2</sub> O	3.35 mL	2.1mL	1.05 mL	0 ml
Temed	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL
Persulfate d'ammonium	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL

protéine d'intérêt produite au laboratoire, acheté ou face au sérum humain à diagnostiquer dans une solution PBS-Tween 0,05% (possibilité d'incuber à 4° C pendant la nuit). La membrane est ensuite lavée 3 fois dans un tampon PBS-Tween 0,05% puis incubée pendant 1h avec une solution PBS-Tween 0,05% contenant l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire (possibilité d'incubation à 4°C durant toute la nuit). La membrane est incubée face aux sérums des patients sclérodermiques (l'anticorps primaire) ont été testés à une dilution de 1/200 et 1/1000 et ceux des patients souffrant de problèmes hépatiques ont été testés à une dilution de 1:600. Dans une solution PBS-Tween 0,05% la membrane est lavée par la suite 3 fois puis incubée de nouveau durant une heure dans une solution PBS-Tween 0,05% contenant l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. Le second anticorps, qui est le sérum antihumain est utilisé à une dilution qui dépend de la méthode de révélation de la réaction, il est utilisé à 1/3000 quand la révélation est réalisée avec le chloronaphtol et à 1:30000 quand la révélation est réalisée par chimioluminescence. Dans le cas de l'étude de la spécificité des sérums produits dans des lapins, les sérums sont testés à une dilution de 1:600 ou 1:1000 et le second anticorps utilisé est le sérum anti-Ig de lapin employé à 1:3000 quand la révélation est faite par le chloronaphtol et à 1:25000 quand la révélation est faite par chimioluminescence.

Finalement, la membrane est lavée 3 fois pendant 15 minutes avec une solution PBS-Tween 0,05% avant d'être révélée par le chloronaphtol ou par chimiluminescence en utilisant le réactif ECL® (Amersham).

## **VI- Développement d'un array ou puce spécifique des autoantigènes centromériques**

La construction d'un array exige la fixation et l'immobilisation des molécules sous forme d'une matrice selon un ordre bien déterminé. Les protéines fixées lors de nos expériences doivent être accessibles pour des hybridations et des réactions avec d'autres molécules permettant la réalisation d'un contrôle. Le développement d'une array à protéine présente pour plusieurs raisons (hétérogénéité chimique, composition, stabilité, affinité...) un grand défi pour les chercheurs.

Nous avons utilisé un système manuel pour le dépôt des échantillons, le micro échantillonneur (MicroCaster), sur les arrays FAST Slide (Figure 9). Nous avons eu recours à l'utilisation des puces FAST, développés par Whatman Schleicher &

Schuelle's qui ont été conçus pour différents types d'interactions tel que : Enzyme-substrat, protéine-protéine, anticorps-antigène, médicament-protéine.

### **VI-1 Préparation des antigènes CENPB et CENPI**

Les protéines utilisées dans cette technique sont les trois protéines centromériques CENPB Nt (amine-terminale) et Ct CENPB) (carboxyle-terminal) et Nt CENPI. Ces protéines sont extraites à partir d'un gel de polyacrylamide sans coloration (voir paragraphe III-2-3 purification à partir d'un gel de polyacrylamide). La concentration des protéines est calculée comme sera expliqué dans un paragraphe postérieur (voir paragraphe V-2 quantification des antigènes utilisés du chapitre Résultats).

### **VI-2 Préparation du MicroCaster : le micro échantillonneur**

Avant toute utilisation du micro échantillonneur, l'unité d'indexation et le support des arrays sont nettoyés avec une solution javellisée à 5%, et séchés avant d'être utilisés. L'échantillonneur, est une unité qui contient 8 « pin » (épingles) solides de 0,457 mm de diamètre chacune. Ils sont d'abord submergés dans un bain d'eau stérile, suivi d'un bain d'éthanol 100%. Ensuite une dilution est préparée avec de l'eau stérile au 1:5 de la solution "pin conditionner" dans laquelle les «pin» sont plongés et transférés soigneusement sur papier Whatman Schleicher & Schuell GB202. Les «pin» sont ainsi préparés et prêts pour le dépôt des échantillons de protéines.

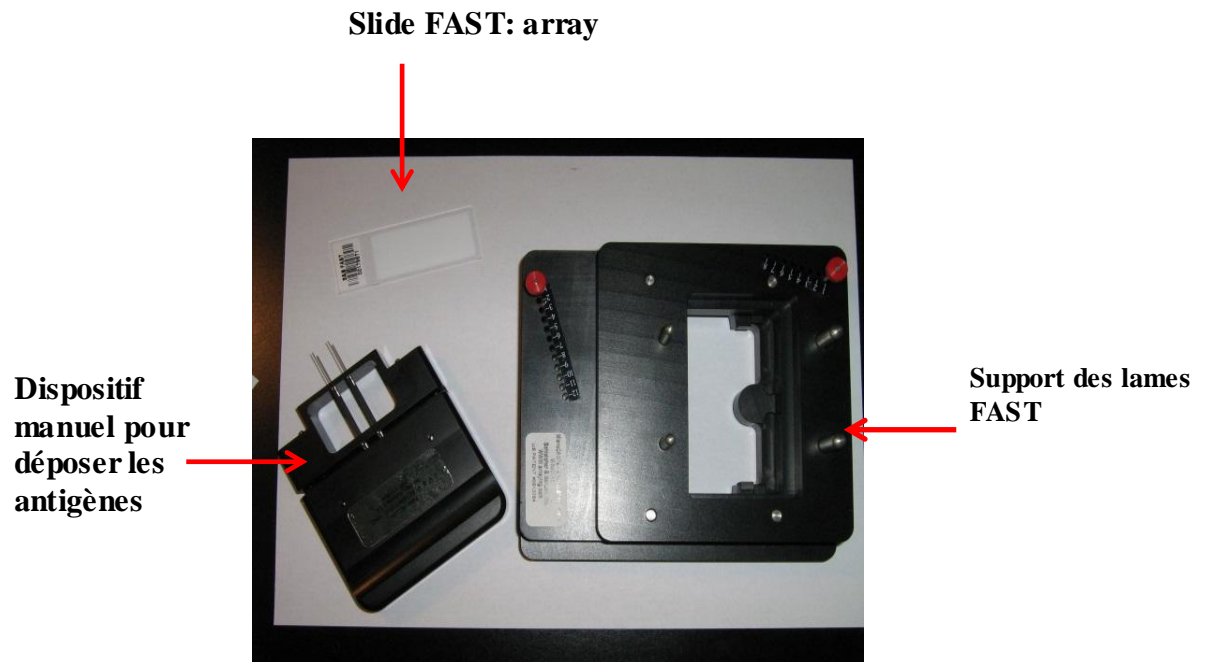
### **VI-3 Dépôt des protéines Nt CENPB, Ct CENPB et Nt CENPI**

L'utilisation de nitrocellulose comme surface pour l'immobilisation des acides nucléiques a été largement décrite dans la littérature. La technologie des microarrays à protéine utilise généralement des lames de verre couvertes avec des zones de nitrocellulose pour la dispensation des protéines (FAST slides SS). L'immobilisation des protéines sur la surface de l'array se réalise selon le protocole du MicroCaster. D'abord deux lames FAST sont déposées sur le support et l'unité d'indexation en dessus, avec l'axe des abscisses X et celui des ordonnées Y sont placés en première

position. L'instrument comportant les pins est déposé dans des puits contenant la protéine à déposer. Lors de cette étape il faut s'assurer que les pins sont bien au centre et il faut éviter tout contact avec le fond des puits. Cet instrument est retiré des puits avec un mouvement ferme et placé sur l'unité d'indexation. Une pression manuelle est exercée sur le haut de ce dernier jusqu'à ce qu'on atteigne la deuxième position d'arrêt et donc la mise en place des protéines. Le mouvement distal de chacun des axes X et Y permet le déplacement de l'unité porteuse des pins et ainsi générer plusieurs points de dépôt correspondant aux protéines déposées sur la même lame FAST. Ce mouvement permet aussi de passer d'une lame à une autre. Ces étapes sont répétées pour chaque protéine et pour chaque concentration. Les pins doivent être lavés entre le dépôt de deux concentrations différentes et entre deux protéines différentes en les submergeant dans deux bains d'eau stérile et un bain d'éthanol et sont ensuite séchés comme déjà décrits. Les puces contenant les protéines sont retirées du portoir, séchées et elles sont ainsi prêtes pour l'utilisation.

#### **VI-4 Etapes pour le développement de l'array**

Une fois les antigènes CENPs sont déposés sur les lames FAST, celles-ci sont placées dans un volume suffisant de la solution de saturation (PBS, albumine 3%, 10% sérum fœtal) durant une heure à température ambiante (possibilité de laisser les lames en incubation durant toute la nuit à 4° C) avec une douce agitation. Après l'étape de saturation, les arrays sont incubés face au premier anticorps dilué dans la solution PBS 1X, BSA 3%, NaCl 1M, Tween 0,1% durant une heure à température ambiante et sous une agitation douce. Ensuite les arrays sont lavés trois fois durant 15 minutes avec la solution de lavage PBS 1X Tween 0,1%, 1,5M NaCl. La dilution du premier anticorps varie selon l'objectif de l'expérience. Lors de la mise au point de la technique et pour évaluer la spécificité et la sensibilité de la technique, la dilution du premier anticorps a varié entre 1:100 et 1:1000. L'analyse par cette array de la réactivité des sérums de patients souffrant d'une sclérodémie, est réalisée en diluant les sérums à 1/200. Les arrays sont de nouveau incubées face à un anti-Ig spécifique marqué à la biotine à une dilution de 1:3000 sous les mêmes conditions de température, d'agitation et de lavage.



**Figure 9.** Différents composants utilisés pour le développement de l'array.

Après une série de 3 lavages avec le tampon PBS Tween 0,1%, NaCl 1,5 M, durant 15 minutes chacun, l'array est incubé avec de la Streptavidin-Cy5 (Amersham Biosciences) qui est diluée dans le tampon d'incubation à 1:6000, durant 1 heure à température ambiante. À partir de cette étape les arrays sont protégés de la lumière pour éviter la perte de coloration. Les arrays sont ensuite lavés trois fois (5 minutes chaque lavage) avec la solution de lavage contenant PBS Tween 0,1%, NaCl 1,5 M, puis séchés et numérisés avec le Scanner GenePix 4100A pour capturer des images et pour calculer l'intensité spécifique de chaque spot généré suite à la réaction de la protéine face à l'anticorps.

Pour détecter le signal de l'array nous avons utilisé le système GenePix microarray Scanner qui dispose d'une haute résolution. Une variété de fluorophores peut être utilisée avec le scanner GENEPIX 4100A, puisque sa conception optique comprend 6 différents filtres d'émission qui peuvent être sélectionnés par l'utilisateur. La puissance du laser utilisée est contrôlée lors de la numérisation pour assurer un signal de sortie constant. Le scanner trace automatiquement un histogramme de la distribution des intensités des pixels. Les paramètres du scanner peuvent être optimisés pendant la numérisation. Le scanner GenePix 4100A offre une résolution entre 5 et 100 microns. Le logiciel GenePix Pro utilisé est un logiciel qui permet de convertir les pixels capturés à partir d'une image en données informatiques. L'intensité de la fluorescence mesurée pour chaque spot inclut une fluorescence parasite provenant de plusieurs sources tel que l'auto fluorescence de l'array et de la non spécificité de l'essai. Cette fluorescence parasite est appelée bruit de fond (Background). Pour que l'intensité mesurée soit correcte il faut éliminer ce bruit de fond. Lors de nos expériences, nous avons eu recours à la méthode dite globale de soustraction de bruit de fond, où une valeur unique et uniforme de bruit de fond est calculée pour l'ensemble de la puce. Cette estimation est obtenue à partir de la moyenne des valeurs locales ou spécifiées par l'utilisateur. L'acquisition d'image commence avec le démarrage du Scanner genePix, et pour chaque spot on calcule la moyenne, la médiane, la déviation standard et la régression.

## **VI-5 Propriétés de l'array**

Toute méthode analytique doit être validée avant d'être utilisée. La vérification, la caractérisation ou la validation consiste à établir avec un degré de confiance élevée et



sous une forme documentée, qu'un procédé déterminé permet d'obtenir un produit qui atteint effectivement des spécifications définies à l'avance.

La validation d'une technique doit être prévue en fonction des différents contextes auxquels l'analyseur est confronté. Lors de la validation, il est important de démontrer que la méthode fonctionne correctement dans les conditions opératoires du laboratoire et qu'elle donne des résultats fiables pour les échantillons à analyser. Il faut donc démontrer que la méthode mise en œuvre par le laboratoire est apte à l'emploi prévu. Les performances d'une méthode peuvent être exprimées avec des caractéristiques telles que : la Sélectivité, la Spécificité, la Reproductibilité, la Linéarité, la Sensibilité, la Capacité de détection, la Robustesse et la Justesse. Ces lignes directrices devraient mener à la validation de la méthode pour un domaine d'application spécifié qui est dans notre cas la détection des auto-anticorps anti Nt y Ct CENPB et anti Nt CENPI dans les sérums des patients souffrant d'une sclérodémie. C'est une méthode d'analyse qualitative dont la réponse est basée sur la présence ou l'absence de l'auto-anticorps dans un sérum donnée. En général, la validation de cette méthode porte sur les caractéristiques mentionnées dans les paragraphes suivants.

#### **VI-5-1 La spécificité**

La spécificité est la garantie que le signal fluorescent est obtenu uniquement comme résultat de la réaction entre les anticorps et les antigènes (la fluorescence doit être le résultat spécifique de la réaction entre les anticorps présents dans les sérums et les antigènes qui sont les protéines centromériques déposés sur l'array). Durant notre travail la spécificité sera évaluée selon la qualité de la fluorescence obtenue après réaction entre les sérums de patients humains souffrant de maladies auto-immunes face aux protéines Nt CENPB, Ct CENPB et Nt CENPI.

#### **VI-5-2 Exactitude**

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. Dans notre cas les résultats de référence sont les résultats obtenus par la technique de western blot et ceux qui nous ont été fourni par les Services de

Rhumatologie des hôpitaux collaborateurs qui caractérisent et identifient les sérums humains auto-immuns.

### **VI-5-3 Précision**

La précision d'une méthode correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par les analyses de plusieurs prélèvements individuels d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions établies. La précision peut être évaluée à trois niveaux: répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité. La précision est généralement exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation d'un ensemble de mesures.

### **VI-5-4 Sensibilité**

La sensibilité d'une méthode se traduit par sa limite de détection. La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond dans notre cas, à la plus faible quantité de protéine que la méthode permet de détecter. Dans notre cas c'est la concentration minimale de l'antigène qui peut être reconnu par le sérum d'un patient qui a une réaction face à cet antigène. Pour évaluer la sensibilité de notre array on testera le résultat de la réaction des antigènes déposés contre différentes dilutions des sérums spécifiques.

### **VI-5-5 Linéarité**

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (dans certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon. La linéarité de la méthode est établie grâce aux réactions de sérums spécifiques anti CENPB et anti CENPI obtenues après immunisation des animaux (lapins et chèvres) contre les différentes parties des protéines centromériques CENPB et CENPI.

Résultats

## **I-Expression de cADN codant pour les protéines CENPs**

### **I-1 Expression des protéines centromériques Ct CENPB, Nt CENPB, CENPC, CENPH y Nt CENPI**

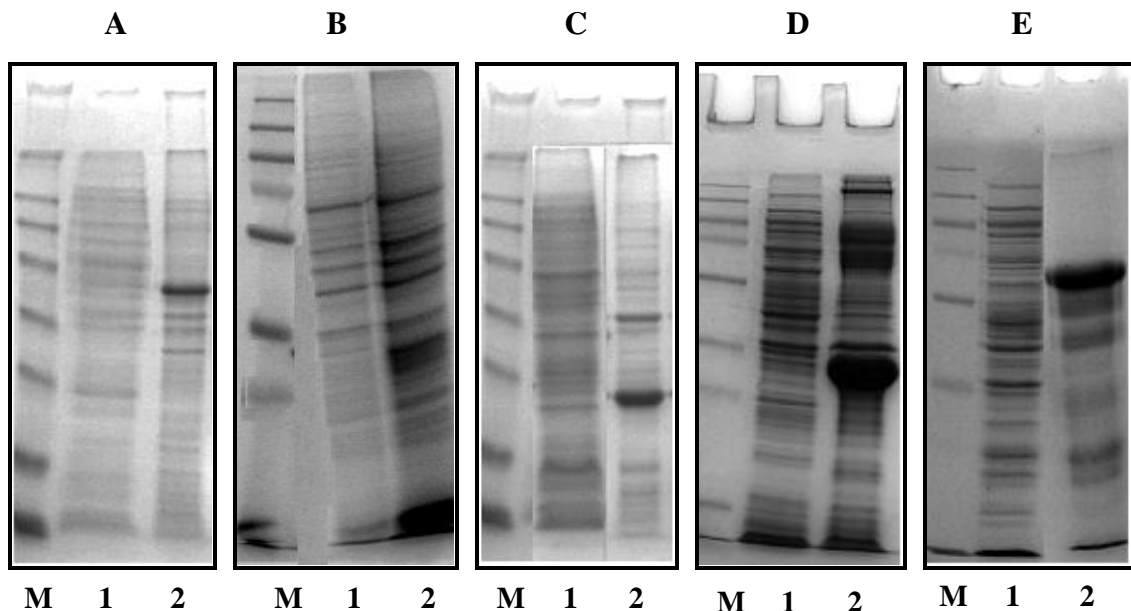
Dans le but d'analyser initialement les protéines centromériques recombinantes, nous avons exprimé les fragments qui codent pour les protéines tronqués Nt CENPB, Ct CENPB, Nt CENPI, CENPH et CENPC. Comme indiqué dans le tableau 7 du chapitre Matériel et Méthodes ces clones ont été obtenus d'autres laboratoires. Les clones ont été employés pour transformer les souches bactériennes BL21 DE3. L'expression de chacune des protéines a été faite selon les conditions de température, du temps et de la concentration de l'agent chimique IPTG correspondants comme déjà cités dans le paragraphe III-1-1 du chapitre Matériel et Méthodes. A l'exception de la protéine CENPH qui est liée à la glutathion transférase chaque protéine centromérique exprimée est étiquetée avec une queue hexahistidine qui permet de l'identifier et de la purifier à partir d'un extrait bactérien total.

Le poids moléculaire apparent obtenu pour les protéines exprimées Ct CENPB, Nt CENPB, Nt CENPI et CENPC coïncide avec la taille attendue plus 6 kDa correspondant au poids moléculaire des 6 histidines. Dans le cas de la protéine CENPH il faut rajouter à la protéine CENPH exprimée 28 kDa qui correspond à la taille de la glutathion transférase liée (Tableau 12).

Après chaque expression l'extrait obtenu est analysé sur un gel de polyacrylamide de 12,5%. La figure 10 montre les extraits bactériens correspondant à chaque protéine après le processus d'induction de l'expression et l'obtention des corps d'inclusion.

**Tableau 12.** Taille réelle et apparente des protéines exprimées Nt CENPB, Ct CENPB, CENPC, Nt CEPNI y CENPH.

La protéine CENPs	Nombre des acides aminés	Poids moléculaire réel (attendu)	Poids moléculaire apparent
Nt CENPB	350 a.a	40 kDa	46 kDa
Ct CENPB	100 a.a	11 kDa	17 kDa
CENPC	199 a.a	21 kDa	27 kDa
Nt CENPI	249 a.a	28 kDa	34 kDa
CENPH	274 a.a	28 kDa	56 kDa



**Figure 10.** Coloration au bleu de Coomassie des gels de polyacrylamide qui montrent les corps d'inclusion après expression des protéines CENPs. La piste 1 présente sur tous les gels l'extrait bactérien avant l'induction de l'expression. Sur la piste 2 de tous les gels on montre les corps d'inclusion des protéines CENPs. En (A) on montre la protéine Nt CENPB. En B on montre la protéine Ct CENPB. En C on montre la protéine CENPC. En D on montre la protéine Nt CENPI. En E on montre la protéine CENPH. Les pistes M indiquent les marqueurs de poids moléculaire du haut en bas: 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 et 11 kDa.

