

2m11.2993.1

Université de Montréal

# Expression et purification de l'ADN topoisomérase I humaine

par  
Julie Guillemette

Programme de Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du  
grade de Maîtrise en Sciences Biomédicales

Juin 2002

© Julie Guillemette 2002



W  
4  
U58  
2002  
V.103



2002

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Expression et purification de l'ADN topoisomérase I humaine**

présenté par :

Julie Guillemette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Luc Desgroseillers, président du jury

Richard Bertrand, membre du jury

Yves Raymond, Directeur de recherche

Jean-Luc Senécal, Co-Directeur de recherche

## Résumé en français

Les maladies auto-immunes sont caractérisées par un bris de la tolérance immunitaire envers des molécules du soi, généralement intra-nucléaires. L'ADN topoisomérase I (topo I) est l'un des principaux antigènes reconnus par le système immunitaire des patients atteints de la sclérodermie (sclérose systémique). La présence d'auto-anticorps anti-topo I est associée à la forme diffuse de la maladie ainsi qu'au développement de la fibrose pulmonaire, soit deux facteurs de risque importants de mortalité. La purification de topo I est nécessaire pour la purification des auto-anticorps de même que pour le diagnostic précoce de la fibrose pulmonaire.

Nous avons souscloné la séquence complète de topo I humaine dans le vecteur d'expression pCal-n-Flag afin de générer un gène de fusion avec un peptide liant la calmoduline (PLC). Nous avons ensuite purifié la protéine produite par une technique d'électroélution. La topo I ainsi purifiée a ensuite été utilisée pour isoler des auto-anticorps anti-topo I de sérums de patients sclérodermiques. Un test ELISA utilisant des peptides synthétiques de la topo I a également été testé sur des sérums de sujets sclérodermiques et normaux de nationalité canadienne française.

La topo I devra être produite en plus grande quantité afin de pouvoir mettre davantage au point la technique de purification des auto-anticorps. Un test ELISA pourra également être développé à partir de cette topo I purifiée.

Mots-clés : ADN topoisomérase I, auto-immunité, auto-anticorps, auto-antigènes, sclérodermie, sclérose systémique, *Escherichia coli*, protéine recombinante

## English summary

Auto-immunes diseases are characterized by a lack of immune tolerance toward self molecules, mostly intranuclear ones. The DNA topoisomerase I (topo I) enzyme is one of the principal antigenes recognised by the immune system of patients with systemic sclerosis (scleroderma). The presence of anti-topo I auto-antibodies is associated with the diffuse form of the disease and with pulmonary fibrosis, two important risk factors for mortality. Purification of recombinant topo I is required for the purification of anti-topo I autoantibodies and for the early diagnostics of pulmonary fibrosis.

We have cloned the complete sequence of human topo I in the pCal-n-Flag expression vector to generate a CBP purification tag fused to the N terminus of topo I. The protein was purified by electroelution, and used to isolate serum autoantibodies from a systemic sclerosis patient. We also developed an ELISA test with synthetic peptides of topo I on serum samples of patients with systemic sclerosis and normal individuals, both french canadians.

In the future, topo I must be produced in greater quantities to allow purification of a larger number of autoantibodies, and to develop a diagnostic anti-topo I ELISA test.

Key words: autoimmunity, autoantibodies, systemic sclerosis, DNA topoisomerase I, *Escherichia coli*, recombinant protein

### 3 TABLE DES MATIÈRES

<b>1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS .....</b>	<b>iii</b>
<b>2 RÉSUMÉ EN ANGLAIS .....</b>	<b>iv</b>
<b>3 TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>v</b>
<b>4 LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>viii</b>
<b>5 LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>ix</b>
<b>6 LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>x</b>
<b>7 DÉDICACE .....</b>	<b>xi</b>
<b>8 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
8.1 Les maladies auto-immunes .....	1
8.2 La sclérodermie .....	3
8.3 Classification de la sclérodermie .....	3
8.4 Pathogenèse de la sclérodermie.....	3
8.4.1 Atteinte cutanée .....	4
8.4.2 Atteinte vasculaire .....	4
8.4.3 Atteinte cardiaque .....	5
8.4.4 Atteinte gastro-intestinale .....	5
8.4.5 Atteinte rénale .....	5
8.4.6 Atteinte musculo-squelettique .....	6
8.4.7 Atteinte pulmonaire .....	6
8.5 Épidémiologie .....	7

8.5	Épidémiologie .....	7
8.6	Les auto-anticorps .....	8
8.7	L'ADN topoisomérase I .....	11
8.8	Les auto-anticorps anti-topoI .....	12
8.8.1	Identification et association avec la fibrose pulmonaire .....	12
8.8.2	Clonage et expression du gène de la topo I .....	15
8.8.3	Identification des épitopes reconnus par les anti-topo I .....	16
8.8.4	Mécanismes de production des anti-topo I .....	18
8.9	But de l'étude .....	22
<b>9 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....</b>		<b>24</b>
9.1	Sous-clonage de topo I .....	25
9.2	Expression de topo I .....	29
9.3	Extraction de topo I .....	29
9.3.1	Pour la purification par affinité .....	29
9.3.2	Pour l'électroélution .....	30
9.4	Purification de topo I .....	30
9.4.1	Par affinité avec les billes liant la calmoduline .....	30
9.4.2	Par électroélution .....	31
9.5	Analyse de la purification de topo I .....	32
9.5.1	Coloration au Bleu de Coomassie.....	32
9.5.2	Immunobuvardage .....	32
9.6	Purification d'auto-anticorps anti-topo I .....	33
9.6.1	Dosage des auto-anticorps purifiés .....	35
9.6.2	Analyse de la purification d'auto-anticorps .....	36
9.7	ELISA sur peptides de topo I .....	37
9.8	Préparation de solutions courantes .....	38
9.8.1	Milieu de culture M9ZB .....	38
9.8.2	Milieu de culture LB .....	38

9.8.3 Agar ZB .....	38
9.8.4 SDS 4X .....	39
9.8.5 SDS-Polyacrylamide.....	39
9.8.6 Mélange d'inhibiteur de protéases .....	40
<b>10. RÉSULTATS .....</b>	<b>41</b>
10.1 Clonage et expression de topo I .....	42
10.2 Purification de topo I .....	45
10.3 Purification de topo I par électroélution .....	49
10.4 Purification des auto-anticorps .....	51
10.5 ELISA sur peptides de topo I.....	54
<b>11 DISCUSSION .....</b>	<b>58</b>
11.1 Expression de topo I .....	60
11.2 Purification de topo I .....	61
11.3 Purification des auto-anticorps anti-topo I.....	62
11.4 ELISA sur peptides de topo I.....	65
<b>12 CONCLUSION.....</b>	<b>66</b>
<b>13 RÉFÉRENCES .....</b>	<b>70</b>
<b>14 REMERCIEMENTS .....</b>	<b>75</b>



## 4 Liste des tableaux

Tableau I : Principales maladies auto-immunes.....2

Tableau II : Principales cibles des anticorps anti-nucléaires trouvés chez les patients sclérodermiques, leur fréquence et les manifestations cliniques associées.....10

Tableau III : Association entre la présence d'anti-Topol ou d'ACA dans le sérum et les troubles pulmonaires (TP).....14

## 5 Liste des figures

### Introduction

Figure 1.	Résumé des articles portant sur la détermination des épitopes immunodominants de la topo I par la méthode d'immunobuvardage.....	17
-----------	--	----

### Résultats

Figure 2 :	Clonage de la DNA topoisomérase I humaine dans le vecteur p-Cal-n-Flag.....	26
Figure 3 :	Expression de topo I recombinante dans les bactéries <i>E.coli</i> BL21 DE3.....	44
Figure 4 :	topo I recombinante purifiée à partir de lysats bactériens sur la résine d'affinité à la calmoduline.....	47
Figure 5 :	Immunobuvardage sur lysats bactériens utilisant les auto-anticorps anti-topo I purifiés.....	53
Figure 6 :	Réactivité de sérums de patients normaux et sclérodermiques sur peptides de topo I en ELISA : résultats individuels.....	56
Figure 7 :	Réactivité de sérums de patients normaux et sclérodermiques sur peptides de topo I en ELISA : résultats par groupes de patients..	57

## 6 Liste des abréviations

ACA : anticorps anti-centromères

ANA : anticorps anti-nucléaires

AP: atteinte pulmonaire

CMH: complexe majeur  
d'histocompatibilité

CREST : syndrome caractérisé par  
Calcinose, phénomène de Raynaud,  
atteinte oesophagienne,  
Sclérodactylie, Téliangiectasies

DLCO : Diffusing capacity for  
carbon monoxide

D.O: densité optique

FEV/VC : forced expiratory  
volume in one second/vital capacity

fmol : femtomole

FVC : forced vital capacity

HRCT : High Resolution  
Computed Tomography

IPTG: isopropyl-d-  
thiogalactopyranoside  
kb : kilobases

Kco: diffusing constant of carbon  
monoxide

kDa :kilodalton

mg :milligramme

ml : millilitre

mM :millimolaire

ng : nanogramme

nm :nanomètre

PLC :peptide liant la calmoduline

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SSC: Sclérodermie

TBS : Tampon tris- SDS

TLC : total lung capacity

topo I :topoisomérase I humaine

*Je souhaite dédier cet ouvrage à mes parents  
qui ont cru à mon rêve d'études supérieures depuis le début  
et qui m'ont soutenue durant tout ce long voyage.*

## 8 INTRODUCTION

### 8.1 LES MALADIES AUTO-IMMUNES

L'auto-immunité est définie par une réponse immunitaire dirigée contre des tissus ou des molécules du soi [Benjamini E, 1991]. Les maladies auto-immunes sont la manifestation chronique de cette réponse immunitaire inappropriée. Toutes sont caractérisées par la présence d'auto-anticorps circulants, mais les cibles tissulaires ou organiques diffèrent d'une maladie à l'autre (**Tableau 1**). De nombreuses questions au sujet de ces maladies restent toujours sans réponses : Comment les auto-anticorps sont-ils produits? En quoi ces auto-anticorps sont-ils différents des auto-anticorps naturels? Ont-ils des propriétés pathogéniques? Les causes menant à l'apparition de ces maladies restent un mystère. Les scientifiques s'entendent pour attribuer des causes génétiques et environnementales à nombre de ces maladies. D'autres hypothèses, telle une implication virale ou une anomalie du système apoptotique, sont assidûment étudiées.