## **I-2 Expression des protéines CENPK, CENPM, CENPP, Int CENPI et Ct CENPI**

Afin d'étudier la réponse auto-immune de patients sclérodermiques face à la protéine CENPI, une fois la protéine Nt CENPI exprimée (paragraphe I-1) nous avons exprimé les deux parties Int CENPI et Ct CENPI correspondant aux domaines intermédiaire et carboxy-terminal. Pour ceci la première étape a consisté à concevoir des oligonucléotides spécifiques qui vont permettre d'amplifier par la technique de PCR les deux fragments qui codent pour les domaines Int et Ct de CENPI. Les fragments amplifiés ont une taille de 900 pb pour la partie Int CENPI et 618 pb pour la partie Ct CENPI. Le produit d'amplification par PCR est représenté dans la figure 11. Les cDNA qui codent respectivement pour les protéines Int CENPI et Ct CENPI ont été clonés séparément en utilisant les sites BglII et SalI, et BamHI et SalI du vecteur pBiex.

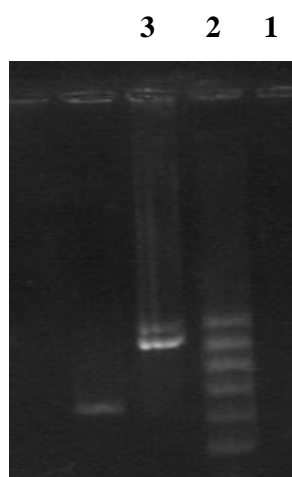
Le processus d'induction de l'expression des protéines Int CENPI et Ct CENPI donne lieu à des protéines recombinantes d'un poids moléculaire de 39 kDa et 38 kDa comprenant une étiquette hexahistidine terminale (Tableau 13).

L'analyse sur gel SDS-PAGE des fragments exprimés de CENPI est représentée dans la figure 12.

Après l'expression des protéines déjà citées, nous avons suivi le même protocole pour le reste des protéines centromériques CENPK, CENPM et CENPP.

Le tableau 14 résume la taille des résidus d'acides aminés de chacun des fragments de cADN transformés dans le vecteur Topo 10 et ensuite exprimés dans le vecteur pBiex.

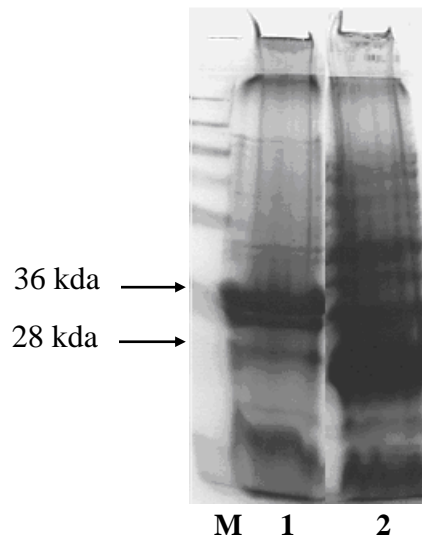
Chacun de ces fragments est lié à 6 histidines. La transformation des différentes constructions (insert + vecteur) a été faite dans les souches bactériennes BL21 DE3 selon le protocole déjà décrit. La figure 13A montre le résultat de l'induction de l'expression avec l'IPTG, de la protéine centromérique recombinante CENPK. Les extraits bactériens correspondant à l'expression des protéines CENPP et CENPM sont représentés dans la figure 13B.



**Figure 11.** Produits de réaction d'amplification par PCR des deux fragments qui correspondent au domaine intermédiaire et carboxy-terminal de la protéine CENPI. On montre sur la piste 2 le fragment Int CENPI. Sur la piste 3 : le fragment Ct CENPI. Sur la piste 1 : marqueur de poids moléculaire du haut vers le bas 1000, 900, 800, 700, 600, 500 pb.

**Tableau 13.** Caractéristiques des deux fragments codant pour les protéines Int CENPI et Ct CENPI.

La protéine exprimée	Nombre de résidus	Poids moléculaire attendu	Poids moléculaire apparent
Int CENPI	300 a.a	33 kDa	39 kDa
Ct CENPI	206 a.a	22 kDa	28 kDa

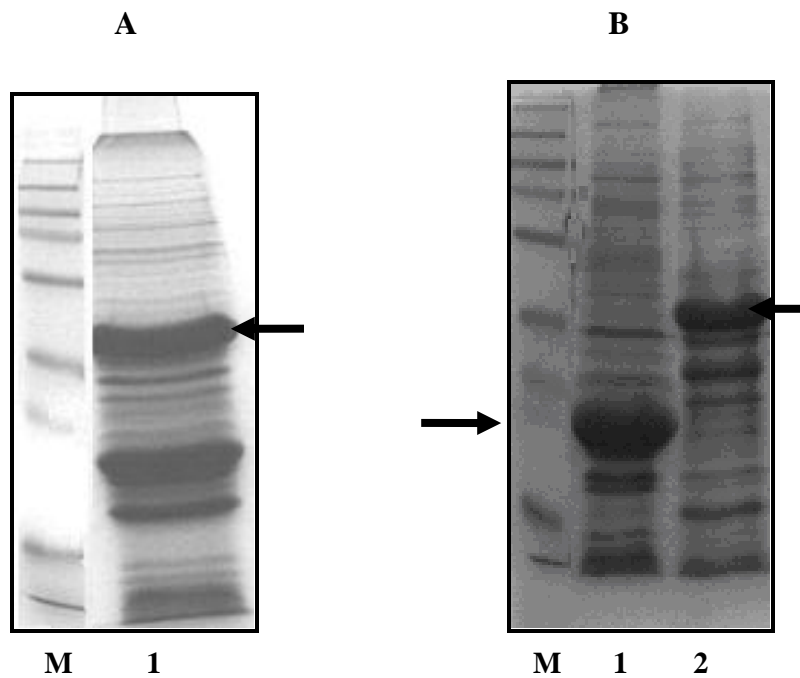


**Figure 12. Gel SDS-PAGE d'expression des domaines Int CENPI et Ct CENPI.** Coloration au bleu de Coomassie des corps d'inclusion après induction de l'expression. On montre dans la piste 1 la protéine Int CENPI et dans la piste 2 la protéine Ct CENPI. Dans la piste M on montre le poids moléculaire, du haut vers le bas 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 et 11 kDa.

**Tableau 14.** Caractéristiques des protéines centromériques recombinantes exprimées CENPK, CENPM et CENPP.

La protéine exprimée	Nombre de résidus	Taille réelle (attendue)	Taille apparente
CENPK	360 a.a	40 kDa	46 kDa
CENPM	180 a.a	20 kDa	26 kDa
CENPP	288 a.a	32 kDa	38 kDa





**Figure 13. Expression des protéines centromériques recombinantes CENPK, CENPM et CENPP.** On montre des gels SDS-PAGE teints avec le bleu de Coomassie où sont analysées les protéines exprimées. En A on montre les corps d'inclusion de la protéine exprimée CENPK. En B on montre dans la piste 1 la protéine exprimée CENPM et dans la piste 2 la protéine CENPP.

## **II- Purification des protéines CENPs exprimées**

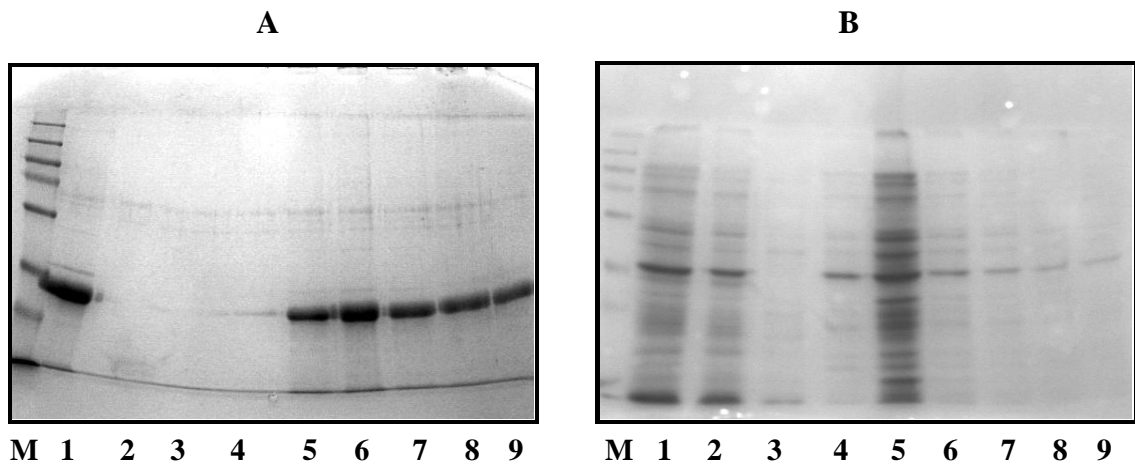
Afin de pouvoir utiliser les différentes protéines CENPs exprimées dans différents essais, nous avons purifié toutes ces protéines via deux techniques.

### **II-1 Purification par colonne d'affinité**

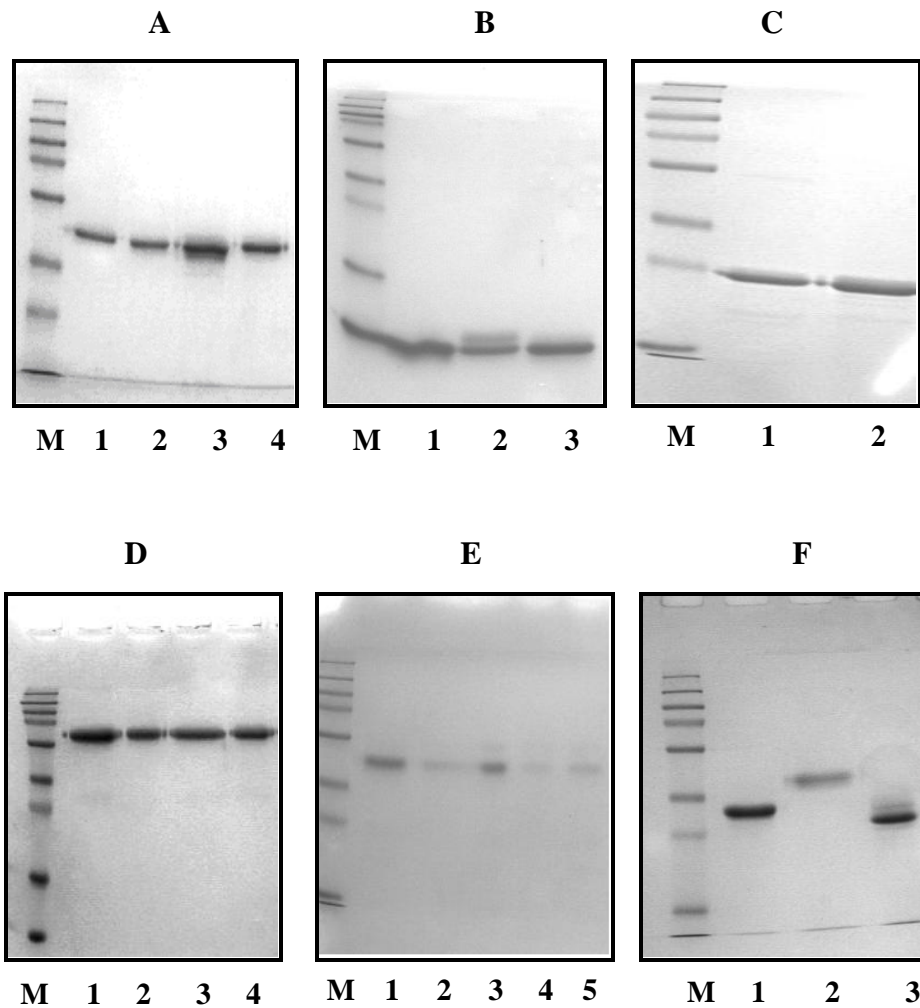
Les trois fragments de la protéine CENPI (Nt, Int y Ct) ont été purifiés sur colonne d'affinité avec le Nickel. Les échantillons sont chargés sur la colonne en présence d'un tampon composé de l'urée 8M utilisé pour la solubilisation des corps d'inclusion des trois fragments de la protéine CENPI. L'élution avec un tampon qui contient de l'imidazole permet de libérer de la protéine retenue par affinité à la résine et de la récupérer en différentes fractions. La figure 14A présente les différentes fractions obtenues après purification de la protéine Nt CENPI à partir des corps d'inclusion. L'une des difficultés de cette technique est l'optimisation du lavage de façon à éliminer la majorité de ce qui est non spécifique sans altérer l'union de la protéine d'intérêt à la colonne. Nous avons utilisé pour le lavage un tampon qui contient le détergent Triton à 2% et 50mM NaCl. Nous avons aussi essayé de purifier de la même façon la protéine CENPP, mais nous n'avons pas pu obtenir cette protéine pure en concentration suffisante. La figure 14B montre le résultat de purification de cette protéine. La protéine Nt CENPB a été aussi purifiée par colonne d'affinité. Les autres protéines CENPs y compris celles citées précédemment ont été purifiées à partir des gels de polyacrylamide.

### **II-2 Purification à partir du gel de polyacrylamide**

Les protéines CENPs exprimées ont été aussi purifiées à partir d'un gel de polyacrylamide sans coloration, en présence d'un marqueur de poids moléculaire pré-coloré, par coupure de la bande correspondant à la protéine. Ceci nous a permis d'obtenir les protéines pures et concentrées (figure 15). Les protéines Nt CENPB, Ct CENPB, CENPI, CENPK, CENPM et CENPP ainsi purifiées ont été utilisées pour



**Figure 14. Purification des protéines Nt CENPI et CENPP à travers une colonne d'affinité de Nickel.** En **A** on montre la purification de la protéine Nt CENPI exprimée et solubilisée dans un tampon composé de l'urée 8M. On fait passer plusieurs fois à travers la colonne 30 ml de l'extrait de la protéine solubilisée en solution 8M d'urée. Le lavage se fait avec un tampon comprenant 50mM NaCl et Triton 2%. L'élué est réalisée avec un tampon contenant l'imidazole à 250 mM pour rompre la liaison Nickel-histidines. On montre sur la piste 1 les protéines non retenues par la colonne et sur la piste 2 le lavage de la colonne. Dans les pistes 3-9 on montre la protéine Nt CENPI éluée avec 250 mM imidazole. En **B** on montre la purification de la protéine CENPP. Sur la piste 1 on montre les protéines non unies à la colonne et dans la piste 2 le lavage de la colonne. Dans les pistes 3-9 on montre la protéine CENPP éluée avec 250 mM d'imidazole. Dans la piste M apparaissent les marqueurs de poids moléculaire du haut vers le bas 250,130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 et 11 kDa.



**Figure 15. Purification des protéines CENPs exprimées à partir de gels de polyacrylamide.** Les figures montrent les bandes de protéines centromériques isolées à partir de gels SDS-PAGE et colorées avec le bleu de Coomassie. En **A** les pistes 1-4 montrent les différentes bandes correspondant à la protéine Nt CENPB. En **B** les pistes 1-3 montrent la protéine Ct CENPB isolée. En **C** les pistes 1-2 correspondent à la protéine CENPM. En **D** les pistes 1-4 montrent la protéine CENPH. En **E** les pistes 1-5 la protéine CENPK. En **F** la piste 2 montre la protéine Nt CENPI, la piste 3 la protéine Int CENPI et la piste 4 la protéine Ct CENPI. Dans la piste M de tous les gels on montre des marqueurs de poids moléculaire, du haut vers le bas de 250,130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 11 kDa.

étudier et analyser par western blot les sérums des patients souffrant de maladies auto-immunes.

### **III – Etude de la spécificité des sérums anti CENPs**

Grâce à des résultats de travaux de recherche antérieurs obtenus dans le laboratoire nous disposons de plusieurs sérums spécifiques anti Nt CENPB, anti Ct CENPB et anti Nt CENPI. Ces sérums ont été obtenus après immunisation des lapins avec des protéines recombinantes spécifiques correspondantes.

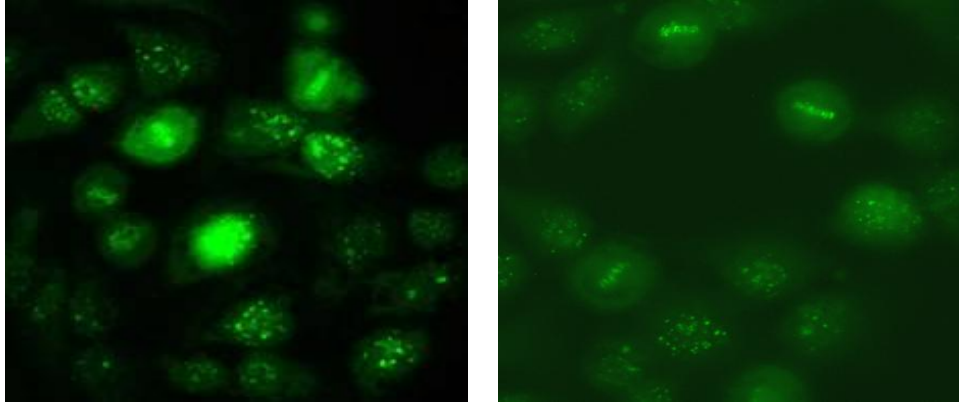
#### **III-1 Essai des sérums spécifiques par immunofluorescence**

Pour vérifier la localisation de l'anticorps anti-CENPB, nous avons testé d'abord, par la technique d'immunofluorescence, le sérum anti Nt CENPB dans des cellules HeLa. Ensuite nous avons étudié le sérum anti CENPI à différentes dilutions. La figure 16 montre des exemples de l'aspect obtenu pour chaque cas. Ces deux sérums ont donné une réaction centromérique claire, bien définie dans le cas de l'anticorps anti CENPB et moins intense dans le cas de l'anticorps anti Nt CENPI.

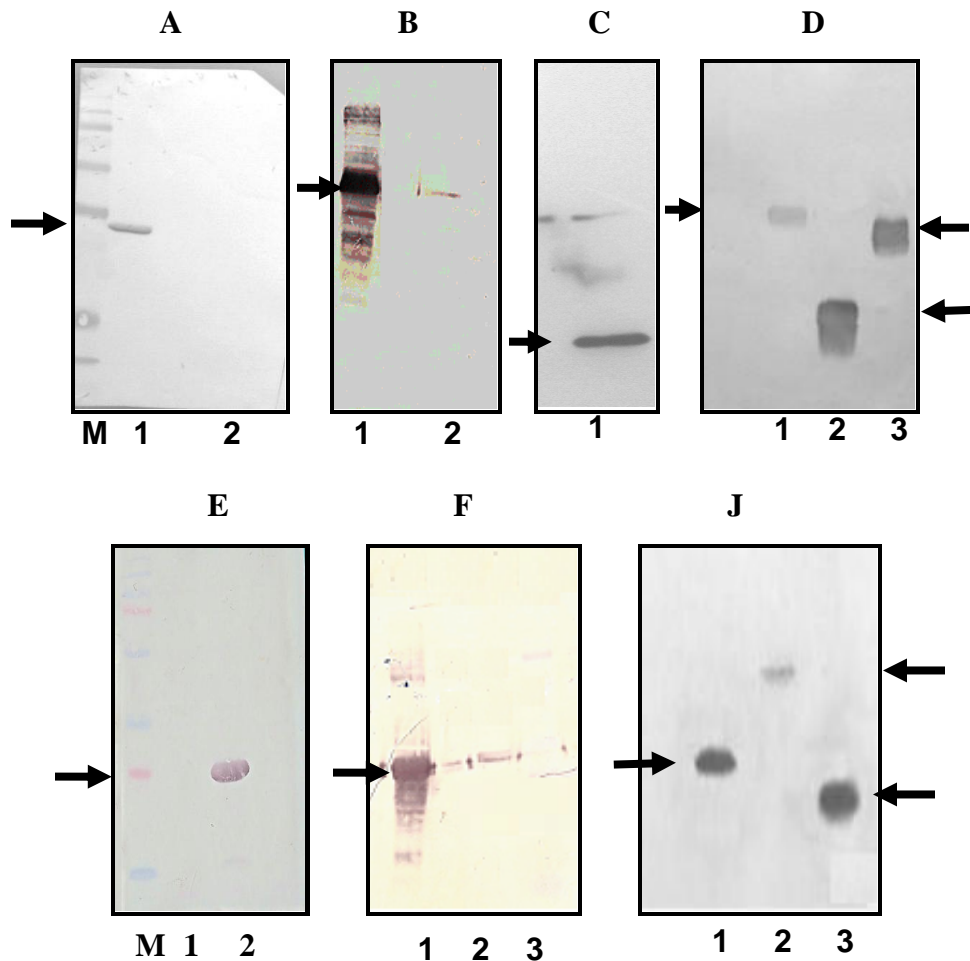
#### **III- 2 Essais des sérums spécifiques anti CENPs par western blot**

Pour confirmer que les protéines purifiées obtenues correspondaient aux protéines CENPs exprimées, nous avons d'abord testé les sérums spécifiques anti Nt CENPB, anti Ct CENPB et anti Nt CENPI, face à chacune des protéines Nt CENPB, Ct CENPB et Nt CENPI. Les figures 17 A, B et C montrent la réaction spécifique que donne chacun des sérums face à son antigène correspondant.

Les autres antigènes centromériques exprimés CENPK, CENPP, Int CENPI et Ct CENPI vu qu'ils contiennent une étiquette hexahistidine dans l'extrémité aminoterminal ont été analysés par la technique de western blot face à un sérum commercial anti Histidine. Le résultat des différentes réactions est représenté dans les figures 17 D, F, J. Par ailleurs, nous avons analysé par la même technique l'antigène CENPM face à un sérum monoclonal commercial anti CENPM lequel donne le résultat représenté dans



**Figure 16.** Analyse par la technique d'immunofluorescence (IF) des sérums spécifiques anti Nt CENPB et anti Nt CENPI dans des cellules HeLa. On observe que la fluorescence apparaît au niveau centromérique dans les deux cas. En **A** on montre l'aspect obtenu en utilisant le sérum anti CENPB. En **B** on montre les résultats obtenus en utilisant le sérum anti Nt CENPI.



**Figura 17.** Analyse par western blot de la réactivité des protéines CENPs exprimées et purifiées face à des sérums spécifiques. En **A** dans la piste 1 on montre la réactivité de la protéine Nt CENPB exprimée et purifiée face au sérum spécifique anti CENPB sans qu'il y ait de la réactivité avec la partie Nt CENPI (piste 2). En **B** dans la piste 1 on montre la réactivité positive de l'anti Nt CENPI face à la Nt CENPI purifiée sans qu'il y ait réactivité avec la partie Nt CENPB sur la piste 2. En **C** on montre la réaction de l'anti Ct CENPB face à la protéine Ct CENPB purifiée. En **D** on montre dans la piste 1 la réactivité de l'anticorps anti-histidine face à la protéine CENPK, dans la piste 2 face à la protéine CENPM et dans la piste 3 face à la protéine CENPP. En **E** on montre la réactivité du CENPM commercial face à la protéine CENPM purifiée. En **F** on montre dans la piste 1 la réactivité positive de l'anticorps anti-Peptide 745 face à la protéine Nt CENPI et dans la piste 2 la réactivité négative face à la protéine Ct CENPI. En **G** on montre dans la piste 1 la réactivité positive du sérum anti- Histidine face à la protéine Nt CENPI, dans la piste 2 face à la protéine Int CENPI et dans la piste 3 face à la protéine Ct CENPI.

la figure 17E. Ces résultats démontrent qu'après la mise au point des dilutions des sérums utilisés, les réactions obtenus suite à l'union antigène – anticorps étaient des réactions spécifiques face à l'antigène correspondant et aucun sérum ne présentait une cross-réactivité.

#### **IV- Etude de sérums humains**

##### **IV- 1 Échantillonnage de sérums de patients souffrant de maladies auto-immunes**

Durant cette thèse doctorale nous avons travaillé avec un groupe de 72 sérums de patients espagnols provenant du service de Rhumatologie de l'Hôpital Puerta del Mar de Cádiz, et du service de Rhumatologie de l'Hôpital Général de Jerez. Parmi ces sérums il y avait 24 cas diagnostiqués comme étant des malades atteints d'une sclérodermie localisée, 5 cas avec une sclérodermie généralisée, 31 cas avec un lupus érythémateux systémique, deux cas présentent le syndrome d'overlap, deux cas présentent la caractéristique connue pour une UCTD (undifferentiated connective tissue disease) et huit cas avec le syndrome de Sjorgen.

Nous avons étudié par la technique d'IF tous les sérums de patients avec maladies auto-immunes. Parmi les 72 sérums que nous avons analysé, nous avons trouvé 26 sérums ACA positif correspondant à des patients souffrant d'une sclérodermie localisée (21 patients), UCTD (2 patients), sclérodermie diffuse (un patient), syndrome de Sjorgen (1 patient), syndrome overlap (1 patient). La figure 18 montre quelques exemples de résultats de fluorescence obtenus.

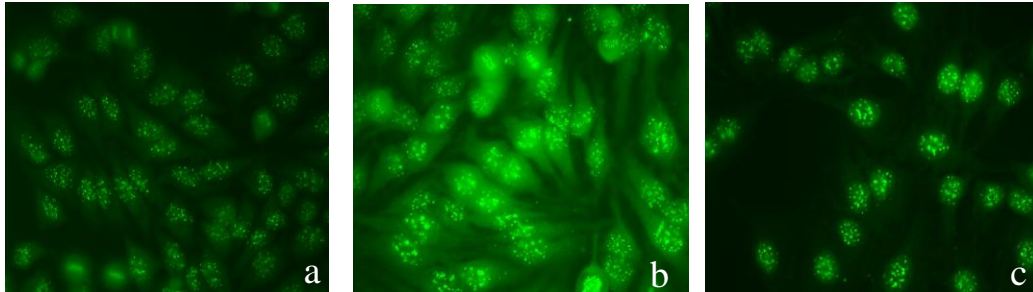
Le tableau 15 résume les aspects de fluorescence obtenus.

##### **IV- 3 Analyse des sérums humains auto-immuns par la technique du western blot**

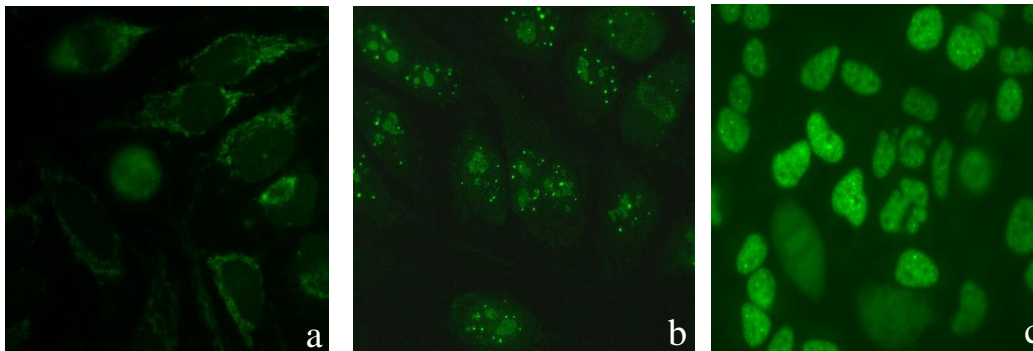
Les résultats obtenus par IF, ont été renforcés par ceux obtenus par western blot. Dans une première étape et afin d'évaluer la réactivité des sérums de patients ayant une



**A**



**B**



**Figure 18. Résultats d'immunofluorescence indirecte dans des cellules Hela en utilisant des sérums de patients souffrant de maladies auto-immunes.** En **A** on montre des exemples des profils obtenus dans le cas de sérums qui présentent des anticorps anti centromère. En **B** on montre les aspects de fluorescence de sérums anti centromère négatifs qui génèrent respectivement en a, un signal cytoplasmique, en b un signal nucléaire et en c un signal anti ADN.

**Tableau 15.** Divers profils d'immunofluorescence obtenus à partir de sérums humains de patients avec maladies auto-immunes.

Aspect de fluorescence obtenu	Nombre de cas étudié
Centromérique	26
Moucheté	19
Homogène	10
Moucheté et nucléaire	6
Homogène et moucheté	2
Négative	4
Nucléaire	2
Centriolaire	2
Point Multi- nucléolaire	1

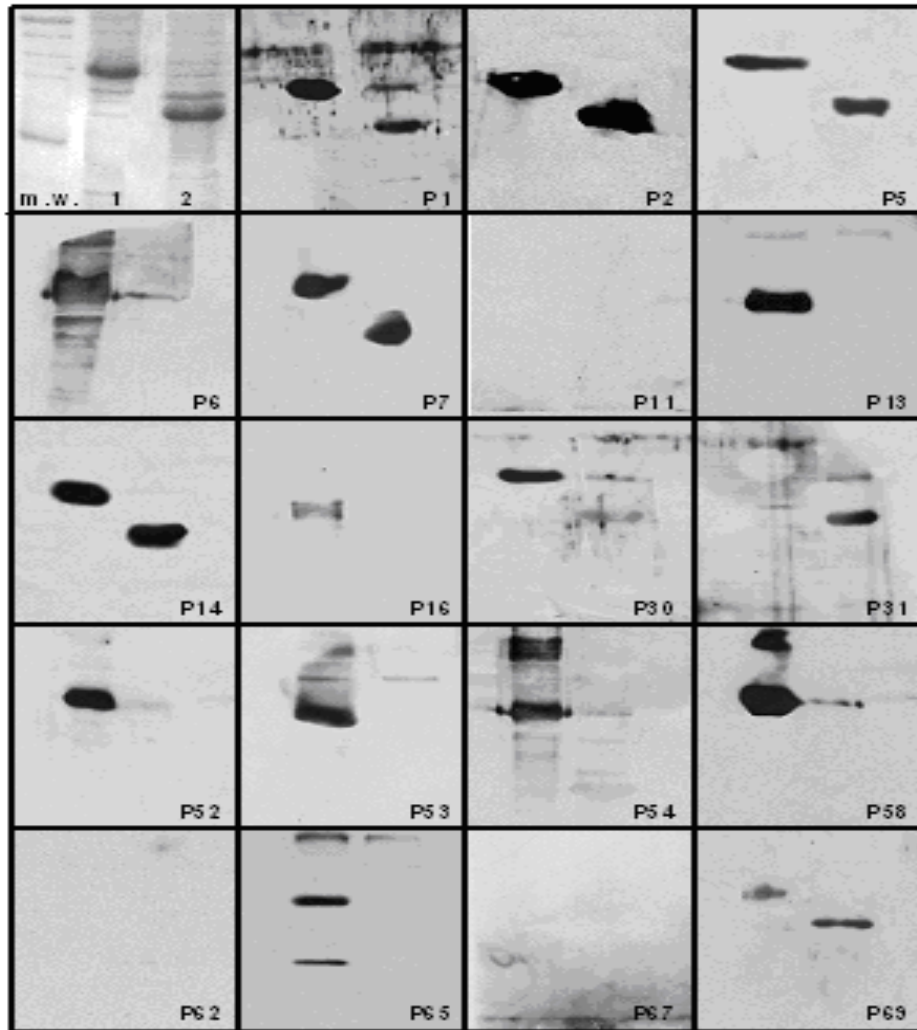
réaction contre le centromère, nous avons testé d'abord ces sérums face aux protéines Nt CENPB et Nt CENPI.

La réactivité des sérums face à l'antigène Nt CENPB a été observée dans tous les sérums qui sont AAC positifs par IF et qui représentent 26 cas d'un total de 72 sérums analysés. Parmi ceux-ci, 8 sérums testés à une dilution de 1:200 et 1:1000 présentent une réactivité face à la protéine centromérique recombinante Nt CENPI. Sept de ces huit sérums sont AAC positifs par IF et présentent aussi une réaction face à la protéine Nt CENPB, et seulement un sérum a donné une réaction face à l'antigène Nt CENPI sans être AAC positif d'après les résultats de l'IF et sans présenter aucune réactivité face à l'antigène Nt CENPB. La figure 19 montre les résultats du western blot des sérums qui présentent une réactivité face aux protéines Nt CENPB, et Nt CENPI y compris divers sérums négatifs. Ces résultats démontrent pour la première fois le caractère autoantigénique de la protéine centromérique CENPI.

Vu l'intérêt de nos résultats du western blots nous avons réalisé une révision de l'histoire clinique des patients présentant une réaction positive face à la protéine Nt CENPI. Le tableau 16 résume les caractéristiques cliniques de ces patients. Les données cliniques montrent que 5 des 8 sérums de patients CENPI positifs souffrent d'une sclérodémie limitée, un seul patient souffre d'une sclérodémie diffuse, un autre patient présente une sclérodémie couplée à une arthrite rhumatoïde et un patient présente une UCTD. Six patients des 8 qui sont Nt CENPI positifs produisent d'autres auto-anticorps caractéristiques de certaines maladies auto-immunes du foie. Dans cinq cas les auto anticorps rencontrés étaient spécifiques de la cirrhose biliaire primaire (CBP), comme les anticorps de type AMA M2, anti-gp210/ nuclear pore complex Ab et anti-sp100 Ab. Deux de ces cinq patients ont été diagnostiqués comme malades souffrant d'une CBP.

#### **IV- 3 Identification de possibles épitopes auto-immuns chez des patients avec sclérodémie présentant une réaction face à la protéine CENPI**

Afin de pouvoir caractériser la réactivité d'autres régions de la protéine CENPI, et après l'obtention d'une telle immunoréactivité de 8 sérums de patients face à la protéine Nt CENPI, nous avons essayé d'évaluer l'immunoréactivité de ces sérums face à trois parties de la protéine CENPI : Nt CENPI, Int CENP et Ct CENPI.



**Figure 19. Western Blot des sérums humains avec maladies auto-immunes face aux protéines centromériques recombinantes Nt CENPB et Nt CENPI.** Les images montrent les westerns blots des sérums de patients étudiés. La lettre P est une référence pour identifier chaque patient. Dans les pistes 1 et 2 on montre la réactivité face à un extrait de corps d'inclusion des protéines Nt CENPB et Nt CENPI respectivement. P6, P13, P16, P52, P54, P58, P65 sont des sérums de patients souffrant d'une sclérodémie, qui présentent une réaction positive face à Nt CENPB et une réaction négative face à Nt CENPI. P1, P2, P5, P7, P14, P30, P31 et P69 sont des sérums de patients sclérodermiques qui présentent une réaction positive aussi bien face à la protéine centromérique Nt CENPI que face à la protéine Nt CENPB. P11, P62, P67 sont des sérums de patients lupiques qui ne présentent pas de réactivité face à aucune des deux protéines centromériques étudiées. MW présente des marqueurs de poids moléculaire du haut vers le bas 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 11 kDa.

**Tableau 16.** Résumé des données cliniques et immunologiques du groupe de patients CENPI positifs.

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P5</b>	<b>P7</b>	<b>P14</b>	<b>P30</b>	<b>P31</b>	<b>P69</b>
<b>Âge /sexe</b>	76/F	75/F	51/F	40/F	51/F	74/F	36/F	64/F
<b>Diagnostic</b>	CREST	SSc+ RA	CREST	CREST	CREST	CREST	SSc	UCTD
<b>Durée de la maladie (années)</b>	30	10	6	2	10	18	4	11
<b>Aspect de ANA trouvé par IF</b>	AAC	AAC AMA	AAC AMA	AAC	AAC NE	AAC AMA	SN	AAC AMA
<b>Types des ANA</b>	CENP-B	CENP-B sp100	CENP-B	CENP-B SSA-52	CENP-B SSA-52 gp210	CENP-B	PMscl	CENP-B
<b>Anticorps liés aux MHAI</b>	N	AMA M2 sp100	AMA M2	ASMA SSA-52	SSA-52 gp210	AMA M2	N	AMA M2
<b>MHAI</b>	N	N	N	N	N	CBP	N	CBP

**AAC** : Anticorps anti-centromère. **MHAI** : Maladie Hépatique Auto-Immune. MAI: Maladie Auto-Immune. **AMA** : Anticorps antimitochondriales. **AMA M2**: Anticorps antimitochondrie Type 2. **AAN**: anticorps antinucléaires. **ASMA**: Anticorps anti-cellules musculaires lisses. **CREST**: Calcinose, phénomène de Raynaud, dysfonctionnement œsophagien, sclérodactylie et la tégangiectasie. **N**: négatif. **NE**: Enveloppe nucléaire. **P**: positif. **CBP**: La Cirrhose Biliaire Primitive. **PmScl**: antigène polimyositis-sclérodémie. **SSc**: Sclérodémie systémique sous forme limitée. **SSC + RA**: la sclérodémie / polyarthrite rhumatoïde syndrome de chevauchement. **SN**: moucheté et nucléolaire. **UCTD**: maladies indifférenciée du tissu conjonctif. Les patients ont été désignés de manière anonyme par des nombres (P).

Deux sérums ont réagi positivement face à la partie Int CENPI et Nt CENPI. Un sérum reconnaît la protéine CENPI toute entière et un autre sérum a aussi réagi face à la partie Ct CENPI et Nt CENPI. La figure 20 présente les résultats obtenus par la technique du western blot.

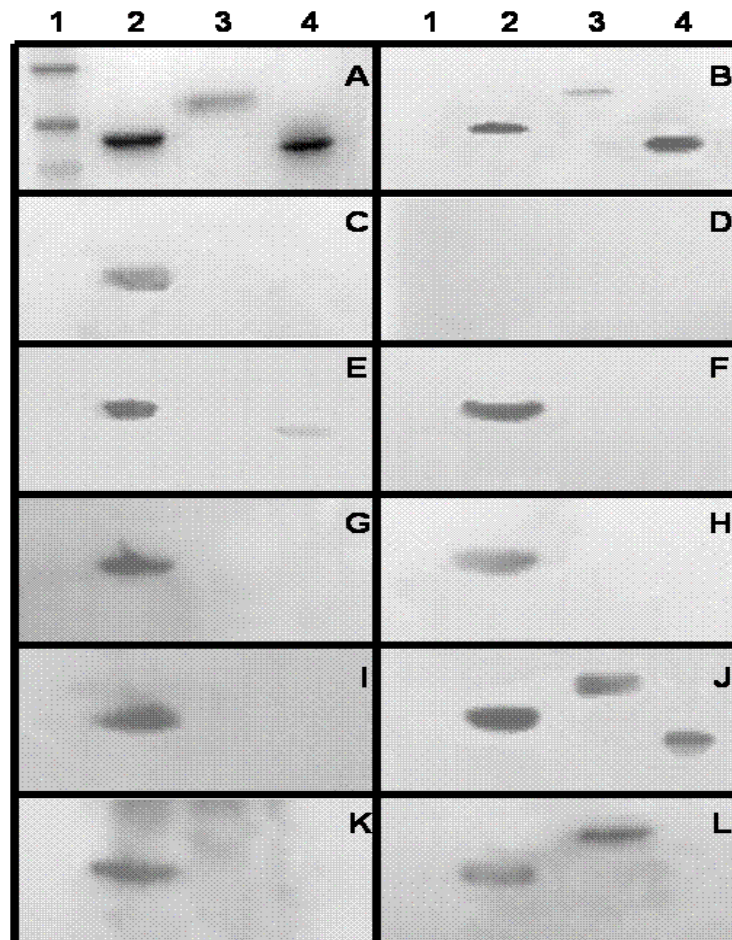
#### **IV-4 Analyse par western blot de la réponse auto-immune des sérums de patients souffrant des hépatopathies face aux antigènes Nt CENPB et Nt CENPI**

Les résultats détaillés dans le paragraphe IV-2 montrent que 8 sérums de patients avec sclérodermie ont donné une réaction positive face à la protéine Nt CENPI et en même temps présentent des anticorps caractéristiques des hépatopathies. Deux de ces 8 sérums positifs ont été diagnostiqués comme des sérums de patients souffrant d'une CBP. Sur la base de ces résultats nous avons eu l'idée d'étudier la réaction des sérums avec des hépatopathies face aux deux protéines Nt CENPB et Nt CENPI.