L'étude de ces maladies se veut un important défi pour les pays industrialisés, puisque ce sont leurs populations qui en sont les plus atteintes et que le traitement de ces maladies entraîne des coûts élevés. De plus, résoudre le mystère de leur pathogenèse permettrait de comprendre celle d'autres maladies ainsi que le fonctionnement du système immunitaire dans toutes ses nuances.

**Tableau 1\*.** Principales maladies auto-immunes

<b>Maladies auto-immunes spécifiques d'organes</b>	
Système endocrinien	Maladie d'Hashimoto (thyroïde) Maladie de Graves (thyroïde) Diabète sucré Diabète sucré insulino-résistant Maladie d'Addison (glandes surrénales) Oophorite Orchite
Système hématopoïétique	Anémie hémolytique à auto-anticorps froids Anémie hémolytique à auto-anticorps chauds Neutropénie auto-immune Anémie pernicieuse Anémie pure Coagulopathies
Système neuromusculaire	Myasthénie grave Polyneuropathie Sclérose en plaques
Derme	Pemphigus
Système cardiopulmonaire	Cardite rhumatismale Syndrome de Goodpasture Syndrome de Dressler
<b>Maladies auto-immunes systémiques</b>	
Lupus érythémateux systémique Arthrite rhumatoïde Syndrome de Sjögren Polymyosite Dermatomyosite Sclérodermie (connectivite mixte)	

\* Inspiré de Paul W.E Fundamental immunology table 2 Chapitre 10

## **8.2 LA SCLÉRODERMIE**

Tout comme les autres maladies auto-immunes de type systémique, la sclérodermie, ou sclérose systémique, présente plusieurs symptômes, qui diffèrent par leur présence et leur intensité d'un malade à l'autre. Il importe donc de caractériser des sous-groupes de malades afin d'apporter le traitement approprié à chacun et peut-être même de prévenir l'apparition de nouveaux symptômes. La clé pourrait se trouver dans les types d'auto-anticorps circulants comme il sera discuté plus loin.

## **8.3 CLASSIFICATION DE LA SCLÉRODERMIE**

Il existe deux grandes catégories de sclérodermie : localisée et systémique [Mayes 1998]. La catégorie localisée est sous-divisée en cinq formes : en plaques, généralisée, bulleuse, linéaire et profonde. La catégorie systémique se sous-divise également en deux formes : limitée et diffuse.

## **8.4 PATHOGENÈSE DE LA SCLÉRODERMIE [Klippel, 1998]**

La catégorie de sclérodermie qui fait l'objet de ce mémoire est celle de type systémique. Elle est caractérisée par une accumulation excessive de collagène dans plusieurs organes et par la présence de lésions de l'endothélium

vasculaire. Les deux phénomènes sont accompagnés et pourraient même être causés par une réaction auto-immunitaire à la fois humorale et cellulaire.

#### **8.4.1 Atteinte cutanée**

L'atteinte cutanée est sans doute la plus remarquable des manifestations de la maladie. On retrouve une accumulation de fibres de collagène de type I et III dans la couche réticulaire du derme de même qu'un amincissement de la couche papillaire de la peau. Cette situation cause un rétrécissement de la peau et une diminution de l'élasticité générale, ce qui vaut le nom de « peau scléreuse », ou peau serrée, à la maladie. Au niveau pathologique, la maladie débute par une infiltration de lymphocytes T autour des vaisseaux cutanés. Progressivement le collagène produit par les fibroblastes s'accumule en se concentrant surtout autour des cellules adipeuses, des glandes et des follicules cutanés.

#### **8.4.2 Atteinte vasculaire**

Au niveau vasculaire, on remarque la prolifération de la couche intimale des artères et des artérioles. Il se produit également une diminution du nombre de capillaires cutanés (perte capillaire). Cependant, la raison de cette diminution reste inconnue. La dilatation des capillaires vasculaires est visible au niveau cutané par l'apparition de lésions télangiectasiques (marques rouges) sur les mains, la figure et la poitrine. L'atteinte vasculaire se manifeste également par le phénomène de Raynaud, défini par l'apparition d'une coloration blanchâtre (exsangue) des doigts lors de l'exposition au froid.



### **8.4.3 Atteinte cardiaque**

Le péricarde des sclérodermiques peut être épaissi suite à la fibrose de ce tissu tandis que le myocarde est affecté par la prolifération de l'intima des vaisseaux sanguins qui l'irriguent.

### **8.4.4 Atteinte gastro-intestinale**

Des organes qui composent le tractus gastro-intestinal, l'oesophage est celui qui est le plus fréquemment touché par la sclérodermie. La fibrose de même que l'infiltration de cellules immunitaires atteignent les couches sous-muqueuses et la lamina propria de cet organe. En conséquence, la couche de muscle lisse a tendance à s'atrophier. Il s'ensuit une diminution de la mobilité péristaltique et une béance du cardia qui, à son tour, conduit à une oesophagite de reflux.

### **8.4.5 Atteinte rénale**

Les vaisseaux des reins peuvent également être affectés par un épaississement de l'intima et un amincissement de la media. Les conséquences possibles sont une ischémie sévère (crise rénale sclérodermique), conduisant à une insuffisance rénale grave, ainsi que l'hémolyse microangiopathique, qui consiste en la destruction des globules rouges suite à leur passage dans la lumière réduite des vaisseaux sanguins du rein.

#### **8.4.6 Atteinte musculosquelettique**

Les muscles sont affectés par la diminution du nombre de capillaires et ceci se traduit par une faiblesse musculaire de degré variable. Les tendons sont la cible d'une accumulation de collagène et de fibrine, conduisant à des rétractions tendineuses limitant l'extension.

#### **8.4.7 Atteinte pulmonaire**

Cette manifestation de la sclérodermie est importante puisque les complications pulmonaires sont devenues les causes les plus fréquentes de décès [Lonzetti et al, 2002]. Au niveau histologique, la fibrose et les lésions vasculaires sont toutes deux observées chez les sclérodermiques. Cependant, les deux manifestations sont rarement présentes conjointement chez le même patient. La fibrose interstitielle est associée à la forme diffuse de la sclérodermie systémique et a pour conséquence une déficience des échanges gazeux [Murray, 1988] Au niveau pathologique, elle est associée à un épaissement de la cloison alvéolaire et à la prolifération du muscle lisse. Il est possible de la déceler par radiographie, et par tomographie pulmonaire assistée par ordinateur. Une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) et la présence d'un syndrome restrictif aux épreuves de la fonction pulmonaire sont également de bons indices de la présence de la maladie. Au niveau clinique, la fibrose interstitielle cause de la toux et de l'essoufflement qui limite l'activité physique. Dans les cas graves, les malades doivent subir une transplantation pulmonaire.

L'hypertension pulmonaire est quant à elle associée à la sclérodermie systémique limitée et au syndrome CREST (Calcinose, Raynaud, atteinte oesophagienne, Sclérodactylie, Télangiectasies). Il s'agit d'une élévation persistante de la pression artérielle pulmonaire. L'échocardiogramme est un outil pratique au diagnostic de l'hypertension pulmonaire. Au niveau clinique, elle se traduit par de la fatigue, des palpitations, et par un essoufflement durant l'exercice et éventuellement au repos. L'apparition d'une insuffisance cardiaque droite indique une hypertension pulmonaire sévère, habituellement mortelle.

## **8.5 ÉPIDÉMIOLOGIE**

La sclérodermie est une pathologie à nette prédominance féminine. En effet, le ratio femmes : hommes va de 3 :1 jusqu'à 8 :1, selon les études [Mayes, 1996]. Cette maladie touche davantage les gens âgés entre 45 et 55 ans, mais les jeunes enfants et les personnes plus âgées peuvent également être affectés [Arlett et al 1999]. Chez les Canadiens français, le ratio femmes : hommes est de 6 :1 [Lonzetti et al, 2002].

La prévalence de la sclérodermie varie d'un pays à l'autre. Elle serait plus élevée aux États-Unis que partout ailleurs, soit 19 cas par million [Mayes 1997]. Cette situation suggère une cause environnementale particulière à ce pays. La provenance ethnique est également un facteur déterminant. La population amérindienne Choctaws de l'Oklahoma démontre une prévalence

exceptionnellement élevée de 4690 cas par million, formant un bassin des plus intéressants pour étudier les facteurs génétiques influençant l'expression de la maladie. En effet, les allèles B35, Cw4, DRB1\*1602, DQ\*0501 et DQB1\*0301, propres à la population amérindienne, sont fortement associés à l'expression de la maladie. Enfin, la forme diffuse est plus fréquente dans la population afro-américaine que chez les caucasiens (70% des cas sont des femmes noires contre 30% pour les femmes blanches) [Mayes, 1997]. De même, les femmes noires développent la maladie plus tôt que les femmes blanches. Chez les Canadiennes françaises, le taux de survie de 10 ans après le diagnostic est de 62% dans la forme diffuse, 75% dans la forme intermédiaire, et 79% dans la forme limitée [Lonzetti et al, 2002]. Les principaux facteurs de mortalité sont la présence et la sévérité des atteintes rénales et pulmonaires.

## **8.6 LES AUTO-ANTICORPS [STEEN, 1996]**

On retrouve des auto-anticorps anti-nucléaires dans le sérum de 95 à 98% des sujets sclérodermiques. Des études ont identifié sept types d'auto-anticorps spécifiques à la maladie, et la présence de chacun peut être relié à des manifestations cliniques et une génétique particulières (**Tableau 2**).

Les deux auto-anticorps les plus fréquemment observés sont les anti-centromères (ACA) et les anti-topo I. Les anti-centromères sont associés à la forme limitée de la sclérodermie systémique ainsi qu'au syndrome CREST. Entre

50 et 95% des patients atteints de la forme limitée expriment cet auto-anticorps. Les anti-topo I sont quant à eux spécifiques de la forme diffuse de la sclérodermie systémique avec une fréquence de 20 à 33%. Cette forme est plus mortelle que la forme limitée et est caractérisée par un épaissement de la peau plus sérieux et des problèmes pulmonaires, cardiaques et rénaux accrus.

Le troisième auto-anticorps le plus fréquent sont les auto-anticorps anti-ARN polymérase de type I, II et III. Le rôle de la ARN polymérase de type I est la transcription des gènes ribosomiaux et celle de type II est la transcription des gènes codant pour des protéines. Enfin, l'ARN polymérase de type III joue un rôle dans la transcription des ARNs stabilisateurs tel l'ARN de transfert [Kuwana et al, 1998]. Les anticorps des patients sclérodermiques peuvent reconnaître plus d'une classe de ARN polymérase mais la combinaison ARN polymérase I-III est la plus fréquente. La présence de ces auto-anticorps est associée à la forme diffuse de la sclérodermie et à une plus haute fréquence de troubles rénaux.

**Tableau 2\*** : Principales cibles des anticorps anti-nucléaires trouvés chez les patients sclérodermiques, leur fréquence et les manifestations cliniques associées

Auto-antigène reconnu	Localisation cellulaire	Fonction de l'auto-antigène	Fréquence de l'auto-anticorps chez tous les sclérodermiques	Sous-type clinique le plus fréquent	Organes impliqués
Centromère	Nucléolaire	Mouvement des chromosomes mitotiques	25%	Limitée (50%)	Tractus gastrointestinal, hypertension pulmonaire
DNA Topoisomérase I	Nucléolaire	Relaxation de l'ADN superenroulé	22%	Diffuse (32%)	Fibrose pulmonaire, ischémie digitale
RNA polymérase III	Nucléolaire	Transcription des gènes en RNA	23%	Diffuse (45%)	Peau et reins
U1 RNP	Nucléaire	"Splicing" de l'ARN (spliceosome)	10%	Limitée (39%)	Muscles, articulations, leucopénie
Pm-Scl	Nucléolaire	Formation préribosomale (probable)	4%	Limitée (9%)	Muscles, articulations
Th/To RNP	Nucléolaire	Biogenèse ribosomale	9%	Limitée (15%)	Gonflement des mains, phénomène de Raynaud
U3RNP (Fibrillarine)	Nucléolaire	Maturation du RNA ribosomal	9%	Diffuse (56% afro-américains)	Muscles, hypertension pulmonaire

\* Inspiré de Steen et al 1996 Tableau 2    \*\* Selon Okano et al 1996    \*\*\* Selon Tan et al 1988

## 8.7 L'ADN TOPOISOMÉRIASE I

La topo I est une enzyme nucléaire dont l'activité consiste en la relaxation de l'ADN surenroulé. Pour ce faire, il effectue une coupure sur un des brins [Stewart et al, 1998]. L'enzyme s'attaque au pont phosphodiester via un résidu tyrosine catalytique et reste ensuite liée à l'extrémité 3' par un lien covalent. Le lien enzyme-phosphodiester étant de niveau d'énergie comparable au pont phosphodiester original, le lien peut être rétabli après que le bout libre d'ADN se soit déroulé [Nash, 1998].

La molécule de topo I est composée de quatre domaines soit la partie NH<sub>2</sub> terminale, le corps, le domaine de liaison et la partie COOH terminale, dans laquelle est situé le résidu catalytique tyrosine [Redinbo et al, 1998]. Le corps et la partie COOH terminale sont essentielles à l'activité catalytique et par conséquent parfaitement conservées au cours de l'évolution. Comme le domaine de liaison et la partie NH<sub>2</sub> terminale ne sont pas requis à la tâche de l'enzyme, leurs séquences codantes présentent davantage de polymorphisme.

Dans la cellule en phase S, la topo I est localisée dans le nucléole, où elle participe au processus de transcription de l'ARN en coupant le près des régions codantes. Son activité catalytique peut alors être augmentée par phosphorylation [Meyer et al, 1997]. Durant la mitose, elle reste liée aux chromosomes mais son

activité est diminuée suite à une hyperphosphorylation, probablement sur un site additionnel encore inconnu.

La topo I est surtout étudiée comme cible de médicaments anticancéreux tels la camptothécine [Holden et al, 1997]. Ce médicament stabiliserait le complexe enzyme-ADN et celui-ci interfèrerait avec la réplication, causant un dommage à l'ADN et déclenchant l'apoptose.

## **8.8 LES AUTO-ANTICORPS ANTI-TOPO I**

### **8.8.1 Identification et association avec la fibrose pulmonaire**

En 1979, l'équipe de Douvas [Douvas et al, 1979] fait la découverte suivante : les sérums de 5 malades sclérodermiques démontrent une réaction de précipitation identique lorsqu'incubés avec un extrait de noyaux de cellules hépatiques de rat. Afin d'identifier l'élément nucléaire à l'origine de cette réaction, l'équipe repère la protéine dans une fraction du noyau par immunodiffusion et l'isole par immunoprécipitation. La protéine ainsi isolée a été nommée Scl-70, du fait de son poids moléculaire apparent. Par la suite, des études statistiques ont révélé une corrélation entre la présence des anti-Scl-70 chez les malades et une atteinte pulmonaire. En effet, une grande proportion des sujets porteurs d'anti-Scl-70 démontrent une fibrose interstitielle, alors que les patients anti-centromères positifs tendent plutôt à développer de l'hypertension pulmonaire



[Catoggio et al, 1984]. Ces tendances ont été confirmées par une série d'études, dont les résultats sont compilés au **tableau 3**.

**Tableau 3 : Association entre la présence d'anti-topo I ou d'ACA dans le sérum et les troubles pulmonaires (TP)**

Auteurs	Détection des AP	anti-topo I +/- AP+	ACA+/AP+	Commentaires
Catoggio et al, 1984	Radiographie du thorax DLCO < 75% de la valeur médiane	75%	34%	AP= atteinte pulmonaire
Manoussakis et al, 1987	FEV1/VC TLC DLCO	77%	0%	AP= atteinte pulmonaire
Steen et al, 1988	Radiographie du thorax FVC < 80% de la valeur médiane	48%	22%	AP= fibrose interstitielle
Briggs et al, 1991	Radiographie du thorax HRCT	57%	N/A	AP= fibrose pulmonaire
Kane et al, 1996	Radiographie du thorax TLC < 80% de la valeur médiane FEV1	38%	0%	AP= fibrose pulmonaire anti- topo I+/anti-topo I- DLCO est non significatif
Jacobsen et al, 1997	DLCO FEV1/VC Changement de VC par année Changement du Kco au suivi	36%	13%	AP= fibrose pulmonaire
Diot et al, 1999	HRCT, TLC, DLCO	46 à 58%	N/A	AP: atteinte pulmonaire

FVC : forced vital capacity

DLCO : Diffusing capacity for carbon monoxide

FEV1/VC : forced expiratory volume in one second/vital capacity

Kco : diffusing constant of carbon monoxide

HRCT : high-resolution computed tomography

N/A : non disponible

TLC : total lung capacity

En 1986, Scl-70 fut identifié comme étant un fragment protéolytique de la topo I [Shero et al, 1986]. En effet, lorsque les sérums anti-Scl-70 étaient analysés par immunobuvardages sur des extraits de cellules humaines HeLa, l'antigène identifié était de poids supérieur à 70 kDa, soit 100 kDa. Ces deux classes de poids moléculaires ressemblant à celles trouvées pour topo I [Liu et al, 1981], celle-ci fut étudiée comme candidate. Son identité fut confirmée par la liaison des sérums anti-Scl-70 positifs sur la topo I bovine purifiée. Dans le même article, il a été démontré que l'ajout de sérums anti-Scl-70 positifs à un extrait de chromosomes mitotiques pouvait inhiber l'activité de topo I.