Notre étude initiale s'est limitée à 22 sérums de patients souffrant de différentes maladies auto-immunes y compris la PBC. Ces sérums ont été d'abord analysés par IF et seulement 6 cas ont donné un signal positif face au centromère, le tableau 17 résume les résultats obtenus par IF. Les six sérums humains de patients avec signal centromérique ont été diagnostiqués comme des sérums de patients souffrant d'hépatopathie. Ces sérums ont été ensuite analysés par la technique du western blot et ont tous donné des réactions positives face à la protéine Nt CENPB et cinq d'entre eux ont donné une réaction positive face aux deux protéines Nt CENPN et Nt CENPI (figure 21).

#### **VI-5 Hétérogénéité de la réponse auto-immune anti centromère dans des sérums de patients sclérodermiques**

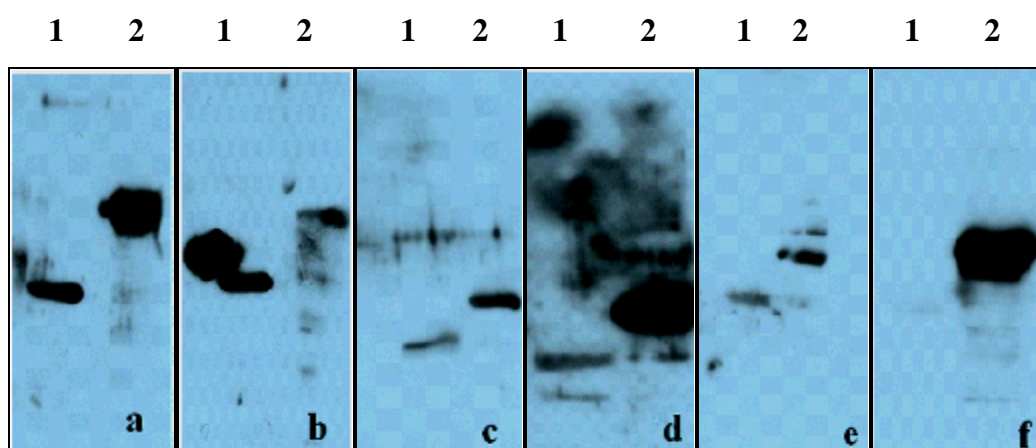
Après l'identification de la protéine CENPI comme nouveau autoantigène centromérique et dans le but d'évaluer d'autres possibles réactivités de sérums ACA humains face aux autres protéines centromériques recombinantes, nous avons utilisés les protéines centromériques exprimées et purifiées CENPH, CENPK, CENPM et



**Figure 20.** Analyse par western blot de différents épitopes auto-immuns de la protéine centromérique CENPI. En A on montre la coloration au bleu de Coomassie d'un gel SDS PAGE contenant les 3 domaines de la protéine CENPI exprimée. Dans la piste 1 on montre les marqueurs de poids moléculaire. Dans la piste 2 on montre la protéine Nt CENPI, dans la piste 3 la protéine Int CENPI et dans la piste 4 la protéine Ct CENPI. En B on montre la réaction de l'anticorps anti Histidine qui reconnaît les trois domaines de la protéine exprimée. Les blots C, G, H, I, K présentent seulement les sérums Nt CENPI positifs. Le blot E représente un sérum positif Nt CENPI et Ct CENPI. Le blot L présente un sérum positif Nt CENPI et Int CENPI. Le blot J représente un sérum qui donne une réaction positive face aux Nt CENPI, Int CEMPI et Ct CENPI.

**Tableau 17.** Résumé des différents profils de fluorescences obtenus.

Aspect de fluorescence obtenu	Nombre de cas obtenu
Centromérique	6
Membrane nucléaire	6
Nucléaire	2
Point nucléolaire	5
Cytoplasmique	3
Négatif	1



**Figure 21.** Résultats des analyses obtenues par la technique du western blot face aux protéines Nt CENPB et Nt CENPI des sérums humains de patients avec **hépatopathies**. Dans la piste 1 on montre la réaction face à la protéine Nt CENPI et dans la piste 2 on montre la réaction face à la protéine Nt CENPB. Les sérums a, b, c, d, e donnent des réactions positives face aux deux protéines centromériques, tandis que le sérum f génère une réaction positive seulement face à la protéine Nt CENPB.



CENPP comme auto antigènes. Les résultats de la figure 22 montrent que 4 sérums ont généré une réaction face aux antigènes CENPH et CENPK. Un sérum a réagi seulement face à la protéine CENPH. Cinq autres sérums ont donné une réaction positive face à la protéine CENPM et un sérum seulement a donné une réaction positive face à la protéine CENPP. Nous avons aussi identifié un sérum qui a donné une réaction positive face aux 4 protéines.

## **V- Développement d'un système d'array pour l'identification des autoantigènes centromériques dans le cas de la sclérodermie**

Les microarrays à protéines consistent en des puces de protéines immobilisées dans une position déterminée sur une surface solide pour une identification ultérieure par différents systèmes. Son utilisation permet l'analyse et la caractérisation de plusieurs types de réactions parmi elles la réaction antigène- anticorps.

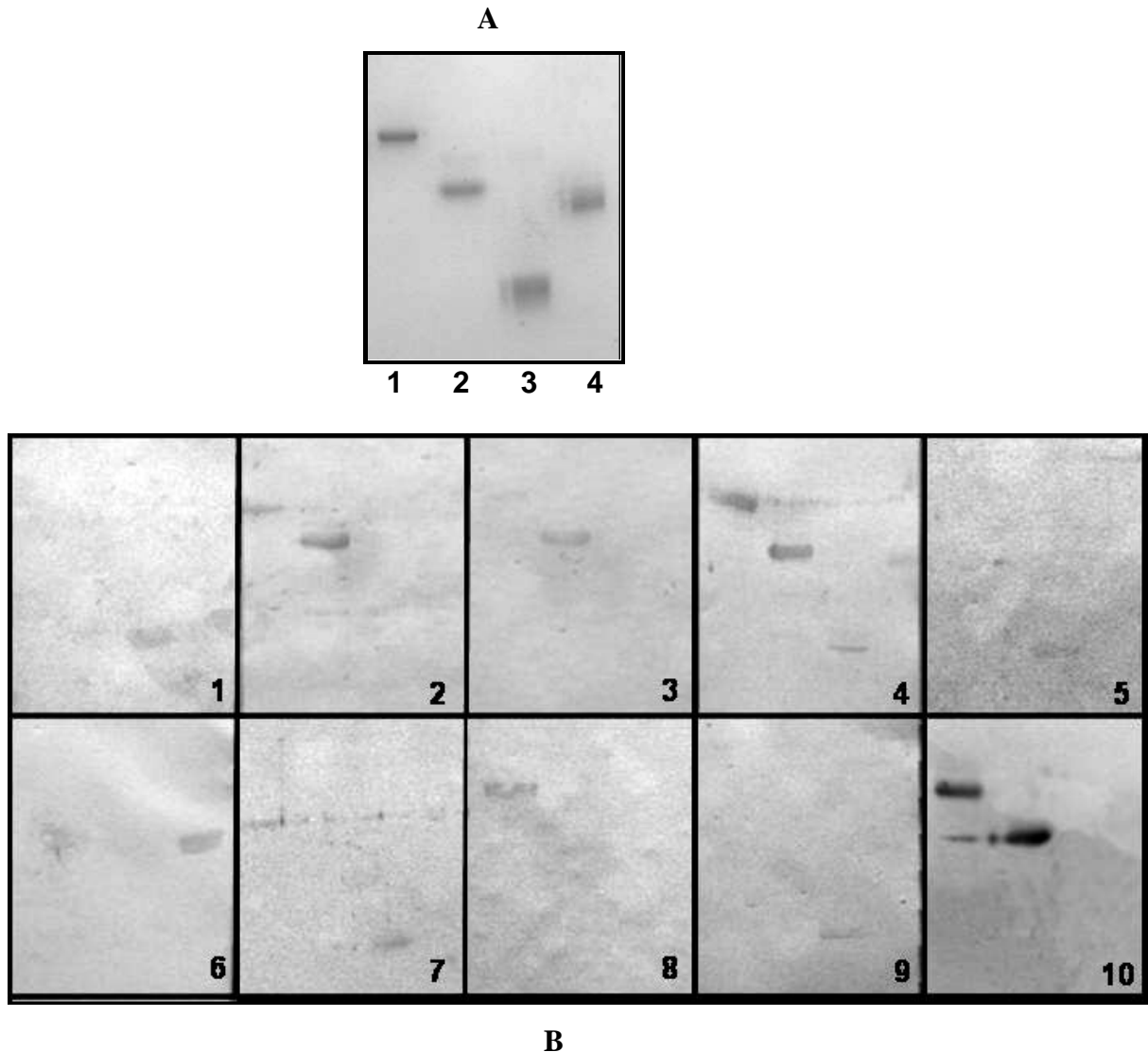
Un des objectifs majeur de cette thèse doctorale est d'entamer le développement de la technique de puce à auto-antigènes centromériques pour le diagnostic de patients sclérodermiques à partir de sérums humains.

### **V-1 Quantification des antigènes CENPs purifiés**

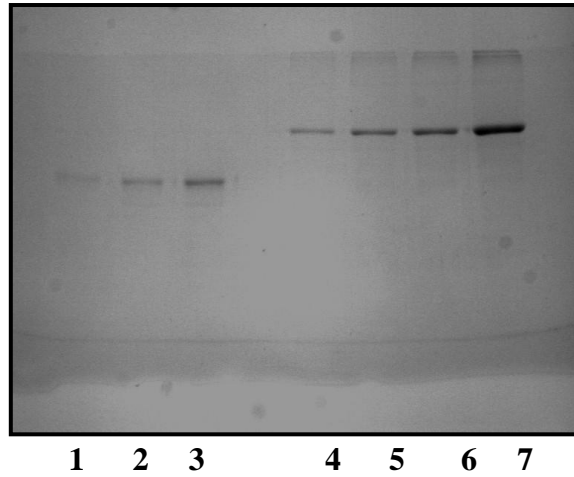
Pour son utilisation comme antigène dans les arrays, la protéine Nt CENPB exprimée et purifiée a été quantifiée à partir de son analyse dans un gel de polyacrylamide (Figure 23). A cet effet, on dépose dans le gel de polyacrylamide trois quantités différentes de la protéine Nt CENPB en présence de 4 concentrations connues de l'albumine à (1 mg/ml). Une fois le gel est coloré avec le bleu de Coomassie, nous avons réalisé la quantification par le programme informatique GeneTools de SynGene. La concentration approximative de la protéine Nt CENPB est d'environ 250 ng/mL.

### **V-2 Essais initiaux**

Pour monter cette puce, le support utilisé pendant tout ce travail, est une plaque "FAST Slide" de nitrocellulose (Whatman®). Les supports poreux comme les membranes de nitrocellulose, de nylon ou de fluorure de polyvinyle sont plus adéquats



**Figure 22. Résultats des essais utilisant la technique de Western blot pour étudier la réaction des sérums humains avec sclérodémie face aux protéines CENPH, CENPK, CENM, CENPP.** En **A** on montre la coloration avec le bleu de Coomassie d'un gel de polyacrylamide avec les protéines recombinantes purifiées. La piste 1 correspond à la protéine CENPH; La piste 2 correspond à la protéine CENPK; La piste 3 correspond à la protéine CENPM; La piste 4 correspond à la protéine CENPP. En **B** les protéines sont déposées selon le même ordre présenté en **A** et les sérums qui donnent une réaction positive face à ces protéines centromériques sont désignés par les chiffres allant de 1 à 10. Les sérums indiqués avec les numéros 1, 5, 7 et 9 donnent une réaction positive face à la protéine CENPM. Les sérums 2, 3 et 10 donnent une réaction face aux protéines CENPH et CENPK. Le sérum numéro 4 donne une réaction face aux 4 protéines. Le sérum 6 donne une réaction seulement face à la protéine CENPP.



**Figure 23. Quantification de la protéine Nt CENPB par coloration du gel au bleu de Coomassie.** Dans les pistes 1, 2 et 3 on dépose 2, 5 et 10  $\mu$ l de la protéine CENPB. Les pistes 4, 5, 6, 7 correspondent aux différentes quantités de la protéine BSA 1mg/ml (1 $\mu$ l, 2 $\mu$ l, 4 $\mu$ l et 8 $\mu$ l). Les bandes une fois colorées, on déduit la concentration grâce au programme informatique GeneTools de SynGene. La concentration approximative la protéine Nt CENPB est de 250ng/ml.

que les supports lisses, puisqu'ils possèdent une grande surface et par conséquent une forte capacité d'union. La puce que nous avons utilisé est compatible avec les différentes méthodes de détection de la réaction antigène- anticorps. Lors des premiers essais, les puces ont été révélées par des méthodes de détection de signal usuelles comme le chloronaftol, diaminobenzedine et la chimioluminescence (ECL). Cette dernière possède en général une résolution plus faible que la détection par fluorescence. Comme on peut l'observer dans la figure 24 les trois méthodes de développement, servent pour l'identification de la réaction anticorps-antigène. L'incubation de la puce contenant l'antigène Nt CENPB face au sérum spécifique anti Nt CENPB a donné un signal positif correspondant à la réaction de l'antigène immobilisé dans la surface de la puce face à ce sérum.

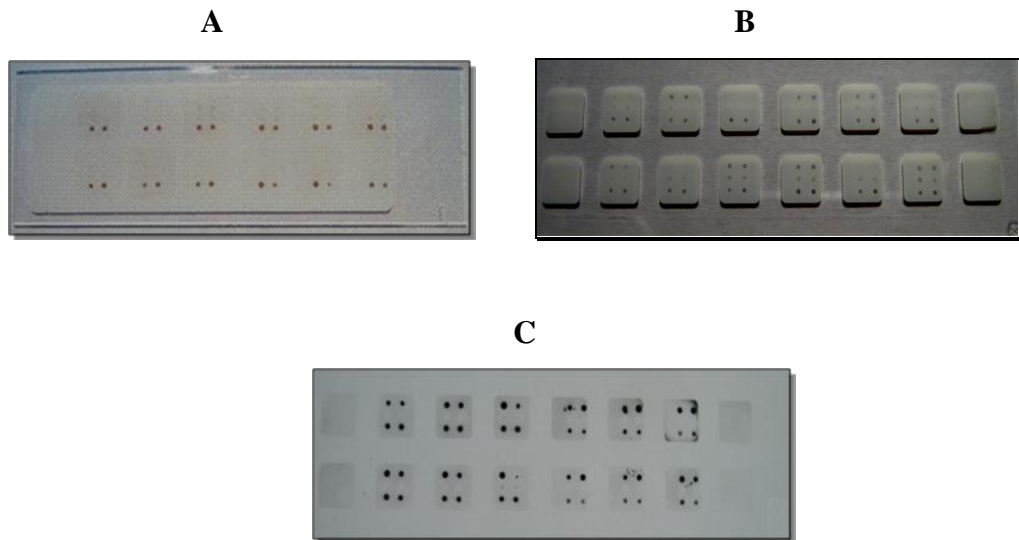
### **V-3 Validation de la méthode**

Pour mettre au point la technique d'array pour la détection des anticorps anti centromères dans des sérums humains de patients avec sclérodermie nous avons réalisés plusieurs tests de sensibilité, de reproductibilité et de spécificité. Le développement et la détection de la réaction anticorps antigène a été fait par fluorescence. Avec cette méthode les molécules fluorescentes (fluorochromes) absorbent des photons de lumière provenant d'une source externe, généralement un laser monochromatique, ce qui provoque l'excitation des électrons de la molécule et une émission postérieure de la lumière dans une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière incidente.

#### **V-3-1 Sensibilité et reproductibilité**

La sensibilité et la reproductibilité sont deux critères de validité d'une méthode d'analyse qu'il faut évaluer pour bien développer une puce à auto antigènes.

La reproductibilité de la méthode permet de comparer le niveau de similitude ou d'identité entre les résultats obtenus de manière indépendante et sous différentes conditions (par exemple changer de manipulateur entre puce et une autre). Pour ceci nous avons déposé le même antigène Nt CENPB 4 fois sur le même carré de nitrocellulose.



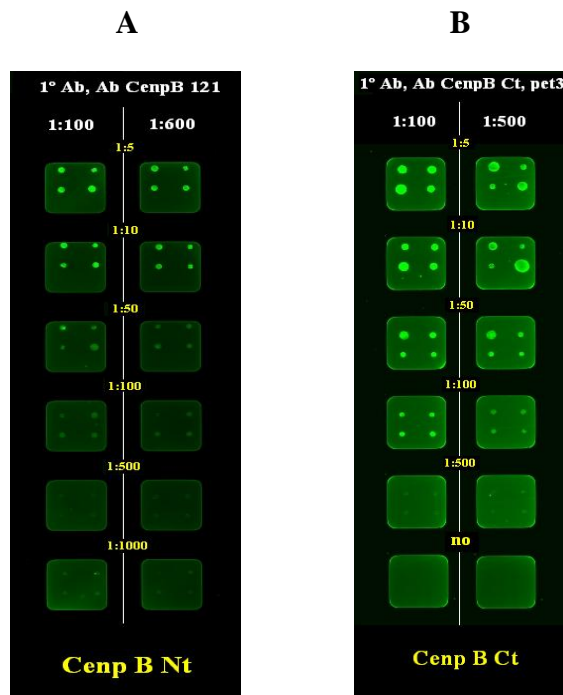
**Figure 24. Premiers essais de développement d'une puce à autoantigène centromérique Nt CENPB.** La figure montre les résultats obtenus après incubation des puces contenant la protéine Nt CENPB immobilisée face au sérum spécifique anti Nt CENPB. En **A** on montre le résultat de la détection du signal avec la diaminobenzidine. En **B** par le chloronaphtol et en **C** par la chimioluminescence (ECL). Sur la puce **A**, on dépose l'antigène en double, sur la **B** en triple et sur la **C** quatre fois. Sur chaque puce on laisse 2 carrés libres sans dépôt de l'antigène pour évaluer le bruit de fond généré par la puce selon chaque méthode de révélation.

Nous avons aussi étudié un autre paramètre qui est la sensibilité de la méthode. Cette dernière traduit la variation de la réponse de la technique face à la variation de la concentration de l'antigène déposé. Pour évaluer la sensibilité de notre array, différentes dilutions de l'antigène ont été testées pour voir l'influence de la concentration de l'antigène dans nos expériences, et évaluer la linéarité de la puce. L'autoantigène Nt CENPB a été testé à plusieurs et différentes dilutions, à 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 et 1:1000. Le sérum spécifique anti Nt CENPB a été testé à 1:100 et 1:500. La même procédure a été suivie avec l'antigène Ct CENPB, sauf que le sérum spécifique anti Ct CENPB a été testé à deux dilutions 1:100 et 1:600.