### **8.8.2 Clonage et expression du gène de la topo I**

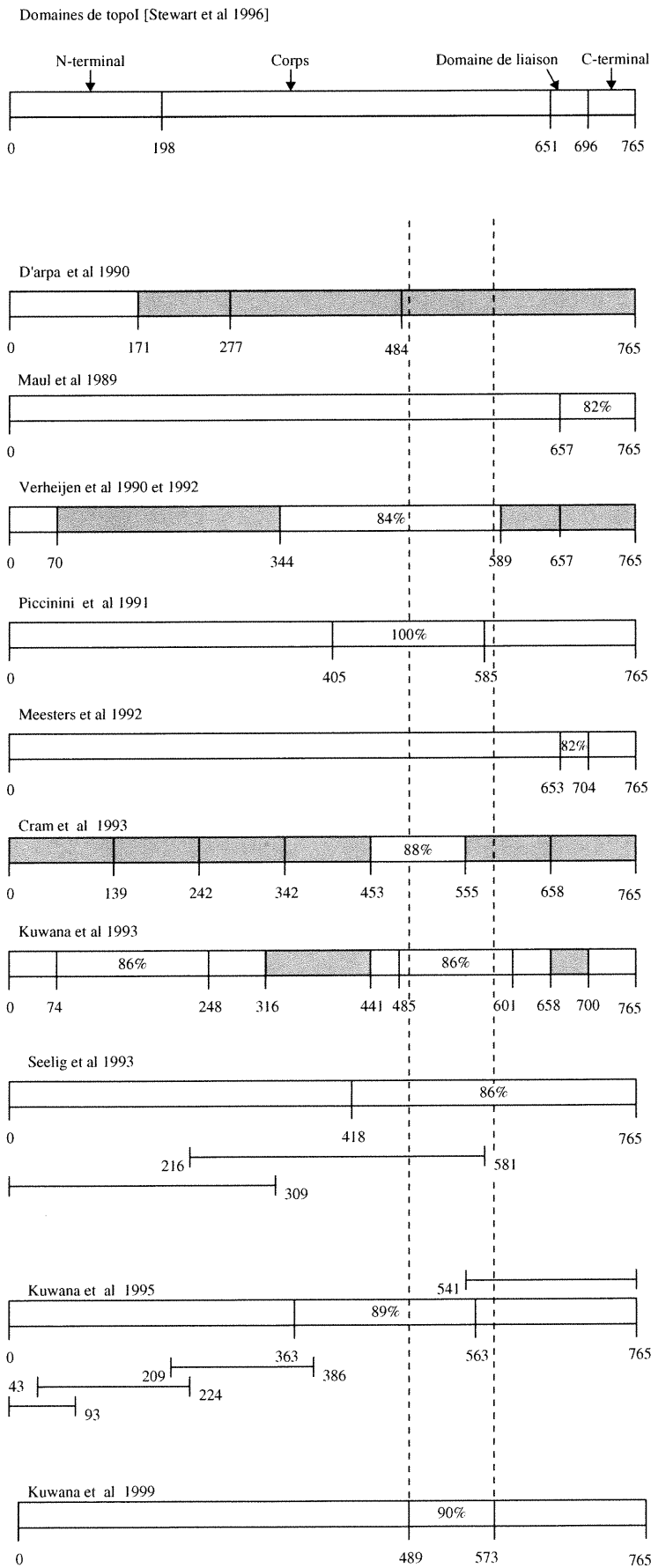
En 1988 une partie du gène de topo I est clonée à partir d'une banque de cDNA [D'Arpa et al, 1988]. De plus, un fragment de 67.7 kDa de la portion COOH terminale de topo I fut exprimé dans un vecteur d'expression en protéine de fusion avec la TrpE bactérienne (32 kDa). Puisque le fragment exprimé avait conservé l'activité catalytique de la protéine complète, il fut déduit que le site catalytique était contenu dans la portion COOH-terminale. Une portion du cDNA fut utilisée comme sonde sur de l'ADN génomique humain et a permis de conclure que la topo I était codée par un seul locus.

En 1990, la même équipe a tenté d'exprimer la protéine pleine longueur dans un système bactérien [D'Arpa et al, 1990] mais cette production a été marquée par une protéolyse importante. L'hypothèse expliquant ce phénomène serait un

dérangement de l'homéostasie de l'ADN surenroulé de la bactérie par la protéine nouvellement produite. Plusieurs équipes ont tenté la même expérience et chaque fois, le phénomène de protéolyse a été observé [D'Arpa et al, 1990, Cram et al, 1993, et Seelig et al, 1993]. Toutefois, topo I ne semble pas subir de protéolyse lorsqu'elle est exprimée dans un système baculovirus et purifiée [Whyte et al, 1995]. Bien qu'offrant un bon rendement, cette technique demeure coûteuse par rapport au système bactérien. Il est également possible que topo I possède des sites sensibles à la dégradation puisque des fragments de dégradation ont été observés lors de la purification de la protéine native à partir de thymus de veau lorsque les échantillons avaient été congelés et décongelés plusieurs fois [Gregory et al, 1990].

### **8.8.3 Identification des épitopes reconnus par les anti-topo I**

L'équipe de D'Arpa a également essayé de définir des épitopes majoritairement reconnus par le sérum des patients sclérodermiques [D'Arpa et al, 1990]. Pour ce faire, différents fragments de la protéine ont été sous-clonés et la réaction des sérums mesurée en immunobuvardage sur les lysats de bactéries exprimant les différents fragments. Un total de six épitopes indépendants a pu être identifié de cette façon. Par la suite, nombre d'articles ont entrepris de définir davantage les épitopes immunodominants de topo I par le sous-clonage de différents fragments. Un résumé des résultats de ces articles se trouve à la **Figure I**.



**Figure 1**  
**Résumé des articles portant sur la détermination des épitopes immunodominants de la topo I par la méthode d'immunobuvardage.**

Le pourcentage représente la fréquence de réactivité la plus élevée de la population testée pour l'épitope indiqué. Les régions ombragées indiquent les autres épitopes ayant été testés tandis que les régions claires indiquent les régions non-testées. Les bandes minces représentent les épitopes chevauchants ayant été testés.

À l'exception de l'article de Maul et al et de celui de Meesters et al, tous les articles contiennent au moins une partie de la région 489-573, déterminée par Kuwana et al en 1999 comme épitope immunodominant. Cette région correspond à une partie du corps de la protéine. Les articles de Maul et de Meesters désignent le domaine de liaison de la protéine comme étant immunodominant.

Une équipe de recherche a récemment utilisé des peptides synthétiques et chevauchants de topo I afin de détecter les épitopes par ELISA [Rizou et al, 2000]. Un total de 63 peptides de 20 acides aminés a été synthétisé sur des tiges de polyéthylène et un premier test ELISA effectué avec 14 sérums anti-topo I positifs. Quatre peptides démontrant une plus grande réactivité ont été synthétisés en solution puis analysés en ELISA avec un plus grand nombre de sérums anti-topo I positifs. Une étude statistique a démontré que les malades dont le sérum réagissait à au moins 3 de ces épitopes étaient plus souvent atteints de fibrose pulmonaire interstitielle que les autres. De plus, la présence de réactivité contre au moins 3 épitopes offrait une meilleure discrimination pour la détermination du risque de développer la fibrose pulmonaire interstitielle que la simple réactivité anti-topo I détectée par immunofluorescence ou contre-immunoélectrophorèse.

#### **8.8.4 Mécanismes de production des anti-topo I**

Même si la cause de la sclérodermie demeure inconnue, des découvertes sur le mécanisme d'apparition des auto-anticorps permettent de réduire le champ de recherche. Ainsi, il fut découvert [Kuwana et al, 1995] que l'incubation de cellules T en présence de topo I recombinante pouvait stimuler leur prolifération chez les donneurs sains (62%) comme chez les patients sclérodermiques anti-topo I positifs (96%) et négatifs (40%). Bien que cette réaction ait été retardée chez les anti-topo I négatifs et les donneurs sains et qu'elle n'ait été retrouvée que chez

les sujets HLA DR15, DR11 ou DR7 positifs, elle prouve néanmoins l'existence d'un répertoire normal de cellules T anti-topo I.

Il a également été découvert que la collaboration des cellules B et T par la liaison CD40-CD40 ligand est nécessaire à la production d'anticorps anti-topo I, puisque celle-ci a été inhibée lorsque les deux groupes ont été séparés par une membrane semi-perméable ou incubés en présence d'anticorps monoclonal anti-CD40 ligand [Kuwana et al, 1995].

La production d'anticorps anti-topo I semble dépendante de la présence de l'antigène puisqu'elle se retrouve augmentée chez des patients sclérodermiques ayant développé un cancer du poumon caractérisé par une surexpression de topo I [Kuwana et al, 1996]. Comme la présence d'anticorps anti-topo I n'a pas été détectée chez les patients atteints de cancer mais non de sclérodermie, il faut chercher un facteur menant à l'apparition des auto-anticorps autre que la simple surexpression de l'antigène.

Dans deux articles de Kuwana et al, les cellules T réactives à topo I de patients sclérodermiques ont été isolées et caractérisées. Elles semblent privilégier des allèles particuliers de réarrangements du récepteur tels V $\delta$ 5, V $\beta$ 20.1a et J $\beta$ 1.1 [Kuwana et al, 1997]. De plus, les cellules T capables d'induire la production d'anticorps anti-topo I chez les cellules B produisent de l'IL-2 et de l'IL-6 et peuvent donc appartenir au groupe Th1 ainsi que Th2. Les cellules T de

donneurs sains n'ont pas été en mesure de stimuler la production d'anti-topo I des cellules B à moins de posséder les même allèles du CMH classe II que la cellule B [Kuwana et al, 2000].