Pour mener à bien notre expérience, après immobilisation des protéines, la puce est incubée avec une solution de saturation qui doit contenir des molécules à activité fluorescente inhérente. La saturation a été faite dans tous les essais comme déjà décrit dans le paragraphe VI-3 du chapitre matériel et méthodes, durant toute la nuit à 4°C avec un tampon qui contient du sérum fœtal bovin et du PBS 1X. Le lavage a été fait avec un tampon qui contient du NaCl 1.5M et du Triton 1X. Dans la figure 25 on montre les résultats obtenus après la lecture avec un scanner à fluorescence. La fluorescence émise est due à l'union d'un deuxième anticorps marqué avec Cy3 au sérum spécifique uni à l'antigène. L'intensité du signal généré suite à la réaction entre l'antigène Nt CENPB et le sérum spécifique anti CENPB est répétée quand il s'agit de la même concentration de l'antigène. Ces résultats nous permettent de déduire le caractère productible de notre puce. On observe aussi, que le signal obtenu diminue en parallèle avec la diminution de la concentration de la protéine immobilisée et avec la dilution du sérum. Cette diminution traduit le caractère linéaire de notre array.

### **V-3-2 Spécificité**

Après avoir obtenus les paramètres de sensibilité et de reproductibilité de la technique, plusieurs essais ont été réalisés afin d'évaluer la spécificité de l'array. Le système 'Fast Slide' est conçu pour obtenir une haute spécificité et éviter à un certain niveau la présence de faux positifs. Un des objectifs de notre travail est d'obtenir une puce qui génère des réactions spécifiques entre les antigènes immobilisés et les



**Figure 25.** Essais pour évaluer la sensibilité et la reproductibilité d'une puce à antigène CENPB. En **A** on dépose la protéine Nt CENPB 4 fois sur chaque carrée de nitrocellulose pour évaluer la reproductibilité de la technique. La protéine Nt CENPB est utilisée diluée à 1:5 et à 1:1000 et chaque colonne est incubée face au sérum anti Nt CENPB dilué à 1:100 et 1:600 pour évaluer la sensibilité. En **B** on dépose la protéine Ct CENPB diluée à 1:5 et à 1:500, chaque colonne cette fois ci est incubée face au sérum anti Ct CENPB dilué à 1:100 et 1:500 pour évaluer la reproductibilité. L'antigène Ct CENPB est dilué à 1:5 et à 1:500 et chaque colonne est incubée avec le sérum anti CENPB Ct à 1:100 et 1:500.

anticorps présents dans les sérums. Pour cela nous avons utilisé les 3 antigènes Nt CENPB, Ct CENPB et Nt CENPI sur la même puce.

Nous avons quantifié la protéine Nt CENPI selon le même protocole décrit dans le paragraphe V-1, nous avons obtenu une concentration approximative de 425ng/ml (figure 26).

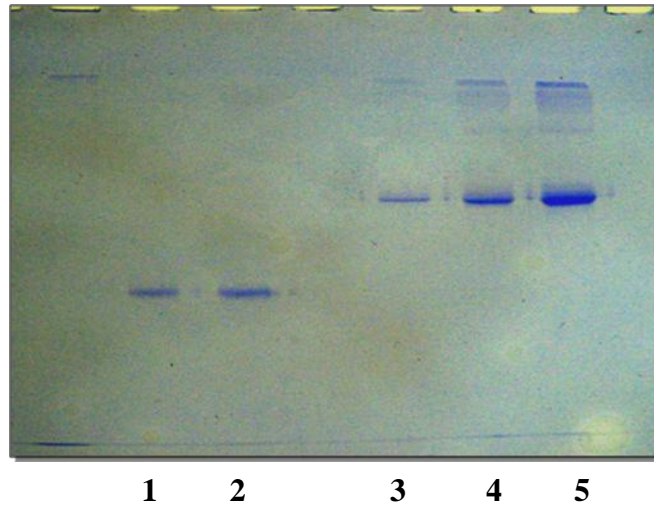
Nous avons effectué les mêmes essais que ceux décrits dans le paragraphe antérieur pour évaluer la sensibilité et la reproductibilité de notre array, en immobilisant cette fois ci la protéine Nt CENPI. Nous avons testé cet antigène dilué à 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 et 1:1000 et le sérum spécifique anti Nt CENPI a été testé avec deux dilutions 1:100 et 1:600. La figure 27 montre les résultats obtenus après la lecture avec un scanner de fluorescence. Nous observons que le signal obtenu diminue en parallèle avec la diminution de la concentration de la protéine immobilisée et avec la dilution du sérum.

Après avoir obtenu les résultats des essais spécifiques à chaque protéine, nous avons procédé à évaluer la spécificité de cette puce face aux trois antigènes. Pour cela nous avons déposé les 3 protéines centromériques Nt CENPB, Ct CENPB et Nt CENPI en présence de l'albumine sur chaque carré de la puce qui par la suite a été incubée face à un anticorps spécifique. Pour pouvoir évaluer la spécificité de notre array, le support FAST SLIDE doit donner un bruit de fond bas, une non spécificité minimale, une auto fluorescence basse et une bonne morphologie des spots ou des points générés. Les résultats de la figure 28 montrent, que l'incubation de chaque carré contenant les antigènes face à son anticorps spécifique génère un signal unique et spécifique qui correspond à la réaction de cet antigène et son anticorps spécifique.

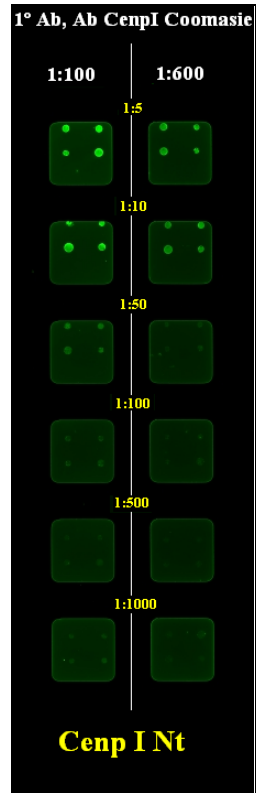
Les deux premières pistes désignées par la lettre A présentent la réaction due seulement à l'union entre l'antigène Ct CENPB face au sérum anti Ct CENPB. En B on présente la réaction qui résulte seulement de l'union entre l'antigène Nt CENPI face au sérum anti Nt CENPI, et dans les deux dernières pistes 'C' on montre le résultat de la réaction de l'antigène Nt CENPB face au sérum anti Nt CENPB.

Durant nos expériences, vu la nature des anticorps utilisés qui présentent une haute affinité face à chaque antigène, nous n'avons pas rencontré de problèmes de cross réactivité.

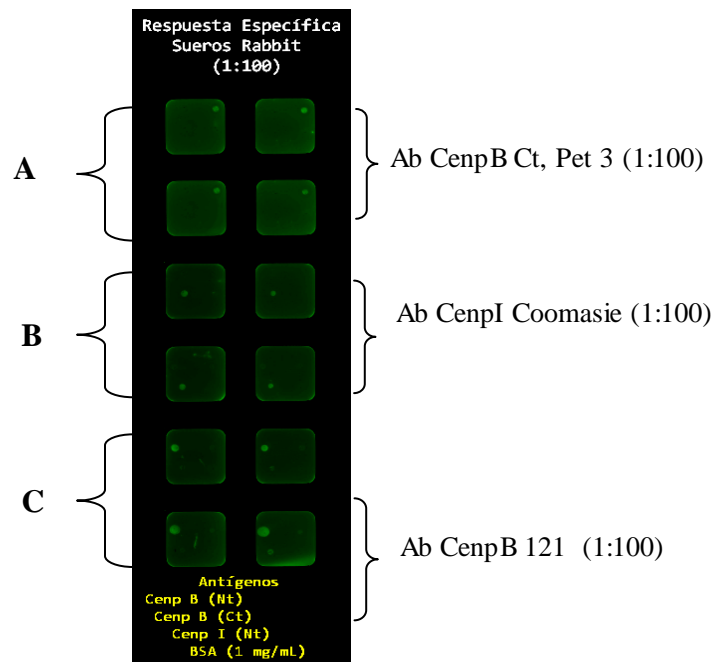




**Figure 26. Quantification de la protéine Nt CENPI par coloration au bleu de Coomassie dans un gel SDS PAGE.** Dans les pistes 1 et 2 on dépose 2 $\mu$ l et 5 $\mu$ l de la protéine Nt CENPI. Les pistes 3, 4, 5, correspondent à la protéine BSA 1 mg/ml (1 $\mu$ l, 2 $\mu$ l, 4 $\mu$ l). Les bandes une fois colorés ont été quantifié grâce au programme informatique GeneTools de SynGene. La concentration approximative de la protéine Nt CENPI est de 425ng/ml.



**Figure 27.** Essai pour évaluer la sensibilité et la reproductibilité de la puce en utilisant la protéine Nt CENPI. Nous avons évalué la réaction de la protéine diluée de 1 :5 à 1 :500 face au sérum anti Nt CENPI spécifique diluée pour chaque colonne à 1:100 et 1:600.

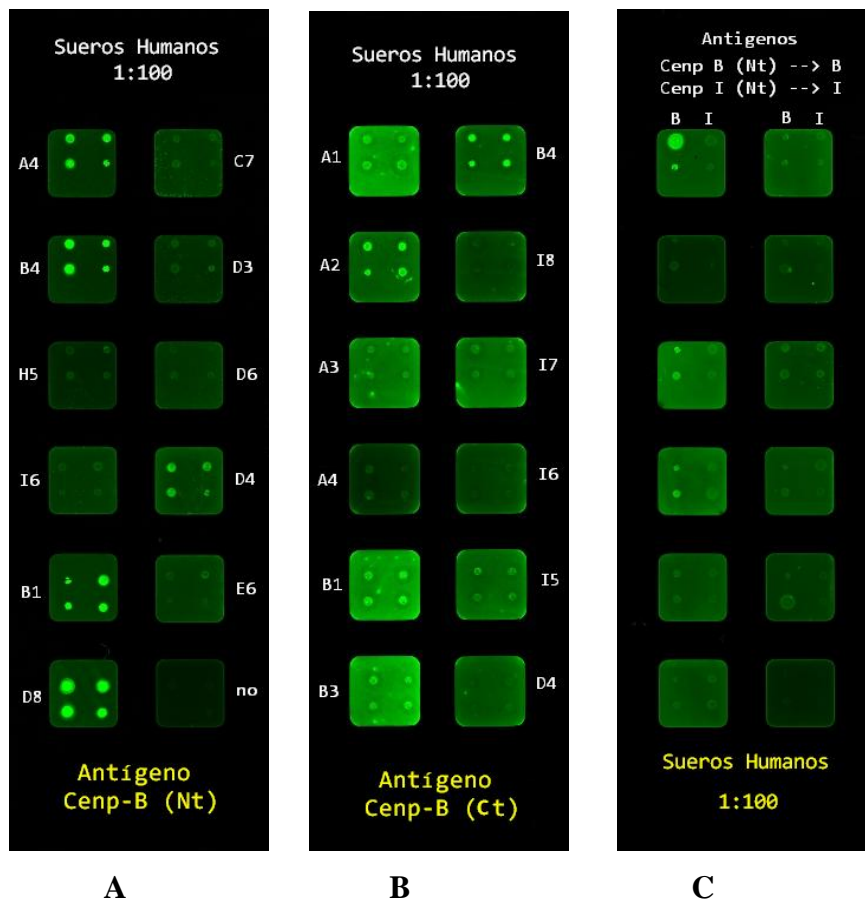


**Figure 28. Essais de spécificité et de reproductibilité de la puce à antigènes centromériques.** Sur chaque carrée nous avons déposé les 3 protéines centromériques Nt CENPB, Ct CENPB, Nt CENPI en présence de l'albumine. L'ensemble des carrés désignés par la lettre A est incubée avec un sérum spécifique Ab Ct CnpB dilué au 1:100, et génère une réaction seulement face à la protéine Ct CENPB. La lettre B désigne l'ensemble des carrés incubés face au sérum spécifique Nt CENPI dilué au 1:100 et qui génère une réaction seulement face à la protéine Nt CENPI. En C on montre la réaction spécifique du sérum anti CENPB 121 dilué au 1 :100, seulement face à la protéine Nt CENPB.

#### **V-4 Caractérisation de la réponse auto-immune des sérums sclérodermiques en utilisant un array à auto-antigènes centromériques**

Après la série initiale d'expériences antérieures de mise au point des puces à autoantigènes centromériques, nous avons réalisé une étude concernant les patients atteints de maladies auto-immunes face aux protéines centromériques immobilisées sur la puce. Dans les premiers essais nous avons étudié la capacité de notre puce à détecter la présence des anticorps anti Nt CENPB chez ces patients, en fixant sur la puce en quatre fois la protéine purifiée Nt CENPB. Parmi les 81 sérums humains étudiés, seulement 27 ont été des sérums anti-centromériques dont 22 ont été identifiés Nt CENPB positifs. Un exemple de quelques cas obtenus est présenté dans la figure 29 A. Dans le but de compléter notre étude, nous avons analysé la réponse auto-immune face à la partie carboxyl-terminal de la protéine centromérique CENPB. Nous avons utilisé cette fois-ci comme antigène la protéine recombinante purifiée Ct CENPB. Les résultats ont indiqué la présence de 13 cas de sérums avec des anticorps anti Ct CENPB parmi les 27 sérums qui sont anti centromères. Nous avons aussi obtenu 7 cas douteux qui à partir de la puce, semble générer un signal face à la protéine Ct CENPB, ces sérums sont qualifiés de faux positifs. Ces sérums coïncident avec des patients atteints de maladies auto-immunes sans qu'ils soient à l'origine d'un signal centromérique et ne présentent aucune réaction face à la protéine Nt CENPB.

Finalement nous avons réalisé des essais pour étudier la présence des anticorps anti Nt CENPB et anti Nt CENPI, en déposant en double, dans le même carré, les deux protéines centromériques purifiées Nt CENPB et Nt CENPI. Nous avons analysé les 8 sérums qui ont donné par western Blot un signal positif face à la protéine Nt CENPI. Cette étape nous a permis de confirmer que les huit sérums présentant un signal positif face à la protéine Nt CENPI par la technique de western blot sont aussi identifiés comme tels par la technique de puces à antigènes que nous avons développé (Figure 29 C).



**Figure 29. Etude des sérums humains avec maladies auto-immunes par une puce à auto-antigènes CENPB et CENPI.** Dans la puce A nous avons déposé en quatre exemplaires l'antigène Nt CENPB et dans la puce B nous avons déposé l'antigène Nt CENPI. Dans la puce C nous avons déposé sur le même carré les deux antigènes Nt CENPB et Nt CENPI. Les lettres A1 jusqu' à I7 indiquent les sérums humains avec des maladies auto-immunes. En A on montre le résultat de la réaction des sérums humains face à la protéine Nt CENPB. En B on montre la réaction face à la protéine Ct CENPB et en C on montre la réaction des sérums auto-immunes avec sclérodémie qui présentent la réactivité face aux deux protéines Nt CENPB et Nt CENPI.

Discussion

## **I-Identification et caractérisation du CENPI comme un nouveau autoantigène dans les sérums humains des patients sclérodermiques**

La sclérodermie est une maladie auto-immune humaine dont l'étiologie demeure inconnue. Elle est caractérisée par un processus de fibrose évolutif et par des lésions vasculaires des capillaires principalement des lésions artérielles.

La physiopathologie de cette maladie est très complexe et pour cela elle présente un très vaste champ pour la recherche. Elle implique plusieurs anomalies immunologiques, parmi elles une dérégulation de la réponse immunologique cellulaire comme l'activation des lymphocytes T et la sécrétion des cytokines, ainsi que d'autres changements au niveau de la réponse humorale responsable de l'activation des lymphocytes B avec une production des autoanticorps .

L'apparition des autoanticorps dans diverses maladies présente un outil de grande utilité pour le diagnostic clinique. Ainsi les anticorps anti-nucléaires (AAN) sont une clef pour le diagnostic différentiel des maladies auto-immunes. Les AAN sont présents chez plus de 90% des sérums de patients atteints d'une sclérodermie. Ils sont dirigés contre une vaste variété des autoantigènesy compris les protéines centromériques produisant ainsi des autoanticorps anticentromère (AAC). Pour cela les AAC sont considérés comme marqueurs pour le diagnostic de certaines maladies. Ces anticorps anticentromère sont dirigés contre certaines protéines constitutives du centromère des chromosomes. De nos jours, plus de 80 protéines centromériques ont été identifiées et caractérisées mais peu d'entre elles ont été décrites comme autoantigènes dans certaines maladies (Marinela Perpelescu et Tatsuo Fukagawa, 2011).

Les AAC qui sont présents chez 80 à 96% des patients atteints d'une sclérodermie limitée, sont aussi considérés comme marqueurs biologiques du CREST. Les initiales CREST désignent cinq symptômes souvent présents dans la forme limitée de la sclérodermie qui sont la Calcinose, le phénomène de Raynaud, le dysfonctionnement oEsophagien, la Sclérodactylie et la Télangiectasie. Ces cinq signes ne sont pas forcément tous présents ensemble. La calcinose se caractérise par la formation de petits dépôts de calcium blanchâtres (dépôts calciques) sous la peau. On les trouve le plus souvent au niveau des doigts, des coudes et des genoux, mais ils peuvent apparaître sur n'importe quelle partie du corps. Les dépôts calciques peuvent

être source d'inflammation, rendant la zone concernée enflée, rouge et douloureuse. Dans certains cas ces dépôts s'infectent, notamment lorsqu'ils percent la peau causant ainsi un ulcère persistant. La deuxième lettre indique le phénomène de Raynaud, qui apparaît souvent plusieurs années avant les autres symptômes. Le dysfonctionnement œsophagien survient lorsque la sclérodermie affecte l'œsophage en altérant le fonctionnement de ces muscles, provoquant des difficultés et une gêne à avaler, parfois douloureuse (dysphagie). L'altération des muscles de l'œsophage provoque également un reflux gastro-œsophagien, c'est-à-dire le retour dans l'œsophage du contenu acide de l'estomac, qui entraîne, après les repas, des brûlures avec parfois des régurgitations acides. La sclérodactylie ou durcissement de la peau, dans le cas d'une sclérodermie limitée n'affecte que la peau des mains et ce des orteils et parfois du visage et du cou. Les télangiectasies sont des dilatations de certains petits vaisseaux sanguins, se traduisant par de fines lignes (ou taches) rouges, parfois violettes. La télangiectasie comme symptôme de la sclérodermie limitée affecte le plus souvent les mains, le visage et les lèvres.

Les AAC peuvent être associés à certains signes cliniques comme l'ischémie digitale, la calcinose, les arthralgies, le syndrome de Raynaud et les télangiectasies. En 1980 Moroi et al ont identifié pour la première fois des sérums AAC chez des patients sclérodermiques. Leur intérêt réside surtout dans leur caractère prédictif pour cette maladie et pour d'autres qui y sont en relation comme le phénomène de Raynaud.

Les AAC sont présents dans plus de 90% des patients avec sclérodermie limitée. En 1986 Earnshaw et al ont démontré chez ces patients que les anticorps anti-centromère présentent une réaction principalement face aux protéines CENPA, CENPB et CENPC et que tous les sérums AAC positifs par IF présentent des anticorps anti-CENPB. La protéine CENPB présente l'antigène le plus représenté chez les patients AAC positifs, étant que l'anticorps anti CENPB est présent chez plus de 95% des sérums des patients souffrant d'une sclérodermie.

Le dépistage des AAC au niveau des sérums de patients est souvent réalisé de manière courante, pour la première fois, par la technique d'IF sur des cellules humaines Hep2. L'aspect obtenu permet de renseigner sur la localisation cellulaire de l'autoantigène impliqué. Toutefois, l'identification et la caractérisation de ce dernier requiert l'utilisation d'autres techniques de diagnostic tel que Elisa et immunoblot. La

Première tentative d'utilisation de la technique Elisa pour la protéine CENPB, a été développée par Rothfield et al en 1992, en utilisant la protéine recombinante CENPB.



Actuellement, des essais spécifiques de type Elisa, immunoblot et différents kits de diagnostic sont commercialisés pour le diagnostic en utilisant principalement les protéines recombinantes CENPB et CENPA comme antigènes.

Ces données en plus, de l'état d'avancement de la biochimie des protéines centromériques, nous ont poussés à étudier la réponse auto-immune face à la protéine centromérique humaine CENPI chez des patients avec sclérodémie. Nous avons commencé notre travail expérimental par l'expression et la purification du domaine amino-terminal de la protéine CENPI (Nt CENPI), en étendant postérieurement l'analyse au domaine intermédiaire (M CENPI) et au domaine carboxyl-terminal (Ct CENPI) de cette dernière. Le processus d'expression de la protéine à grand échelle, ainsi que sa purification ont nécessité le développement et la mise au point de différentes techniques qui permettent d'obtenir une protéine recombinante pure à une concentration acceptable (Grassegger A et al, 2008).

Les résultats des essais initiaux effectués par la technique du western blot en utilisant la protéine CENPB, ont indiqué que 26 sérums AAC positifs présentent une réaction face à la protéine CENPB. A son tour, en utilisant la technique western blot, nous avons identifié parmi 31 sérums analysés de patients souffrant d'une sclérodémie ou d'un UCTD, 8 sérums présentant pour la première fois une réaction positive face à la protéine centromérique Nt-CENPI. La détection par western blot du signal résultant de la réaction des sérums face aux protéines CENPB et CENPI, a été effectuée par la méthode ECL (Enhanced chemiluminescence), technique très sensible qui permet la détection des quantités infimes de protéines. Ces résultats nous permettent de conclure qu'outre les protéines CENPA, CENPB et CENPC, caractérisés préalablement comme autoanticorps anticentromère, la protéine CENPI est aussi cible des autoanticorps durant une réponse auto-immune chez des patients présentant une sclérodémie.

La protéine CENPI a été identifiée pour la première fois en 2001 par le groupe du professeur Fugakawa qui a démontré que cette protéine est localisée au niveau du centromère, avec les deux protéines CENPC et CENPH, durant le cycle cellulaire. Il a été démontré que l'élimination de la protéine CENPI, par suppression du gène en utilisant la technique de l'ARN interférence, donne lieu à des cellules mitotiques anormales avec des chromosomes hyper condensés et avec plusieurs problèmes lors de la ségrégation de ces derniers. Les CENPI et CENPH ont un rôle important dans la progression normale du cycle cellulaire allant de la métaphase à l'anaphase, et dans le maintien de la stabilité des chromosomes ségrégués (Nishihashi Ai et al, 2002). D'autres études ont démontré que la CENPI est crucial pour la localisation du CENPH, et que la CENPH avec la CENPI sont nécessaires pour

l'incorporation et l'union de la protéine CENPC au centromère (Cheeseman IM et al, 2008). Toutefois, aucun rôle n'a été décrit de CENPI dans l'incorporation de la CENPA aux nucléosomes centromériques. Par ailleurs, la protéine CENPI est aussi impliquée dans le processus de l'attachement et de l'union aux microtubules et dans l'activation du point de contrôle de la mitose (checkpoint) (Liu ST et al, 2003). L'hypothèse d'une relation possible, entre les fonctions déjà citées du CENPI et son rôle comme auto-antigène chez l'homme, n'est pas encore bien élucidée.

Notre étude sur le CENPI comme auto-antigène chez l'homme est similaire à une étude réalisée récemment par Akiko Saito et al en 2009, dans laquelle ils ont pu identifier la présence des autoanticorps (anti-CENPO) dirigés contre la protéine CENPO chez des patients souffrant d'une sclérodémie limitée. Cependant ces chercheurs n'ont parvenus à établir aucune corrélation entre la présence des anticorps CENPO et la maladie.

L'identification d'un nouveau auto-antigène comme le CENPI requiert la caractérisation des épitopes responsables de la réponse auto-immune. Une étude de Muro et al en 1992, a démontré que les sérums des patients avec sclérodémie et anti CENPB sont cliniquement et immunologiquement hétérogènes. Ce groupe a identifié 4 épitopes indépendants de cette protéine recombinante mais sans pouvoir établir une corrélation entre la différence de l'hétérogénéité dans la réponse auto-immune obtenue et les symptômes cliniques de ces patients. La protéine CENPA a été aussi décrite comme l'une des autoantigènes majeurs dans les sérums AAC positifs des patients sclérodermiques. Une autre étude de Muro et al en 2002, a identifié la région des 52 acides aminés de la partie amino-terminal de la protéine CENPA, comme épitope majeur de la réponse auto-immune chez ces patients et que la réponse auto-immune face à la protéine CENPA est fortement dirigée à la région N terminal (les acides aminés 3-17).

Dans notre étude sur le CENPI nous avons essayé d'identifier les différents épitopes face auxquels réagissent les huit sérums précédemment mentionnés. Les résultats obtenus par la technique du western blot montrent que ces sérums présentent une réactivité face aux 3 domaines de la protéine CENPI, (les domaines N-terminal, intermédiaire et carboxy-terminal). La région N-terminal est reconnue par les 8 sérums, tandis que 2 sérums ont en outre réagi face au domaine intermédiaire et deux autres réagissent aussi face au domaine carboxy-terminal de la protéine CENPI. Une détermination plus précise des différentes régions antigéniques responsables de la réponse auto-immune face à la protéine CENPI exige une étude postérieure à celle déjà réalisée dans ce travail.

Dans nos analyses nous avons aussi révélé, la présence d'un sérum présentant une réponse immunitaire face à la protéine CENPI mais sans production des anticorps face à l'antigène centromérique majoritaire CENPB. Ce résultat confirme d'une part que la réaction des sérums face à la protéine CENPI est une réaction spécifique et non pas une cross-réactivité entre la réaction CENPB et CENPI. D'autre part ce résultat nous suggère l'importance d'effectuer une étude plus vaste de la réponse anti protéines centromériques des autoantigènes durant une sclérodermie, afin d'obtenir une vision plus globale dans le diagnostic et dans la thérapie personnalisée selon chaque patient.

## **II. Étude initiale de CENPI comme marqueur possible de la Cirrhose Biliaire**

### **Primaire**

La détection des AAC cliniquement a été associée principalement, depuis des années, avec la forme limitée de la sclérodermie. Toutefois, diverses études ont démontré postérieurement que les AAC peuvent être détectés dans d'autres maladies auto-immunes tel que le lupus érythémateux disséminé, le syndrome de Sjogren ou encore une cirrhose biliaire primaire (CBP) (Watt. FE et al, 2004).

La CBP et la sclérodermie toutes deux sont des pathologies du tissu conjonctif d'étiologie inconnu. La CBP est caractérisée par une inflammation progressive, une oblitération des voies biliaires, une fibrose et des changements vasculaires au niveau de la peau et de certains autres organes. Dans la cirrhose biliaire primaire l'antigène mitochondrial majeur (AMA) est le principal impliqué. Il s'agit du composant E2 une sous unité du complexe pyruvate déhydrogénase. Les AMA sont considérés par conséquent comme des marqueurs sérologiques principaux pour le diagnostic des CBP. Lors des anciens travaux de recherche on supposait que la réponse auto-immune était due à une cross-réactivité entre les AMA et les antigènes centromériques. Le taux de ces anticorps AMA dans les sérums de patients avec CBP ne peut pas être corrélé avec l'état d'avancement et la sévérité de la maladie. D'autres autoanticorps antinucléaires ont été identifiés chez ces patients incluant des anticorps dirigés contre la protéine Sp100, contre les protéines gp210 et contre certaines protéines centromériques. Les AANs sont présents chez environ 53% des patients atteints d'une CBP. Plusieurs études ont démontré une association entre les anticorps anti-centromères et la CBP. Ainsi, Whyte. J et al, en 1994, ont décrit qu'il n'y avait aucune preuve de cibles antigéniques partagés entre les AMA et les anticorps anti-centromère (AAC), en concluant que les AMA et les AAC représentent des populations d'autoanticorps qui peuvent coexister,

mais ne présentant aucune cross-réactivité. D'autres études ont démontré la présence de CENPB avec une haute prévalence dans les sérums des patients souffrant d'une CBP (Albert J. C, 2010).

Des études récentes ont démontré que 15% des patients sclérodermiques produisent des anticorps spécifiques à la CBP (Norman GI et al, 2009). Une étude de la prévalence de la CBP chez des patients sclérodermiques effectuée par le groupe de recherche de Shervin.A et al en 2009, estime la prévalence de la CBP chez ces patients à 2 %. Cette prévalence paraît varier en fonction des populations. Une étude plus récente de Sayako et al en 2012, portant sur une population japonaise de 225 patients avec sclérodermie, a rapporté un pourcentage de 9,8% de patients souffrant d'une CBP avec présence des anticorps AMA. Parmi ces 225 patients 94,7% souffrent d'une sclérodermie limitée et 74,5% présentent une réaction positive face aux protéines centromériques.

Les AAC sont produites dans 9 à 60 % des patients avec CBP, la présence des AAC dans les sérums de ces patients est généralement dépendant de la présence ou de l'absence de certaines maladies auto-immunes comme la sclérodermie, le syndrome de CREST et le syndrome de Sjogren. La présence de gp120 et des AAC est lié à deux voies différentes de progression de la CBP. En 2007, Nakamura et al ont étudié le rôle prédictif des autoanticorps associés à la CBP, et ont mis en rapport la présence des anticorps anti-centromère au développement de l'hypertension portale, et la présence de gp120 à une insuffisance rénale, tandis que la présence des anticorps Sp100 n'a aucune valeur prédictive. Une autre étude effectuée par Rigamonti et al en 2006, dans laquelle ils ont comparé les caractéristiques cliniques du chevauchement de SSC / CBP avec CBP seul, révélait que le groupe de patients avec SSC / PBC présentait, une diminution du taux de la bilirubine et peu de patients avait besoin de greffe de foie, et un faible taux de décès en comparaison avec le groupe de patients souffrant seulement d'une CBP. Les patients AAC positifs progressent rapidement vers une insuffisance hépatique et ont plus de risque à développer une hypertension portale en comparaison avec le groupe de patients souffrant seulement d'une CBP. La raison de cette différence dans la progression de la maladie ainsi que le mécanisme derrière l'association auto-immune et le chevauchement ScS/CBP, ne sont pas encore bien élucidés. Probablement, les interactions immunologiques et la présence de désordres immunitaires additionnels doivent influencer l'image clinique et le pronostic de la maladie (Muratori et al, 2003).

Durant notre travail, nous avons trouvé que 5 parmi les 8 sérums (62,5%) qui ont une réponse immunitaire face à la protéine CENPI, produisent aussi des anticorps spécifiques de

la CBP, comme des anticorps de type : AMA, ASM et sp 100. Deux de ces cinq patients (40%) ont été déjà diagnostiqués comme patients souffrant d'une CBP.

Le fait qu'un grand nombre de patients avec une CBP asymptomatique deviennent symptomatique dans un intervalle de temps de 5 ans rend pertinent l'identification de nouveaux marqueurs biologiques spécifiques au développement de la CBP chez les patients atteints d'une sclérodémie. L'association de la présence des AAC avec les symptômes cliniques, de même la gravité et la progression d'une CBP vers une sclérodémie ou vice versa n'est pas encore clarifiée. Cependant, l'identification du spectre des anticorps antinucléaires lors d'une PBC est une frontière importante à explorer car elle peut aider à identifier les patients qui ont besoin d'un début de surveillance ou d'un traitement.

Bien que le rôle des AAC y compris ce nouveau auto anticorps anti CENPI dans la pathogenèse de la sclérodémie n'est pas encore établi, l'identification du spectre des autoanticorps présents chez ces patients est très utile pour une évaluation plus précise des manifestations cliniques et pour le pronostic. L'étude d'un plus grand nombre de sérums contribuera à fortifier l'association entre la présence des anticorps et la CBP chez des patients atteints d'une sclérodémie. La CBP peut présenter dans certains cas un chevauchement entre les maladies hématologiques et rhumatologiques. La détermination du rôle de la protéine CENPI chez des patients souffrant d'une CBP s'avère nécessaire afin de trouver un nouveau marqueur sérologique pour prévoir le développement d'une CBP chez des patients sclérodermiques.

### **III- Identification de nouveaux autoanticorps impliqués dans la réponse auto-immune chez des patients sclérodermiques**

Grâce aux techniques actuelles de séquençage, de clonage et d'expression de protéines recombinantes nous disposons actuellement d'une vaste gamme de protéines centromériques qui font l'objet de plusieurs études visant leur fonction dans la structure du kinétochore, l'analyse de diverses interactions entre ces protéines *in vitro*, la formation des cristaux et l'identification et la recherche de marqueurs sérologiques impliqués dans la réponse auto-immune face à ces nouveaux antigènes. Les trois protéines CENPA, CENPB et CENPC caractérisées lors des études initiales sur la SSc, sont des cibles de plusieurs autres autoanticorps dans les sérums de patients avec d'autres types de maladies auto-immunes et il a été aussi démontré qu'ils ne sont pas les seuls antigènes reconnus par les sérums des patients

sclérodermiques. Cela, nous laisse suggérer que d'autres protéines centromériques peuvent être impliquées dans la réponse auto-immune chez ces patients.

Lors du diagnostic du syndrome de Sjogren le profil obtenu par IF correspond à un signal centromérique. Des études de Allan et al, en 2006, ont démontré par des techniques de western blot que ces patients ont une réponse immunitaire seulement face à la protéine CENPC, et expliquent que l'aspect obtenu par IF n'inclut aucune réaction face à la protéine CENPB comme autoantigène. Toutefois, en général beaucoup de patients sclérodermiques produisent des anticorps anti-CENPB et anti- CENPC. Cette différence dans la réponse immunitaire entre ces deux types de maladies implique la présence d'un modèle et d'un mécanisme distinct, qui confère une certaine spécificité à la sclérodermie. Par ailleurs d'autres études concernant la recherche des AAC chez des patients sclérodermiques ont décrit la présence en faible pourcentage des anticorps anti CENPD (50 kDa), anti protéine CENPG, anti protéine CENPE (312 kDa) et anti protéine CENPF (400 kDa).

Dans ce contexte de grande variabilité, des autoantigènes possibles dans la réponse auto-immune humaine dans la sclérodermie, s'inscrit cette partie de cette thèse doctorale, dans le but d'évaluer l'hétérogénéité de la réponse immunitaire chez des patients avec des maladies auto-immunes. Nous avons analysé la réaction de 31 sérums AAC positifs face aux protéines recombinantes CENPH (28 kDa), CENPK (40 kDa), CENPM (20 kDa) et CENPP (32 kDa) considérées comme possibles nouveaux autoantigènes. Ces quatre protéines font partie du complexe constitutif associé au centromère CCAN (Constitutive Centromere-Associated Network), et font partie d'un complexe de protéines de la structure du kinétochore interne. Comme démontré par les techniques de l'ARN interférence, la déficience de l'une de ces protéines engendre des cellules mitotiques anormales.

Les 31 sérums analysés ont généré un signal positif par western blot face à l'antigène CENPB lequel est en corrélation avec le résultat obtenu par IF. Nos résultats montrent que 10 sérums réagissent au moins face à une de ces 4 nouvelles protéines centromériques recombinantes. Parmi ces sérums, cinq patients produisent des anticorps anti CENPH. Cette protéine a été identifiée pour la première fois comme composante des centromères dans des cellules de souris (Sugata et al, 1999). En l'an 2000, le même groupe a pu purifier et localiser la protéine CENPH à côté de CENPC et CENPA au niveau du kinétochore interne, ce qui suggère que le CENPH est un composant fondamental du complexe centromérique. La protéine CENPH est requise pour l'incorporation de la protéine CENPC dans le centromère des cellules des vertébrés et pour l'union de la majorité des protéines du complexe CCAN et de la protéine Mis 12. Sa localisation est dépendante de CENPA, CENPI, CENPK, CENPM,

CENPN et de CENPT. Des études récentes ont décrit que la surexpression de cette protéine est impliquée dans plusieurs types de cancers comme le cancer du poumon et du nasopharynx et son absence cause une aneuploïdie et une ségrégation défectueuse dans les cellules et la mort cellulaire. La fonction exacte de la protéine CENPH au niveau cellulaire n'est pas encore bien clarifiée (Okada et al, 2006).

Dans notre travail, parmi tous les sérums étudiés, quatre sérums des patients étudiés produisent des anticorps anti CENPK. Celle-ci est une protéine centromérique qui contient un motif "leucine zipper" (Okada et al, 2006) et le gène qui code pour cette protéine est localisé au niveau du chromosome 5. La protéine CENPK à côté de KNL1 coordonne l'union du complexe Ndc 80 au kinétochore externe. Une réduction expérimentale du niveau de ces deux protéines dans des cellules de vertébrés, cause une ségrégation défectueuse et une défaillance d'assemblage de CENPA et CENPC au kinétochore (Cheeseman IM et al, 2008). La localisation d'un grand nombre de protéines CENPs tel que CENPQ, CENPH, CENPN, CENPL dépend en grande partie de la CENPK.

Durant ce travail nous avons aussi identifié la présence des autoanticorps anti-CENPM chez cinq patients, et chez deux autres des anticorps anti-CENPP. La protéine CENPM a été identifiée pour la première fois comme antigène nucléaire associé à la prolifération cellulaire (Proliferation Associated Nuclear Element 1). Cette protéine est exprimée à un taux élevé dans les cellules comme les lymphocytes actifs et les cellules tumorales. Ensuite elle a été identifiée dans les cellules HeLa comme ICEN39 (Interphase Centromere Complex 39). Le gène codant pour cette protéine est localisé sur le chromosome 22. En 2006, Izuta et al ont démontré que cette protéine est essentielle pour le bon fonctionnement du centromère. La protéine CENPM influence sur la localisation centromérique des complexes CENPH/I/K et CENPO/P/Q/U et son absence engendre des cellules mitotiques anormales avec aneuploïdie. Nous pouvons conclure de nos analyses qu'aucun patient ne présente une réaction auto-immune face à toutes les protéines recombinantes étudiées. Cependant nous avons obtenus, après analyses des western blots, différents profils qui nous ont permis de déduire qu'il s'agit d'une réaction spécifique des anticorps présents dans chaque sérum et non pas d'une cross-réactivité. L'utilisation de protéines centromériques exprimées dans ce type d'analyse est d'une grande spécificité et permet l'identification avec une grande sensibilité de nouveaux autoantigènes.

Diverses études ont liés la présence de certaines maladies auto-immunes à la prédisposition génétique due à la présence d'un polymorphisme au niveau de la molécule HLA ou due à certains gènes responsables de l'inhibition ou l'activation des lymphocytes T et

des cellules présentatrices d'antigènes. Par ailleurs, il est de plus en plus évident actuellement que les cellules apoptotiques sont une source des autoantigènes qui induisent la production des autoanticorps chez des sujets prédisposés génétiquement à développer des maladies auto-immunes. La voie Fas-FasL d'apoptose, est importante pour réguler l'homéostasie des lymphocytes, en particulier pour éliminer les cellules effectrices après la stimulation antigénique. Différentes études ont démontré qu'un défaut de clairance des cellules apoptotiques par les mécanismes physiologiques normaux pourrait avoir des conséquences susceptibles de causer des maladies auto-immunes comme le syndrome lymphoprolifératif auto-immun, durant lequel a été décrit des mutations au niveau du récepteur Fas qui influence sur l'interaction de ce récepteur avec son ligand FasL (Frédéric Rieux-Laucat, 2006).