Certains articles se sont appliqués à étudier différentes hypothèses sur la cause de la sclérodémie. L'équipe de Casciola-Rosen a étudié le rôle de l'oxydation médiée par les métaux dans la production d'auto-anticorps [Casciola-Rosen et al, 1997]. En condition d'ischémie, ce mode d'oxydation est activé dans les cellules et donne lieu à une fragmentation unique des protéines. Par exemple, l'oxydation de la topo I en présence de fer génère un fragment majeur de 95 kDa ainsi que plusieurs fragments situés entre 65 et 90 kDa. Le phénomène de fragmentation peut également se produire dans les cellules chroniquement exposées à une concentration supraphysiologique de cuivre. Selon eux, les patients sclérodermiques présenteraient soit une accumulation cellulaire anormale de métaux ou des épisodes d'ischémie-reperfusion favorisant l'oxydation catalysée par les métaux des protéines nucléaires spécifiques de la sclérodémie. Les auto-anticorps seraient un marqueur physiologique de la fragmentation des protéines induites par l'ischémie.

Le rôle de l'apoptose dans l'établissement de la sclérodémie est également étudié. Il a été rapporté que l'enzyme de conversion de l'interleukine- $\beta$  ou ICE était responsable du clivage de nombreuses protéines intranucléaires lors du déclenchement de l'apoptose, dont plusieurs sont des antigènes cibles de la



sclérodermie [Casiano et al, 1996]. Fait intéressant, le fragment de topo I clivé par la protéine ICE est de 70 kDa, soit le poids supposé de topo I lorsqu'elle a été découverte [Douvas et al, 1979]. Au niveau fonctionnel, le clivage de ces protéines permettrait de rendre irréversible le processus de mort puisque ces protéines veillent à la réparation ou au maintien de la conformation de l'ADN. Cependant, le rôle de ce phénomène dans la genèse des auto-anticorps de la sclérodermie reste à déterminer.

La régulation de la population de lymphocytes circulants par apoptose semble jouer un rôle dans l'établissement de certaines maladies immunes. Par exemple, des mutations des récepteurs Fas ou Fas ligand chez la souris donnent lieu à des manifestations semblables au lupus, tout comme une mutation des gènes Bcl-2 ou Il-2 [Grodzicky et al, 2000]. Chez les patients sclérodermiques, les fibroblastes démontrent une résistance à l'apoptose par surexpression du gène Bcl-2, ce qui pourrait expliquer la surproduction de collagène dans cette maladie [Grodzicky et al, 2000].

La grande similarité des symptômes entre la maladie greffe versus hôte et la sclérodermie de même que l'observation de cellules foetales persistantes en circulation chez les mères ont mené à l'hypothèse du microchimérisme. Selon cette hypothèse, les cellules foetales ne pourraient pas être reconnues comme étrangères par le système immunitaire du fait de leur compatibilité CMH classe II. Un facteur inconnu pourrait activer les cellules foetales et causer une maladie

greffe versus hôte chronique. Cette thèse est appuyée par la découverte de cellules foetales en circulation chez une femme 27 ans après la grossesse et la détection de cellules de type chromosome Y+ et CD3+ chez trois femmes sclérodermiques [Arlett et al, 1999]. Cependant, cette hypothèse explique mal la survenue de la sclérodermie chez les hommes, chez les enfants ou chez les femmes n'ayant jamais été enceintes.

## **8.9 BUT DE L'ÉTUDE**

Le présent projet vise l'obtention de la topo I humaine recombinante complète à l'aide d'un système bactérien. La production de la protéine complète en grande quantité et sa purification visent 2 objectifs : Le premier objectif visé est la purification, à partir des sérums de sujets sclérodermiques, des auto-anticorps dirigés contre cette protéine. L'association entre la présence des auto-anticorps anti-topo I et la fibrose pulmonaire chez les sclérodermiques est réelle mais la cause reste à élucider. La purification des auto-anticorps anti-topo I permettrait de déterminer si leur présence est nécessaire ou accessoire au développement de la fibrose pulmonaire. Pour ce faire, il s'agirait de déterminer la cible extracellulaire des anti-topo I et aussi d'analyser leur effet sur une culture cellulaire de provenance pulmonaire ou épithéliale.

Le second objectif visé est d'utiliser la topo I purifiée afin de mettre au point une technique ELISA pour mesurer les anti-topo I chez les sujets sclérodermiques ou

atteints d'autres maladies. Le but est de remplacer le test ELISA présentement utilisé et dont l'antigène est la topo I bovine commerciale, qui est semi-purifiée à partir de thymus de veau (Immunovision, Springdale AR). Ce remplacement est souhaitable puisque le degré de pureté de l'antigène de même que son origine xénologue peuvent nuire à la détection des auto-anticorps anti-topo I dont le titre ou la spécificité est faible. La topo I purifiée à partir de thymus de veau a également le désavantage d'être une molécule incomplète (poids moléculaire de 70 kDa). La protéine purifiée par le présent système étant complète (poids moléculaire de 100 kDa), son utilisation permettrait l'identification de nouveaux épitopes, soit conformationnels ou absents de la molécule bovine.

## 9 Matériel et Méthodes

## 9 MATÉRIEL ET MÉTHODES

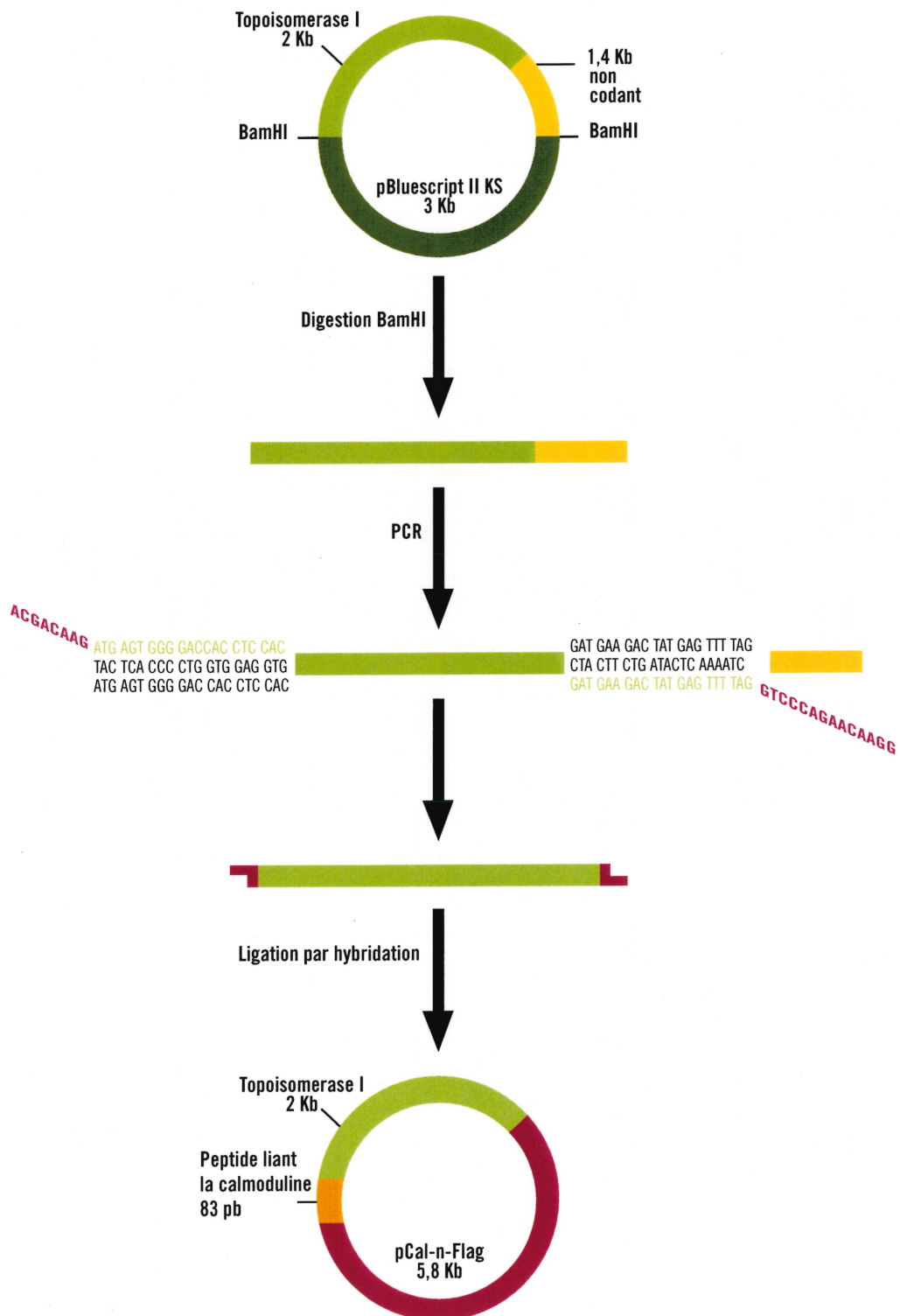
### 9.1 SOUS-CLONAGE DE TOPO I

Un fragment contenant l'ADN de la topo I humaine a été retiré du plasmide pBluescript II KS (don généreux du Dr William Earnshaw, Université d'Édimbourg) par une digestion BamH1/ BamH1 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont UK), donnant un fragment de 3.4 kB (**Figure 2**). Ce fragment a été purifié et dosé à l'aide de la trousse Concert rapid gel extraction system (Life Technologies, Rockville MO) sur la bande découpée d'un gel d'agarose. La séquence codante de la topo I a ensuite été amplifiée du fragment de 3.4 kB par PCR : un aliquot de 150 ng du fragment purifié a été amplifié durant 35 cycles sur modèle Robocycler Gradient 40 (Stratagene, La Jolla CA) selon les paramètres suivants : 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 55 °C et 2 minutes 30 secondes à 68°C. Le mélange réactionnel était constitué de tampon d'amplification Pfx 1X (Life technologies), 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3 mM chacun de dATP, dGTP, dCTP et dTTP, 2.5 unités de Pfx ADN polymérase et 0.3 mM des amorces suivantes :