Le pouvoir immunogène des cellules apoptotiques et leur capacité à induire la production des autoanticorps ont été démontrés lors de plusieurs travaux (Rosen A et al, 1995, Mevorach D et al, 1998). Il est possible que les antigènes des cellules apoptotiques soient modifiés et qu'apparaissent des néo-épitopes. Il est aussi possible que les cellules apoptotiques se présentent avec les antigènes viraux et que la similitude entre les antigènes du soi et de non soi conduise à la rupture de la tolérance. Les mécanismes permettant l'élimination des cellules apoptotiques permettent une élimination rapide sans induire de réponse inflammatoire. Un défaut de clairance des cellules apoptotiques par les mécanismes physiologiques normaux pourrait promouvoir une réponse auto-immune (H.T Cook, 2001).

Dans la présente étude nous n'avons pas pu être capable de trouver un lien direct entre la présence des sérums AAC et les signes cliniques, et par conséquent le potentiel pathogène de ces AAC n'a pas été démontré. Le groupe de patients qui présentent ces nouveaux autoantigènes est classé dans le groupe de malades présentant une réaction contre le centromère dans la sclérodermie. Le suivi de ces patients durant le temps pourra apporter d'autres informations importantes au cas où l'un de ces patients développerait un autre type de maladie auto-immune.

L'identification de nouvelles protéines centromériques auto-immunes est d'une grande valeur dans le diagnostic des AAC et fournit une nouvelle information additionnelle qui va aider dans la compréhension des événements et des mécanismes immunologiques responsables de chaque maladie. Dans ce contexte, nos résultats sont d'un grand intérêt dans l'identification de nouveaux modèles sérologiques spécifiques de la sclérodermie et fournissent un outil précieux pour mieux diagnostiquer la réponse auto-immune chez les patients sclérodermiques.



#### **IV- Développement d'un array à autoantigènes centromériques comme nouvelle technique de diagnostic et suivi de la réponse auto-immune dans la sclérodermie**

L'intérêt des techniques basées sur les array ou puces à protéines a augmenté d'une façon remarquable avec le développement des puces à ADN (DNA-Arrays). Le séquençage du génome, le développement des domaines de la robotique, la protéomique, la microélectronique et de la bioinformatique ont été rapidement intégrés dans le développement des puces à ADN.

La technologie des arrays à biomolécules a pris naissance suite aux travaux de Roger Ekins en 1989, décrivant les bénéfices potentiels d'un système miniaturisé, les micro-spots, en comparaison avec d'autres systèmes d'études basées sur les interactions moléculaires. Roger Ekins avait démontré que les surfaces en miniature "les micro-spot" sont plus sensibles que les autres techniques basées sur le principe de liaison ligand – molécule.

Actuellement, les puces à ADN (microarrays à ADN) sont des outils qui sont largement utilisés et de manière courante dans de nombreux laboratoires. Toutefois les puces à protéines sont en voie de développement, le nombre actuel de publications sur ce type de puce est en croissance, ce qui démontre leur grand intérêt. Les puces à protéines permettent de détecter les interactions avec différents types de molécules et sont considérés comme un outil puissant pour mieux comprendre les pathologies humaines, évaluer avec précision la réponse immunitaire aux antigènes viraux et bactériens, et pour le développement des méthodes de diagnostic et l'élaboration de vaccins possibles. Cette technologie, qui est en pleine émergence, présente l'avantage de pouvoir comparer et caractériser simultanément un grand nombre de protéines cibles, tout en permettant de remplacer de nombreux tests individuels par un seul et d'évaluer plusieurs paramètres en même temps dans des matériaux biologiques complexes (Markus et al, 2002).

L'automatisation d'essais médicaux et des méthodes d'analyses protéiques constitue une aide pour améliorer notre compréhension des processus qui causent certaines pathologies. Le défi actuel est de disposer de technologies qui ont la capacité d'identifier des protéines ou des gènes cibles responsables de certaines maladies. Trouver que l'expression d'une protéine ou d'un gène est une cause ou une conséquence d'une maladie, peut amener à une atténuation des symptômes et aiderait à comprendre plusieurs pathologies (Binder S.R et al, 2006).

La détection et la quantification des niveaux des anticorps chez des patients sclérodermiques sont des outils de diagnostic qui sont couramment utilisés dans le diagnostic

clinique. Des tests de type ELISA et IF sont appliqués avec assiduité dans l'analyse de sérums de patients en produisant des résultats pratiques mais avec des données assez limitées. La détermination des anticorps spécifiques chez chaque patient serait idéale et fournirait un outil très important dans le diagnostic et dans une thérapie plus personnalisée, surtout en cas de symptômes hétérogènes et lors des stades précoces de la maladie auto-immune (Machour N et al, 2005).

Dans le diagnostic de la sclérodermie, il est fort intéressant d'identifier le spectre des autoanticorps spécifiques et propres à chaque patient. Un de nos objectifs dans ce travail de thèse a été d'entamer la mise au point d'une puce à autoantigènescentromériques qui permettra de détecter la présence des autoanticorps spécifiques anti Nt-CENPB, anti Ct-ENPB et anti Nt-CENPI dans les sérums de patients sclérodermiques. La caractérisation de ce profil des autoanticorps doit aboutir par la suite à un diagnostic plus précis de la réponse auto-immune corrélée à une thérapie plus ciblée et à un traitement adéquat selon le profil obtenu pour chaque patient (Robinson W.H et al, 2003).

Puisque les puces à protéines sont des systèmes miniaturisés, ce fait nous permet d'effectuer simultanément et en parallèle plusieurs analyses avec une très haute sensibilité. Un des avantages de cette technique, outre la facilité d'observation et l'identification des autoantigènes, est la faible quantité du sérum nécessaire pour l'étude. Toutefois, dans les solutions complexes, la faible concentration et/ou la présence d'autres protéines qui ont des contacts non spécifiques avec les molécules immobilisées ou qui s'adsorbent sur le support, provoquent un bruit de fond élevé qui pourrait constituer une limite pour la détection.

Nous avons analysé par notre array 27 cas de patients sclérodermiques qui sont AAC positifs, en obtenant dans 22 sérums une réponse positive face à la protéine Nt CENPB. Nous avons aussi étudié la réactivité de ces 27 sérums face à la protéine Ct CENPB, et nous avons obtenu 13 cas positifs par notre puce. Ces résultats ne coïncident pas tous avec ceux déjà obtenus par la technique du western blot. Par ailleurs, les 8 sérums caractérisés comme CENPI positifs par la technique du western blot ont été aussi analysés par la puce à autoantigène CENPI générant une réaction positive pour tous ces sérums. Par conséquent les résultats obtenus par ces deux techniques coïncident. En résumé les résultats obtenus par notre array pour CENPB et CENPI démontrent qu'il existe une bonne concordance entre les résultats obtenus par notre puce à antigènes et ceux obtenus par western blot. Comme le CENPI est un nouveau antigène détecté pour la première fois chez des patients sclérodermiques il est possible de déduire que notre puce à antigènes pourrait jouer un rôle

innovateur dans la recherche et l'identification de nouveaux autoantigènes centromériques dans la sclérodermie.

La puce développée génère une réponse proportionnelle à la quantité des autoanticorps à identifier dans les sérums. D'autre part, notre puce s'est montrée capable de produire des résultats précis et indépendamment des changements qui peuvent se produire durant les processus expérimentaux et il nous permet aussi d'identifier différents autoantigènes à la fois (Nt-CENPB, Ct-CENPB et Nt CENPI) à partir d'une faible quantité du sérum. Ces données traduisent et reflètent la linéarité, la reproductibilité et la spécificité de notre puce.

Le développement de nos puces à antigènes centromériques nous permet de tirer quelques conclusions pour l'amélioration d'autres essais similaires dans le futur. D'abord l'obtention d'une quantité suffisante d'antigènes pour la puce est un facteur initial important et on aura besoin d'un système d'expression et de purification qui produit dans son étape finale des protéines solubles hautement purifiées. Le système utilisé lors de notre étude est *E. Coli*, ce système permet l'expression d'un grand nombre de protéines hétérologues et présente certains inconvénients tels que l'accumulation des protéines recombinantes insolubles sous forme de corps d'inclusions (Schmitt et al, 2002). Deuxièmement, un autre obstacle qu'il faut aussi surmonter lors du développement des puces à antigène est le choix de support. Le choix des supports utilisés est conditionné par l'adéquation de leurs propriétés physico-chimiques, par l'absence de dénaturation des protéines, par l'uniformité de et la morphologie des dépôts (un spot idéal présente une surface de densité homogène et de forme circulaire), le rapport vrai/faux signal, l'intensité absolue du signal, la facilité de manipulation et de la compatibilité avec différents systèmes de détection du signal. Une étude comparative entre différentes surfaces de puces commerciales, démontre que les surfaces couvertes de nitrocellulose sont les meilleures et les plus adaptées pour étudier la réaction anticorps-antigène (Kattah et al, 2008). Grâce à son universalité pour l'immobilisation de différents types de protéines et par sa grande facilité de manipulation, la membrane de nitrocellulose est probablement maintenant le support le plus populaire pour la fabrication des puces à protéines. Etant donné sa surface poreuse, la nitrocellulose est capable de retenir un plus grand nombre de protéines « capteurs » qu'une surface plane comme le verre. Ce type de puces reste opérationnel pendant plusieurs mois. Lors de notre étude nous avons utilisé des supports couverts de nouvelles membranes de nitrocellulose, de type FAST-SLIDES qui possèdent un rapport de signaux vrai/faux élevé ce qui améliore nettement la performance de la détection par fluorescence. Une étude comparative de Balboni et al en 2008, comprenant 22 types de puces commercialisés y compris les FAST SLIDES de Whatman, a montré que ce support présente

le coefficient de variation (CV) le plus bas, ce qui implique une précision très élevée, et aussi un faible bruit de fond en le comparant aux autres types de supports utilisés pour la fabrication des puces.

Troisièmement, la détection de signaux que reflètent les interactions protéiques antigènes–anticorps a été réalisée lors des premiers essais par colorimétrie et chimiluminescence. Les signaux fluorescents sont plus stables, postérieurement nous avons eu recours à la détection des signaux fluorescents par des scanners de type Gen 400. A une longueur d'onde de 532 nm, se produit une image qui est enregistrée immédiatement sous format TIFF. Pour exploiter les résultats biologiques, nous avons utilisé le logiciel genepix pro 6.0. On commence d'abord, avant tout traitement des données, par une étape de pré-processing ou de normalisation de l'image. Cette étape consiste en un alignement des intensités de spots générés et qui influence de manière directe sur la qualité des résultats. Les outils de ce logiciel nous permettent d'éliminer le bruit de fond de toute l'image et de l'appliquer à chaque spot. Pendant l'analyse de nos résultats, grâce à l'outil CPI (Composite Pixel Intensity), on attribue à chaque spot une intensité en tenant compte de l'intensité du bruit de fond. A partir d'une valeur déterminée du CPI on inclut tous les spots présentant une intensité même légèrement supérieure à celle de bruit de fond. Cet outil nous permet de diminuer le nombre de résultats faux positifs ou faux négatifs (Hamellinck D et al, 2005).

Comme conclusion finale, l'identification de nouveaux autoantigènes centromériques et le développement de techniques d'analyse multiple comme les puces à protéines dans l'étude des sérums auto-immuns, serviront sans doute à améliorer le diagnostic clinique et à mettre en place une thérapie plus personnalisée chez des patients atteints de maladies auto-immunes comme la sclérodermie.

*Conclusions et perspectives*

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse a pour objectif majeur d'étudier en détail de nouveaux autoantigènes impliqués dans la réponse auto-immune durant la sclérodermie, et de développer une puce à autoantigènes centromériques qui pourrait apporter des améliorations au niveau du diagnostic et du pronostic de cette maladie.

Les résultats obtenus nous permettent de proposer les conclusions générales suivantes :

1. Nous avons développé l'expression de diverses protéines centromériques recombinantes dans *E.coli* en incluant les domaines amine et carboxyl-terminal de CENPB et CENPI.
2. Les antigènes exprimés ont été purifiés à partir de gels SDS-PAGE nous avons obtenus des protéines recombinantes pures sans autre contaminants.
3. Nous avons décrit pour la première fois chez des patients atteints de sclérodermie des autoanticorps anti Nt- et Ct de la protéine centromérique CENPI.
4. Nos résultats suggèrent que les autoanticorps anti-CENPI puissent être des marqueurs chez des patients avec sclérodermie qui développent à la fois une CBP.
5. Nous avons décrit une très grande hétérogénéité de la réponse autoimmune dans la sclérodermie, en identifiant comme nouveaux autoantigènes les protéines centromériques CENPP, CENPK et CENPM.
6. Nous avons développé une puce spécifique contre les régions amine et carboxyl-terminal du marqueur centromérique de la sclérodermie CENPB.
7. Nous avons également développé une puce spécifique pour le nouveau autoantigène CENPI.

Les conclusions de notre travail ouvrent de nouvelles perspectives dans l'analyse autoimmune de la sclérodermie. Nos études suggèrent une grande réponse hétérogène contre les divers composants protéiques du centromère dans les phénomènes de l'autoimmunité chez des patients avec sclérodermie. La présence d'une diversité si importante des autoanticorps centromériques est un phénomène à considérer dans le rôle pathologique possible de ces derniers dans la sclérodermie.

La réponse à ces questions pourrait mener au développement de nouvelles thérapies plus spécifiques pour chaque patient en fonction du profil des autoanticorps centromériques.

*Références Bibliographiques*

Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers and the aurora ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* 2001;11(2):49-54.

Agarwal SK, Tan FK, Arnett FC. Genetics and genomic studies in scleroderma (systemic sclerosis). *Rheum Dis Clin North Am.* 2008; 34(1):17-40.

Ainsztein AM, Kandels-Lewis SE, Mackay AM, Earnshaw WC. INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J Cell Biol.* 1998; 143(7):1763-74.

Akiyama Y, Tanaka M, Takeishi M, Adachi D, Mimori A, Suzuki T. Clinical, serological and genetic study in patients with CREST syndrome. *Intern Med.* 2000; 39(6):451-6.

Akbarali yasmin, Jennifer Matousek- Ronck, Laura Hunt, Leslie Staudt, Moriis Reichlin, Joel M. Guthridge and Judith A James. Fine specificity mapping of autoantigens targeted by anti centromere Autoantibodies. *J Autoimmun.* 2006; 27(4):272-80.

Albert J. Czaja, Autoantibodies as prognostic markers in autoimmune liver disease. *Springer Science.* 2010; 55(8):2144-6.

Allan C Gelber, Stanley R Pillemer, Bruce J Baum, Frederick M wigley, Laura K Hummers, Steven Morris, Antony Rosen and Livia A Casciola-Rosen. Distinct Recognition of Antibodies to centromero proteins in Primary Sjogren's Syndrome compared with limited sclerodermia. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2006; 65(8):1028-32.

Amor,D.J. and Choo,k.H. Neocentromere study. *Am.J.Hum Genet.* 2002; 71(4):695-714.

Andrews PD, Ovechkina Y, Morrice N, Wagenbach M, Duncan K, Wordeman L, Swedlow JR. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell.* 2004; 6(2):253-68.

Aris JP, Blobel G. cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(3):931-5.



Armando Gabrielli, Silvia Svegliati, Gianluca Moroncini, Enrico V Avedimento Pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis. *Current Opinion in Immunology*. 2007; 19(6):640-5.

Arnett FC, Gourh P, Shete S, Ahn CW, Honey RE, Agarwal SK, Tan FK, McNearney T, Fischbach M, Fritzler MJ, Mayes MD, Reveille JD. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(5):822-7.

Avouac Jérôme, Uzan Georges, Kahan André, Boileau Catherine and Allanore Yannick. Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Joint Bone Spine*. 2008; 75(2):131-7.

Balboni I, Limb C, Tenenbaum JD, Utz PJ. Evaluation of microarray surfaces and arraying parameters for autoantibody profiling. *Proteomics*. 2008; 8(17):3443-9.

Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, Fraticelli P, Sambo P, Funaro A, Kazlauskas A, Avvedimento EV, Gabrielli A. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med*. 2006; 354(25):2667-76.

Beck JS. The behaviour of certain nuclear antigens in mitosis. *Exp Cell Res*. 1962; 28:406-18.  
Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2004; 75(2):330-7.

Biji T. Kurien<sup>1</sup> and R. Hal Scofield, Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens *Autoimmun Rev*. 2008; 7(7): 567–573.

Binder Steven R, Craig Hixson and John Glossenger. Protein arrays and pattern recognition: new tools to assist in the identification and management of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. 2006; 5(4):234-241.

Bordrona A, Révélen R, D'Arbonneau F, Dueymes M, Renaudineau Y, Jamin C, Youinou P. Functional heterogeneity of anti-endothelial cell antibodies. *Clin Exp Immunol*. 2001; 124(3):492-501.

Burke DJ, Stukenberg PT. linking kinetochore- microtubule binding to the spindle checkpoint. *Dev Cell*. 2008; 14(4):474-9.

Carroll CW, Milks KJ, Straight AF. Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol*. 2010; 189(7):1143-55.

Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(5-6):691-728.

Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*. 2003. 21; 112(4):407-21.

Cheeseman IM, Hori T, Fukagawa T, Desai A. KNL1 and the CENP-H/I/K complex coordinately direct kinetochore assembly in vertebrates. *Mol Biol Cell*. 2008; 19(2):587-94.

Cheeseman Iain and Arshad Desai, Molecular architecture of the kinetochore – microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2008; 9(1):33-46.

Chizzolini C, Rezzonico R, Ribbens C, Burger D, Wollheim FA, Dayer JM. Inhibition of type I collagen production by dermal fibroblasts upon contact with activated T-cells: different sensitivity to inhibition between systemic sclerosis and control fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 1998; 41(11):2039-47.

Cimini D, Moree B, Canman JC, Salmon ED. Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J Cell Sci*. 2003; 116(20):4213-25

Daniel J. MacPhee. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2010; 61(2):171-7.

Darren Hamelinck, Heping Zhou, Lin Li , Corneluis Verweij, Deborah Dilon, Ziding Feng, Jose Costa and Brian B Haab. Optimized Normalisation for antibody microarrays and application to serum- Protein profiling. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2005; 4(6):773-84.

Desai. A kinetochore. Kinetochore. *Curr Biol*. 2000; 10(14):508

Dawn Mattoon, Gergory Michaud, Janie Merkel and Barry Schweitzer. *Expert Rev proteomics*. 2005; 2(6):879-89.

Earnshaw, W.C and Rothfield N. Identification of a family of human centromere Protein using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*. 1985; 91(3-4):313-21.

Earnshaw WC, Earnshaw, W. C., Bordwell, B., Marino, C. and Rothfield, N. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J. Clin. Invest*. 1986; 77(2):426-30.

Earnshaw WC, Machlin PS, Bordwell BJ. Analysis of anticentromere autoantibodies using cloned autoantigen CENPB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(14):4979-83.

Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood*. 1999; 93(6):2033-7.

Ekins RP. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal*. 1989; 7(2):155-68.

Falkner D, Wilson J, Medsger TA Jr, Morel PA. HLA and clinical associations in systemic sclerosis patients with anti-Th/To antibodies. *Arthritis Rheum*. 1998; 41(1):74-80.

Frédéric Rieux-Laucat, Le syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité : un défaut hérité ou acquis d'apoptose lymphocytaire. *Médecine sciences*. 2006; 22(6-7):645-50.

Fujimani RS, Oldestone MB Molecular mimicry as a mechanism for virus- induced autoimmunity. *Immunol Res*. 1989, 8(1):3-15.

Fukagawa Tatsuo, Marinela Perpelescu the ABCs of CENPs. *Chromosoma*. 2011; 120(5):425-46.

Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Avvedimento EV. Pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19(6):640-5.

Gassmann R, Henzing AJ, Earnshaw WC. Novel components of human mitotic chromosomes identified by proteomic analysis of the chromosome scaffold fraction. *Chromosoma*. 2005; 113(7):385-97.

Gelber AC, Pillemer SR, Baum BJ, Wigley FM, Hummers LK, Morris S, Rosen A, Casciola-Rosen L. Distinct recognition of antibodies to centromere proteins in primary Sjogren's syndrome compared with limited scleroderma. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65(8):1028-32.

Ghosh AK. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp Biol Med*. 2002; 227(5):301-14.

Gorbsky GJ Mitosis: MCAK under the aura of Aurora B. *Curr Biol*. 2004; 14(9):346-8.

Gourh P, Tan FK, Assassi S, Ahn CW, McNearney TA, Fischbach M, Arnett FC, Mayes MD. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with anti-topoisomerase I- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2006; 54(12):3945-53.

Grassegger Alfred, Gabriela Pohla Gubo, Margret Frauscher and Helmut Hinter. Autoantibodies in systemic sclerosis (scleroderma): clues for clinical evaluation, prognosis and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr*. 2008; 158(1-2):19-28.

Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The Immunobiology of Systemic Sclerosis. *Semin Arthritis Rheum*. 2008; 38(2):132-60.

Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1997; 24(2):328-32.

Haaf T, Mater AG, Wienberg J, Ward DC. Presence and abundance of CENP-B box sequences in great ape subsets of primate-specific alpha-satellite DNA. *J Mol Evol*. 1995; 41(4):487-91.

He D, Zeng C, Woods K, Zhong L, Turner D, Busch RK, Brinkley BR, Busch H, CENPG: a new centromeric protein that is associated with the alpha 1 satellite subfamily. *Chromosoma*. 1998; 107(3):189-97.

Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1378(1):79-113.

Hirakata M, Okano Y, Pati U, Suwa A, Medsger TA Jr, Hardin JA, Craft J. Identification of autoantibodies to RNA polymerase II. Occurrence in systemic sclerosis and association with autoantibodies to RNA polymerases I and III. *J Clin Invest*. 1993; 91(6):2665-72.

Hori T, Okada M, Maenaka K, et al. CENP-O class proteins form a stable complex and are required for proper kinetochore function. *Mol Biol Cell*. 2008; 19(3):843-54.

Hsu TC, Chang CH, Lin MC, Liu ST, Yen TJ, Tsay GJ. Anti-CENP-H antibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int*. 2006; 26(4):298-303.

HT Cook. Déficit en complément, maladie lupique et apoptose. *Flammarion médecine-sciences. Actualités néphrologiques* 2001.

Irene C B Vioritto, Nikolay Nikolov, and Richard M Siegel. Autoimmunity versus Tolerance: can dying cells tip the balance. *Clin Immunol*. 2007; 122(2):125-34.

Izuta H, Ikeno M, Suzuki N, Tomonaga T, Nozaki N, Obuse C, Kisu Y, Goshima N, Nomura F, Nomura N, Yoda K. Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells. *Genes Cells.* 2006; 11(6):673-84.

Jennifer L. Sargent, Ausra Milano, M. Kari Connolly and Michael L. Whitfeld, Scleroderma Gene Expression and Pathway Signatures. *Current Rheumatology Reports* 2008; 11(6):673-84.

Julie P.I Welbum and Iam M cheeseman. Toward a molecular structure of the eukaryotic kinetochore *DL.* 20ev Cel08. 15(5):645-55.

Karassa FB, Ioannidis JP. Mortality in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26(5):85-93.

Kato T, Yamamoto K, Takeuchi H, Okubo M, Hara E, Nakada S, Oda K, Ito K, Nishioka K. Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1993; 36(11):1580-7.

Kattah MG, Utz PJ, Balboni I. Protein microarrays address the elephant in the room. *Clin Chem.* 2008; 54(6):937-9.

K.H Mohan, Sathish Pal, Raghavendra Rao H, Sripathi, Smitha Prabhu. Techniques of immunofluorescence and their significance. *Indian J Dermatol veneroel Leprol.* 2008; 74(4):415-9.

Konstantin V. Salojin, MD, Michelle Le Tonquèze, PhD, Alain Saraux, MD, Evgeni L. Nasonov, MD , Maryvonne Dueymes, MD, DSc , Jean-Charles Piette, MD, Pierre Y. Antiendothelial Cell Antibodies: Useful Markers of Systemic Sclerosis. *Am J Med.*1996; 102(2):178-85.

Kristin M. Fries, Timothy BLIEDEN, Richard J.Looney, Gregory D. Sempowski, Maria R.Silvera, Richard A. Willis and Richard P Philipps. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in Fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994; 72(3):283-92.

Kwon MS, Hori T, Okada M, Fukagawa T. CENP-C is involved in chromosome segregation, mitotic checkpoint function, and kinetochore assembly. *Mol Biol Cell*. 2007; 18(6):2155-68.

Lampson MA, Renduchitala K, Khodjakov A, Kapoor TM. Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Cell Biol*. 2004; 6(3):232-7.

Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, Hunt DF, Walczak CE, Stukenberg PT. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol*. 2004; 14(4):273-86.

Larin Z, Mejía JE. Advances in human artificial chromosome technology. *Trends Genet*. 2002; 18(6):313-9.

Lermontova I, Schubert V, Fuchs J, Klatt S, Macas J, Schubert I Loading of Arabidopsis centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell*. 2006; 18(10):2443-51

LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988; 15(2):202-5.

Liu ST, Rattner JB, Jablonski SA, Yen TJ. Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells. *J Cell Biol*. 2006;175(1):41-53.

Luc Mouthon, Paloma Garcia de la peña, Youri CHANSEAUD, Mathieu C. TAMBY, Marie-Cristophe BOISSIER, Loic GUILLEVIN. Pathogénie de la sclerodermie systémique: aspects immunologiques. *Ann Med Interne*. 2002;153(3):167-78.

Mackay AM, Ainsztein AM, Eckley DM, Earnshaw WC. A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis. *J Cell Biol*. 1998;140(5):991-1002.

Mahler M, Raijmakers R, Dähnrich C, Blüthner M, Fritzler MJ. Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7: 704-13.

Musacchio A, Hardwick KG. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(10):731-41.

Mahler M, You D, Baron M, Taillefer SS, Hudson M; Canadian Scleroderma Research Group(CSRG), Fritzler MJ. Anti-centromere antibodies in a large cohort of systemic sclerosis patients: comparison between immunofluorescence, CENP-A and CENP-B ELISA. *Clin Chim Acta.* 2011; 412(21-22):1937-43.

Manuel M. Valdivia, Khaoula Hamdouch, Manuela Ortiz and Antonio Astola. CENPA a Genomic Marker for Centromere Activity and Human Diseases. *Current Genomics,* 2009; 326-335.

Martial Koenig, Mélanie Dieudé, Jean-Luc Senécal Predictive value of antinuclear autoantibodies: The lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmunity Reviews.* 2008; 7(8):588-93.

Mathias Kalbas, Angelika lueking, Axel Kowald and Stefan Muellner. New analytical tools for studying autoimmune diseases. *Curr Pharm Des.* 2006; 12(29):3735-42.

McHugh NJ, Whyte J, Artlett C, Briggs DC, Stephens CO, Olsen NJ, Gusseva NG, Maddison PJ, Black CM, Welsh K. Anti-centromere antibodies (ACA) in systemic sclerosis patients and their relatives: a serological and HLA study. *Clin Exp Immunol.* 1994; 96(2):267-74.

Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkon KB. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med.* 1998; 188(2):387-92.

Mitchel H, Bolster MB, Leroy EC. Scleroderma and related conditions. *Med Clin North America.* 1997; 81(1):129-49.

Michael Mahler, Daniel You, Murray Baron, Suzanne S. Taillefer, Marie Hudson and Canadian Scleroderma Research Group(CSRG), Marvin J. Fritzler. Anti-centromere antibodies in a large cohort of systemic sclerosis patients: Comparison between



immunofluorescence, CENP-A and CENP-B ELISA *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412(21-22):1937-43.

Mohan KH, Pai S, Rao R, Sripathi H, Prabhu S. Techniques of immunofluorescence and their significance. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2008; 74(4):415-9.

Muratori P, Muratori L, Ferrari R, Cassani F, Bianchi G, Lenzi M, Rodrigo L, Linares A, Fuentes D, Bianchi FB. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98(2):431-7.

Muro Y, Sugimoto K, Okazaki T, Ohashi M. The heterogeneity of anticentromere antibodies in immunoblotting analysis. *J Rheumatol*. 1990; 17(8):1042-7.

Muro Y, Iwai T, Ohashi M. A charged segment mainly composed of basic amino acids forms an autoepitope of CENPA. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996; 78(1):86-9.

Muro Y, Azuma N, Onouchi H, Kunimatsu M, Tomita Y, Sasaki M, Sugimoto K. Autoepitopes on autoantigen centromere protein-A (CENP-A) are restricted to the N-terminal region, which has no homology with histone H3. *Clin Exp Immunol*. 2000; 120(1):218-23.

Muryoi T, Kasturi KN, Kafina MJ, Cram DS, Harrison LC, Sasaki T, Bona CA. Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes. *J Exp Med*. 1992; 175(4):1103-9.

Machour Nadine, Gilbert Danièle, Vittecoq Olivier, Costa Odile, Tron François, Charlionet Roland. Proteomics and autoantibody. *Med Sci (Paris)*. 2005; 21(8-9):759-64.

Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, Takii Y, Koyabu M, Yokoyama T, Migita K, Daikoku M, Abiru S, Yatsushashi H, Takezaki E, Masaki N, Sugi K, Honda K, Adachi H, Nishi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Komatsu T, Saito A, Saoshiro T, Harada H, Sodeyama T, Hayashi S, Masumoto A, Sando T, Yamamoto T, Sakai H, Kobayashi M, Muro T, Koga M, Shums Z, Norman GL, Ishibashi H. Anti-gp 210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2007; 45(1):118-27.

Nasmyth K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science*. 2002; 297(5581):559-65.

Nicole Fabien, Hugues Rousset. Diagnostic immunologiques des sclérodermies. *Pathologie biologique*. 2002; 50(4):243-55.

Nishihashi A, Haraguchi T, Hiraoka Y, Ikemura T, Regnier V, Dodson H, Earnshaw WC, Fukagawa T. CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells. *Dev Cell*. 2002; 2(4):463-76.

Norman GL, Bialek A, Encabo S, Butkiewicz B, Wiechowska-Kozłowska A, Brzosko M, Shums Z, Milkiewicz P. Is prevalence of PBC underestimated in patients with systemic sclerosis? *Dig Liver Dis*. 2009; 41(10):762-4.

Okada T, Ohzeki J, Nakano M, Yoda K, Brinkley WR, Larionov V, Masumoto H. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell*. 2007; 131(7):1287-300.

Okamoto H. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2006; 355(12):1278

Okano Y, Medsger TA Jr. Autoantibody to The ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1990; 33(12):1822-8.

Oldstone MB. Virus-induced autoimmunity: molecular mimicry as a route to autoimmune disease. *J Autoimmun*. 1989; 2:187-94.

Ohtsuka T, Miyamoto Y, Yamakage A, Yamazaki S. Quantitative analysis of microchimerism in systemic sclerosis skin tissue. *Arch Dermatol Res*. 2001; 293(8):387-91.

Oppezio P, Dighiero G. Autoantibodies, tolerance and autoimmunity. *Pathol Biol (Paris)*. 2003; 51(5):297-304.

Paolo Sfriso, Anna Ghirardello, Costantino Botsios, Michele Tonon, Margherita Zen, Nicola Bassi, Franco Bassetto, and Andrea Doria. Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 87(3):385-95.

Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer JM, Roosnek E, Chizzolini C. Presence of CD4+ CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(10):3459-67.

Pierre Youinou, Yves Renaudineau Stratégie d'étude des anticorps anti-nucléaires. *Médecine thérapeutique 2006* ; Volume 12, Numéro 3.

Postlethwaite Arnold E., L. Jeff Harris, Syed H. Raza, Swapna Kodura and Titilola Akhigbe. Pharmacotherapy of Systemic Sclerosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2010; 11(5):789-806.

Reimer G, Rose KM, Scheer U, Tan EM. Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. *J Clin Invest*. 1987; 79(1):65-72.

Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2007; 357(10):977-86.

Renato Tozzoli, Recent advances in diagnostic technologies and their impact in auto-immune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2007; 6(6):334-40.

Riente L, Marchini B, Dolcher MP, Puccetti A, Bombardieri S, Migliorini P. Anti-collagen antibodies in systemic sclerosis and in primary Raynaud's phenomenon. *Clin Exp Immunol*. 1995; 102(2):354-9.

Robinson William H, Laurence Steinman, Paul J. Utz. Protein array for autoantibody profiling and fine-specificity mapping. *Proteomics*. 2003; 3(11):2077-84.

Robitaille G, Christin MS, Clément I, Sénécal JL, Raymond Y. Nuclear autoantigen CENP-B transactivation of the epidermal growth factor receptor via chemokine receptor 3 in vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(9):2805-16.

Rock KL, York IA, Saric T, Goldberg AL. Protein degradation and the generation of MHC class I presented peptides. *Adv Immunol.* 2002; 80:1-70.

Rogers GC, Rogers SL, Sharp DJ. Spindle microtubules in flux. *J Cell Sci.* 2005; 118(6):1105-16.

Rosen A, Casciola –Rosen L, Ahearn J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med.* 1995; 181(4):1557-61.

Rothfield N, Whitaker D, Bordwell B, Weiner E, Senecal JL, Earnshaw W. Detection of anticentromere antibodies using the cloned autoantigen CENPB. *Arthritis Rheum.* 1987; 30(12):1416-9.

Saito A, Muro Y, Sugiura K, Ikeno M, Yoda K, Tomita Y. CENP-O, a protein localized at the centromere throughout the cell cycle, is a novel target antigen in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2009; 36(4):781-6.

Salojin KV, Le Tonquèze M, Saraux A, Nassonov EL, Dueymes M, Piette JC, Youinou PY. Antiendothelial Cell Antibodies: Useful Markers of Systemic Sclerosis, *Am J Med.* 1997; 102(2):178-85.

Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell.* 2004; 118(2):187-202.

Santaguida.Stefano, Andrea Musacchio. The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* 2009; 28(17):2511-31.

Sayako Imura-Kumada. Minoru Hasegawa.Takashi Matsushita. Yasuhito Hamaguchi. Susan Encabo. Zakera Shums. Gary L. Norman. Kazuhiko Takehara. Manabu Fujimoto. High

prevalence of primary biliary cirrhosis and disease-associated autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol*. 2012.

Schmitt J, papisch W. Recombinant autoantigens. *Autoimmun Rev*. 2002. 1(1-2):79-88.

Schwartz RS. Autoimmunity and autoimmune diseases. ed. *Fundamental immunology*. New York : Raven Press. 1993; 1033-97.

Sfriso P, Ghirardello A, Botsios C, Tonon M, Zen M, Bassi N, Bassetto F, Doria A. Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *J Leukoc Biol*. 2010; 87(3):385-95.

Silman AJ. Epidemiology of scleroderma. *Ann Rheum Dis*. 1991; 8(6):585-9.

Simeon CP, Fonollosa V, Tolosa C, Palou E, Selva A, Solans R, Armadans L, Moreno E, Marsal S, Vilardell M. Association of HLA class II genes with systemic sclerosis in Spanish patients. *J Rheumatol*. 2009; 36(12):2733-6.

Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, Yang JH, Howson JM, Stevens H, McManus R, Wijmenga C, Heap GA, Dubois PC, Clayton DG, Hunt KA, van Heel DA, Todd JA. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med*. 2008; 359(26):2767-77

Speliotes EK, Uren A, Vaux D, Horvitz HR. The survivin-like *C. elegans* BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Mol Cell*. 2000; 6(2):211-23.

Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1980; 23(5):581-90.

Sugata N, Munekata E, Todokoro K. Characterization of a novel kinetochore protein, CENP-H. *J Biol Chem*. 1999; 274(39):27343-6.

Sugiura K, Muro Y. Anti-annexin V antibodies and digital ischemia in patients with scleroderma. *J Rheumatol.* 1999; 26(10):2168-72.

Takeuchi K, Turley SJ, Tan EM, Pollard KM. Analysis of the autoantibody response to fibrillarin in human disease and murine models of autoimmunity. *J Immunol.* 1995; 154(2):961-71.

Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum.* 1980; 23(6):617-25.

Thompson AE, Shea B, Welch V, Fenlon D, Pope JE. Calcium-channel blockers for Raynaud' phenomenon in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(8):1841-7.

Tomoyuki U, Tanaka and Arshad Desai Kinetochore-micrtotubule interactions: the means to the end. *Current opinion in cell biology.* 2007; 20(1):53-63.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology.* 1997; 24:145-9.

U.F. Haustein.MD. Systemic sclerosis – scleroderma. *Dermatology Online Journal.* 2002; 8(1):3.

Vagnarelli P, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma.* 2004; 113(5):211-22.

Valdivia M M. El cinetocoro. *Investigación y Ciencia* Septiembre. 1993; 76-82.

Valdivia M.M, Figueroa J, Iglesias C, Ortiz M . A novel centromere monospecific serum to a human autoepitope on the histone H3-like protein CENP-A. *FEBS Lett.* 1998; 422(1):5-9.

Villalta D, Tozzoli R, Tonutti E, Bizzaro N. The laboratory approach to the diagnosis of autoimmune diseases: is it time to change? *Autoimmun Rev.* 2007; 6(6):359-65.

Watt FE, James OF, Jones DE. Patterns of autoimmunity in primary biliary cirrhosis patients and their families: a population-based cohort study. *QJM*. 2004; 97(7):397-406.

Weiner ES, Hildebrandt S, Senécal JL, Daniels L, Noell S, Joyal F, Roussin A, Earnshaw W, Rothfield NF. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum*. 1991; 34(1):68-77.

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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(21):12319-24.

Whyte J, Hough D, Maddison P J and N J McHugh. The association of primary Biliary cirrhosis and systemic sclerosis is not accounted for by cross reactivity between mitochondrial and centromere antigens. *Journal of autoimmunity*. 1994; 7(3):413-24.

Xian-Zhi Guo, Ge Zhang, Jun-Ye Wang, Wan-Li Liu, Fang Wang, Ju- Qin Dong, Li-Hua Xu, Jing-Yan Cao, Li-Bing Song and Mu-Sheng Zeng. Prognostic relevance of Centromere protein H expression in esophageal carcinoma. *BMC Cancer*. 2008; 8:233.

Yoda K, Kitagawa K, Masumoto H, Muro Y, Okazaki T. A human centromere protein, CENP-B, has a DNA binding domain containing four potential alpha helices at the NH2 terminus, which is separable from dimerizing activity. *J Cell Biol*. 1992; 119(6):1413-27.

Yang CH, Tomkiel J, Saitoh H, Johnson DH, Earnshaw WC. Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Mol Cell Biol*. 1996; 16(7):3576-86.

Zoia Larin and José E. Mejía. Advances in human artificial chromosome technology. *Trends in Genetics*. 2002; 18(6):313-9.

Amexes



## Tampons et Solutions

### TBE 10 X :

Tris-Borate 0,9M, pH 8

EDTA 20 mM

### Tampon de charge pour les échantillons d'ADN :

Bleue de Bromo phéno 10,25%

Xylène de cyanure

Glycérol 30%

### Tapon de séparation 2 X pour les gels SDS-PAGE :

Tris HCl 750 mM pH 8,8

SDS 2%

### Tampon de concentration 2 X des gels SDS-PAGE :

Tris HCl 250 mM pH 6,8

SDS 2%

### Laemmli 5 X (tampon d'électrophorèse)

Tris-HCl 125 mM, pH 8,3

Glycine 0,96M

SDS 0,5%

### Milieu de culture pour les cellules HeLa :

DMEM supplémenté avec 10% de sérum foetal du veau.

### Milieu de culture LB

Tryptone 1%

Extrait de levure 0,5%

NaCl 0,5%

Plaques avec milieu LB avec ampicilline

Agar 1,4%

Tryptone 1%

Extrait de levure 0,5%

Ampiciline 100µg/ml