sens : GACGACGACAAGATGAGTGGGGACCCACCTCCAC

antisens : GGAACAAGACCCTGTAAACTCATAGTCTTCATC

**Figure 2:** Clonage de la topo I dans le vecteur pCal-n-Flag



Le fragment de 2.4 kB généré par l'amplification a été dosé sur gel d'agarose et purifié. Pour la ligation dans le vecteur pCal-n-flag (Stratagene), 100 fmol de ce fragment ont été mis en présence d'une unité de Pfx Taq polymérase, de 10 mM de dATP et incubés 15 minutes à 72°C et 2 minutes sur glace. Ensuite 20 ng du vecteur pCal-n-flag ont été ajoutés et le mélange a été incubé durant 16 heures à température ambiante. Le processus du clonage indépendant de la ligation (Stratagene, Affinity LIC cloning and protein purification kit : Instruction manual 1999) utilise la propriété exonucléasique de l'enzyme Taq polymérase (Pfx) pour digérer en 5' les bouts de topo I amplifié de façon à ce qu'ils soient complémentaires à ceux du vecteur. L'ajout dans le milieu de dATP permet la digestion jusqu'au premier résidu dAMP rencontré. Suite au traitement à la Pfx, la ligation du fragment au vecteur a lieu et le produit est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* Solopack Gold (Stratagene).

La transformation a eu lieu de la façon suivante : des aliquots de 50 µl de bactéries ont été décongelés sur glace. Différentes concentrations du vecteur ligué ont été ajoutées et le mélange incubé sur glace pendant 30 minutes. Les bactéries ont subi un choc thermique de 30 secondes à 42°C avant d'être incubées sur glace pendant 2 minutes. Puis 500 µl de milieu M9ZB (voir section 9.8) ont été ajoutés à chaque tube, qui ont été incubés à 37 °C pendant 1 heure. Les bactéries ont été sédimentées par une centrifugation de 2 minutes à 5000 x g et resuspendues dans 100 µl de milieu M9ZB frais. Le contenu de chaque tube

a été étalé sur gel d'agar ZB (voir section 9.8) additionné de 100 µg/ml de carbénicilline (Boehringer-Mannheim, Indianapolis IN). Les pétris ont été incubés à 37°C durant 16 heures. Des colonies ont été sélectionnées et repiquées à la fois sur pétri et dans 4 mL de milieu M9ZB contenant 100 µg/ml de carbénicilline. Elles ont ensuite été incubées à 37°C pendant 16 heures. Les incubations en milieu liquide ont été réalisées dans un incubateur de table Orbital-Environ Shaker Modèle 3527 (Lab-line, Melrose Park IL).

La présence de l'insert chez les clones produits a été vérifiée par isolement du plasmide (miniprep) à partir des cultures liquides avec la trousse High pure plasmid Isolation kit (Boehringer-Mannheim) et par une digestion avec XhoI (Amersham Pharmacia Biotech). Nous avons ensuite transformé des *E. coli* BL21 DE3 (Novagen, Madison WI) de la même façon que les *E. coli* Solopack Gold avec le plasmide ainsi isolé. Dix colonies ont été choisies et mises en culture sur pétri et en milieu liquide. Une miniprep a été réalisée sur les clones et les vecteurs dosés sur gel d'agarose afin de sélectionner le clone ayant la plus grande concentration de vecteur. Ce clone a été mis en culture à 37°C pendant 16 heures dans un volume de 50 mL de M9ZB additionné de 100 µg/mL de carbénicilline. Ce volume a ensuite été dilué dans une proportion de 1 :5 dans 4 mL de M9ZB additionné de carbénicilline frais et réincubé à 37°C jusqu'à une D.O<sub>600</sub> de 0.6. La suspension a été divisée en deux et à chaque tube ont été ajoutés 100 µl de glycérol. Les tubes ont été conservés à -80°C.



## **9.2 EXPRESSION DE TOPO I**

À chaque induction, une petite quantité de la culture congelée était grattée et diluée dans 4 ml de milieu M9ZB ou LB additionné de 100µg/mL de carbénicilline. Les tubes étaient incubés 16 heures à 25°C puis dilués 1/100 dans du milieu frais contenant la même concentration de carbénicilline. La culture était réincubée à 37°C jusqu'à une D.O<sub>600</sub> d'environ 0.8 et induite avec 1 mM d'isopropyl-d-thiogalactopyranoside (IPTG) à 25°C durant quatre heures, avant d'être récoltée par centrifugation à 2000 x g. Les culots étaient lavés avec un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8.0 et divisés en culots équivalents à 125 mL de culture. Les tubes étaient plongés dans l'azote liquide et conservés à - 80°C.

## **9.3 EXTRACTION DE TOPO I**

### **9.3.1 Pour la purification par affinité**

Les culots bactériens équivalents à 10 ml de culture ont été décongelés sur glace et resuspendus dans 1.9 ml de B-Per (Pierce, Rockford IL), une solution d'extraction des protéines bactériennes contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (voir section 9.8) ainsi que 200 µg/mL de lysozyme (Boehringer-Mannheim). La suspension a été incubée 20 minutes avec agitation à température ambiante puis centrifugée 10 minutes à 27 000 x g. Le surnageant a été concentré par une série de centrifugations de 20 minutes à 1500 x g au travers d'un filtre Ultrafree 30k (Millipore Corporation, Bedford MA) jusqu'à un

volume d'environ 300  $\mu$ l. L'opération a été répétée à 3 reprises en ajoutant à chaque fois 4 ml de tampon de liaison pour la résine calmoduline (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1mM imidazole, 1 mM MgAc, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) afin de changer le tampon contenant le lysat bactérien.

### **9.3.2 Pour l'électroélution**

Quatre culots équivalents chacun à 125 mL de culture ont été décongelés puis resuspendus deux à deux dans 30 mL de 50mM Tris-HCl pH 8.0. Après l'ajout de 400  $\mu$ l d'une solution mère de lysozyme (Boehringer-Mannheim) 10mg/ml, la solution a été incubée 30 min à la température de la pièce. Par la suite, 200  $\mu$ l de Triton X-100 (Sigma, St-Louis MO) ont été ajoutés. Le tout était soniqué sur glace durant 30 secondes avec des intervalles de repos de 30 secondes et ce pendant 20 minutes. La solution ainsi soniquée a ensuite été centrifugée à 27 000 x g durant 15 minutes. Le surnageant (fraction soluble) était jeté et le culot (fraction insoluble) conservé à -20° jusqu'à utilisation.

## **9.4 PURIFICATION DE TOPO I**

### **9.4.1 Par affinité avec les billes liant la calmoduline**

L'équivalent de 1,5 ml de culture bactérienne a été incubé en présence de 50  $\mu$ l de résine d'affinité à la calmoduline (Stratagene) avec agitation pendant 16 heures à 4°. La résine avait été préalablement équilibrée avec le tampon de

liaison (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1mM imidazole, 1 mM MgAc, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) par 4 lavages de 200  $\mu$ l. Le surnageant a été recueilli par centrifugation à 2000 x g pendant 1 minute. Le surnageant recueilli constitue la fraction non-liée. Le culot de billes a été lavé 2 fois avec 300  $\mu$ l de tampon de liaison et 2 fois avec du tampon de liaison contenant 0.2 mM de CaCl<sub>2</sub>. La protéine de fusion a été éluée par 3 applications de 200  $\mu$ l de tampon d'éluion (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol , 5 mM EGTA) et 3 applications de 200  $\mu$ l de tampon d'éluion contenant 1 M NaCl.

#### **9.4.2 Par électroéluion**

Les 2 culots recueillis à l'étape de l'extraction ont été resuspendus chacun dans 1 mL de SSB 2X (voir section 7.9) puis bouillis pendant 10 minutes. Après avoir été bien resuspendus, les mélanges ont été mis sur gels préparatifs SDS-Polyacrylamide 8% de 18 x 24 cm. Le marqueur coloré de marque Kaleidoscope (Bio-Rad, Hercules CA) a été ajouté dans les puits encadrant le puits préparatif. La migration a été interrompue dès la sortie du front de migration. Une bande verticale a été découpée au centre de chaque gel et colorée au bleu de Coomassie selon la méthode décrite dans la section 9.5.1. À l'aide de la bande ainsi colorée et des marqueurs colorés visibles dans le gel, une bande située à environ 100 kDa a été découpée et placée 30 minutes à -20°C. La bande a été découpée en carrés d'environ 3 x 3 mm et les morceaux séparés en 4 parties égales pour être placés dans 4 tubes de la machine à électroéluion Electro-eluter modèle 422 (Bio-Rad). L'électroéluion s'est déroulée durant 4 heures et le

tampon d'électroélution TBS 1X (Bio-Rad) a été changé à la mi-temps. Le tampon a été échangé contre un tampon ne contenant pas de SDS (25 mM Tris pH 7.4, 192 mM glycine) et l'électrodialyse effectuée pendant une heure. Le liquide contenu dans les adaptateurs a été entièrement récupéré et les membranes ont été rincées avec 100 µl de tampon sans SDS. Le tout a été regroupé et concentré sur un filtre Ultrafree 30k (Millipore Corporation).

## **9.5 ANALYSE DE LA PURIFICATION DE TOPO I**

### **9.5.1 Coloration au bleu de Coomassie**

Les fractions ont été mises sur un gel SDS-Polyacrylamide 8% (voir section 9.8). Le gel a été déposé dans 150 ml de la solution de coloration (0,05% bleu de Coomassie R-250, 25% isopropanol, 10% acide acétique) et chauffé au micro-onde à puissance maximale pendant 2 minutes. Après une période de refroidissement d'environ 5 minutes, le gel a été rincé à l'eau et chauffé dans 10% d'acide acétique pendant 2 minutes [Wong et al, 2000].

### **9.5.2 Immunobuvardage**

Les fractions ont été mises sur un gel SDS-Polyacrylamide 8% et les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Bio-Rad) pendant 1 h à 25 V au moyen d'un Trans-Blot SD (Biorad). La membrane et le gel avaient été préalablement trempés dans un tampon de trempage (150 mM Tris pH 8.3, 192 M glycine, 20% méthanol) pendant environ 30 minutes à 4°C. Suite au

transfert, la membrane a été incubée pendant 16 heures à 4°C dans un tampon de blocage (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,5% Tween-20, 5% lait écrémé en poudre). La membrane a été incubée durant une heure avec le tampon de blocage contenant un anticorps monoclonal murin anti-topo I (don généreux du Dr Igor Bronstein, University of York) dilué 1 :350 et lavée 4 fois 5 minutes avec le tampon de blocage sans lait. Puis la membrane a été incubée avec un anticorps de chèvre anti-IgG murin conjugué à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA) à une dilution de 1 :20 000 dans le tampon de blocage. La membrane a été de nouveau lavée avec le tampon de blocage sans lait et incubée 5 minutes avec le réactif Enhance Chemiluminescence; SuperSignal West Pico (Pierce) et visualisée par révélation sur film rayon-X X-OMAT (Kodak, Rochester NY).

## **9.6 PURIFICATION D'AUTO-ANTICORPS ANTI-TOPO I**

Cette expérience est une adaptation du protocole de Mayer et al [Mayer et al, 1996]. Les éluats concentrés recueillis suite à l'électroélution ont été dosés par densitométrie assistée au moyen du logiciel Alphamager. Les éluats ont été regroupés et concentrés davantage sur Ultrafree 30k (Millipore Corporation). L'équivalent de 40 µg de topo I complète (100 kDa) a été obtenu dans un volume de 75 µl. Par la suite, un carré de 1 cm<sup>2</sup> de nitrocellulose 0,45 µm (Bio-Rad) a été découpé. L'éluat concentré y a été appliqué 10 µl à la fois et séché entre

chaque application à 41°C dans un incubateur de table de type Orbital-Environ Shaker Modèle 3527 (Lab-line). La membrane a ensuite été rincée à l'eau puis bloquée pendant 16 heures dans un tampon de blocage (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5% lait).

La membrane a été incubée durant 8 heures à la température ambiante avec le sérum anti-topo I positif d'un patient sclérodermique (sérum 3693) dilué 1/150 dans le même tampon de blocage. Le tampon de blocage additionné du sérum a été conservé à 4°C et la membrane a été rincée 3 fois avec du tampon de blocage. Puis les anticorps liés ont été élués par incubation de la membrane avec 1 ml de la solution d'éluion (0.5 mM Tris pH 7.5, 6 M guanidine-HCl) durant 16 heures à 4°C.

La solution d'éluion a été prélevée et la membrane a été rincée à l'eau et bloquée durant 1 heure avec le tampon de blocage à température pièce puis réincubée durant 8 heures avec le tampon de blocage additionné du sérum utilisé la veille. Après le rinçage, les anticorps liés ont été à nouveau élués par incubation de la membrane avec 1 ml de la solution d'éluion, et la solution d'éluion regroupée avec celle recueillie la veille.

Les éluats regroupés ont été dialysés contre 0.5 mM Tris-HCl pH 7.5 durant 48 heures avec de fréquents changements de tampon. Le tampon du dialysat était échangé contre du PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4). par une série de dilution/concentration sur Ultrafree 30k (Millipore Corporation). Le volume total obtenu a été de 150  $\mu\text{l}$  et, de ce volume, 3  $\mu\text{l}$  ont été prélevés pour doser la quantité d'anticorps par ELISA.

### **9.6.1 Dosage des auto-anticorps purifiés**

Une courbe standard a été établie en utilisant des IgG humains (Sigma) de concentrations s'échelonnant entre 2 et 100 ng/100  $\mu\text{l}$  de PBS dans une plaque de 96 puits en polystyrène de type Immulon II (Dynex Technologie, Chantilly VA). Deux puits ont été utilisés pour adsorber le contenu de 1  $\mu\text{l}$  et de 2  $\mu\text{l}$  de la purification d'anticorps, soit 0,6% et 1,3 % du volume total. L'adsorption s'est déroulée durant 16 heures à 4°C. Après quatre lavages de 2 minutes avec le tampon de lavage (PBS, 0,5% Tween-20) les puits ont été bloqués pendant deux heures à température ambiante avec 200  $\mu\text{l}$ /puits de tampon de blocage (PBS, 10% sérum de chèvre, 2% caséine). Les puits ont été lavés 4 fois pendant 2 minutes avec le tampon de lavage et incubés pendant une heure avec un anticorps de chèvre anti-IgG humain (Jackson Immunoresearch) à une dilution de 1/5000, avant d'être lavés de nouveau. Le substrat de réaction (100  $\mu\text{l}$ /puits de o-phenyl diamine, 0,4 mg/ml dans un tampon 0,1 M citrate pH 6,0) a été ajouté et la réaction s'est poursuivie pendant 10 minutes avant d'être arrêtée par l'ajout de 50 $\mu\text{l}$ /puits de 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . L'absorbance a été mesurée à 490 nm sur un lecteur MRX Revelation (Dynex Technologie).

### **9.6.2 Analyse de la purification d'auto-anticorps**

Des fractions du clone B4 pCal-n-Flag/topo I ont été mis sur gel SDS-Polyacrylamide 8%. Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 1 h à 25 V sur Trans-Blot SD (Bio-rad). La membrane a été colorée 10 minutes au rouge ponceau (Sigma) et décolorée par rinçage à l'eau et les puits ont été découpés. Les bandes ont été incubées pendant 16 heures à 4°C dans un tampon de blocage (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,5% Tween-20, 5% lait). Les bandes ont été incubées durant une heure soit avec du tampon de blocage contenant un anticorps monoclonal murin anti-topo I dilué 1 :350, soit avec une dilution 1/10 dans du PBS des auto-anticorps purifiés. Par la suite, les bandes ont été lavées 4 fois 5 minutes avec le tampon de blocage sans lait. Les bandes analysées avec l'anti-topo I monoclonal ont été incubées avec un anticorps de chèvre anti-IgG murin conjugué à la peroxydase (Jackson Immunoresearch) à une dilution de 1 :20 000 dans le tampon de blocage pendant une heure, puis lavées 4 fois 5 minutes dans le tampon de blocage sans lait (tampon de lavage). En parallèle, les bandes analysées avec les auto-anticorps purifiés ont été incubées avec un anticorps de chèvre anti-IgG humain conjugué à la peroxydase à une concentration de 1 :40 000 dans le tampon de blocage. Ces bandes ont par contre été lavées avec le tampon de lavage à une concentration de Tween-20 de 2%. Les bandes ont été incubées 5 minutes avec le réactif Enhance Chemiluminescence; SuperSignal West Pico (Pierce) puis visualisées sur film rayon-X X-OMAT (Kodak).



## 9.7 ELISA SUR PEPTIDES DE TOPO I

Les peptides de 20 acides aminés ont été synthétisés (NRC-Biotechnology Research Institute, Montréal, Qc) à partir de la séquence de topo I. Les conditions optimales ont d'abord été déterminées en faisant varier le type de plaque, le tampon d'adsorption, le tampon de blocage de même que la dilution des sérums à tester et des anticorps secondaires.

Chaque peptide a été adsorbé dans le fond des puits d'une plaque de 96 puits en polystyrène de type Maxisorp (Nalge Nunc, Roskilde, Danemark) en incubant 100 µl par puits d'une solution de 20 µg/ml de peptides dans le PBS pH 7.4. Les plaques ont été lavées 4 fois 2 minutes avec le tampon de lavage (PBS, 0,5% Tween 20) sur une plaque rotative de type Lab-Line. Puis 200 µl de tampon de blocage (PBS, 3% BSA) ont été ajoutés par puits et les plaques ont été incubées à la température ambiante durant 2 heures. Après 4 lavages de 2 minutes avec du tampon de lavage, les sérums ont été ajoutés à une dilution de 1/100 dans le tampon de blocage PBS-3% BSA à raison de 100 µl/puits. Les plaques ont été incubées pendant 1 heure à la température ambiante et de nouveau lavées 4 fois 2 minutes avec le tampon de lavage. Les plaques ont été incubées pendant 1 heure à la température ambiante avec un anticorps anti-IgG humain couplé à la peroxidase (Jackson Immunoresearch) à une dilution de 1 :5000 dans le tampon de blocage suivie de quatre lavages de 2 minutes avec le tampon de lavage.

## **9.8 PRÉPARATION DE SOLUTIONS COURANTES**

### **9.8.1 Milieu de culture M9ZB**

La solution mère de milieu M9 10X a été produite en dissolvant 5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 30 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans 500 ml d'eau. Le pH a été ajusté à 7.4 à l'aide d'HCl concentré et la solution a été autoclavée.

La solution mère de milieu ZB a été produite en dissolvant 5 g de Bacto-tryptone et 2,5 g de NaCl dans 400 ml d'eau et la solution a été autoclavée.

Pour obtenir 500 ml de milieu M9ZB, 50 ml de milieu M9 10X, 50 ml de glucose 40% et 1 ml de  $\text{MgCl}_2$  1 M ont été dilués dans 400 ml de milieu ZB.

### **9.8.2 Milieu de culture LB**

25 g de poudre LB Broth Miller (ICN Biomedicals, Costa Mesa CA) ont été dilués dans 1 litre d'eau. La solution a été autoclavée et utilisée lorsque refroidie. La carbénicilline a été ajoutée en conditions stériles juste avant l'induction à une concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

### **9.8.3 Agar ZB**

Il s'agit de diluer 2.5 g Bactotryptone, 1.25 g NaCl et 3,75 g agar dans 250 ml d'eau et de faire autoclaver la solution. Le milieu a été coulé dans les pétris lorsqu'il était tiède et en conditions stériles.

#### **9.8.4 SDS 4X**

La solution mère est un tampon 100 mM Tris-HCl pH 6.8 contenant 40% Glycérol, 4% SDS, 8%  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0,1% bromophénol bleu. Pour obtenir du SDS 2X il suffit de diluer la solution mère 1:2 avec de l'eau.

#### **9.8.5 SDS-Polyacrylamide**

Le tampon pour le gel de résolution a été produit en ajustant le pH d'un tampon 1,5 M Tris à 8.9 à l'aide d'HCl concentré et en ajoutant du SDS pour obtenir une concentration finale de 0,4%.

Le tampon pour le gel d'entassement a été produit en ajustant le pH d'un tampon 120 mM Tris à 6.7 à l'aide d'HCl concentré et en ajoutant du SDS pour obtenir une concentration finale de 0,4%.

Pour faire un gel 8% :

Un gel de résolution est une solution constituée de 20% acrylamide 40%:N-N'-methylene-bis-acrylamide (37,5 :1) (Bio-Rad), 25% de tampon de résolution et 0,05% TEMED (Bio-Rad) dans l'eau. 0,5% d'ammonium persulfate 10% est ajouté au dernier instant et la solution est coulée entre 2 vitres de 18 x 24 cm sur montage modèle Hoefer SE 600 (Amersham Pharmacia). Le gel a été recouvert d'eau.

Le gel d'entassement est une solution d'eau contenant 7,5% acrylamide 40% (N-N'-methylene-bis-acrylamide (37,5 :1)), 25% tampon pour gel de résolution et 0,1% TEMED (BioRad) 0,5% ammonium persulfate 10% a été ajouté au dernier instant. L'eau a été retirée au-dessus du gel d'entassement, la préparation du gel d'entassement coulée par dessus. Un peigne a délicatement été inséré et les bulles retirées.

Après la polymérisation les peignes ont été retirés et les vitres placées dans le montage Hoefer SE 600 (Amersham Pharmacia). Le bas du gel a été immergé dans 4 litres de tampon de l'anode (100 mM Tris-HCl pH 8.1 0,1% SDS) et le haut du gel dans 500 mL de TBS (Bio-Rad, 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glycine, 0,1 % SDS). La migration s'est déroulé à 20 mA/gel et a été augmentée à 40 mA/gel après le passage du front de migration dans le gel de résolution.

#### **9.8.6 Mélange d'inhibiteurs de protéases**

Ajouter le volume des solutions mères nécessaire pour obtenir 2 µg/mL d'Aprotinine, 2 µg/mL de Leupeptine, 1 µg/mL de Pepstatine, 1 mM Benzamidine, 100 µg/mL de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et 50 µg/mL d'Inhibiteur de Trypsine.

## 10 Résultats

## 10 RÉSULTATS

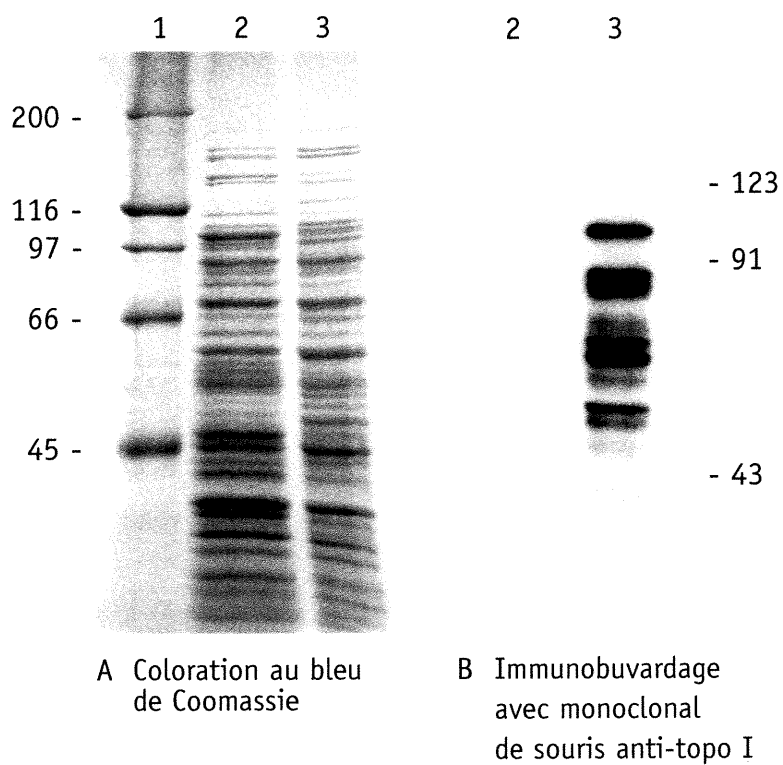
### 10.1 CLONAGE ET EXPRESSION DE TOPO I

Nous avons sous-cloné la topo I dans le vecteur d'expression p-Cal-n-Flag et l'avons exprimée dans les bactéries *E.coli* BL21(DE3). La production de la protéine est faible puisque non visible en coloration par bleu de Coomassie (**figure 3A puits 3**). Elle est toutefois détectée par un anticorps monoclonal anti-topo I sur immunobuvardage (**figure 3B puits 3**).

La protéine est présente sous sa forme complète (100 kDa) mais également sous plusieurs formes incomplètes. Ce phénomène a été remarqué par plusieurs équipes ayant tenté de cloner la topo I complète. Selon D'Arpa et al [D'Arpa et al, 1990], la protéolyse subie par topo I lors de son expression serait due à son activité toxique sur le génome de la bactérie. En effet, topo I produite irait se lier à l'ADN de la bactérie et subirait ainsi la lyse par les protéases bactériennes. L'expression précoce de protéines toxiques dans les *E.coli* BL21(DE3) serait due à l'activité basale de la T7 RNA polymérase [Verheijen et al, 1992]. Celle-ci permettrait la transcription précoce du gène cible, débutant ainsi l'activité toxique de la protéine dans la bactérie avant la production de masse (induction). Les *E.coli* BL21(DE3)/pLysS possèdent un vecteur contenant le gène du lysozyme T7, qui permet de réduire le niveau d'activité basal de la T7 polymérase. Le vecteur pCal-n-Flag/topo I a été testé dans les *E.coli* BL21(DE3)/pLysS mais le

résultat n'a pas été concluant. En effet, le degré de dégradation de topo I a été très comparable à celui observé chez les BL21(DE3) (résultats non montrés).

**Figure 3: Expression de topo I recombinante dans les bactéries *E.coli* BL21 DE3**



Puits 1 : Marqueurs de poids moléculaire, en KDa  
Puits 2 : Lysat de bactéries non-induites  
Puits 3 : Lysat de bactéries induites



Au cours de tests d'induction nous avons remarqué que la protéine était facilement précipitée en corps d'inclusions. Ceci est probablement dû à sa haute vitesse de production. En effet, la présence de topo I complète et dégradée a été détectée après 15 minutes seulement d'induction (résultat non montré). Pour favoriser la production de topo I soluble, nous avons réduit respectivement le temps et la température d'induction à 1 heure et à 25° C. Nous avons également essayé le milieu de culture tryptone phosphate, qui contribuerait à diminuer la formation de corps d'inclusions [Moore et al, 1993]. Nous n'avons pas observé de différence notable entre la fraction soluble obtenue avec ce milieu et celle obtenue avec le milieu de culture M9ZB à la coloration au bleu de Coomassie.

## **10.2 PURIFICATION DE TOPO I**

Après des périodes de congélation variables, les culots de bactéries ont été décongelés et lysés par resuspension dans le B-PER, une solution d'extraction des protéines bactériennes. Cette méthode permet un taux de récupération de topo I soluble supérieur à la resuspension du culot dans le tampon de liaison pour la résine calmoduline suivie de sonication tel que suggéré dans le protocole de la trousse de Stratagene (résultat non montré).

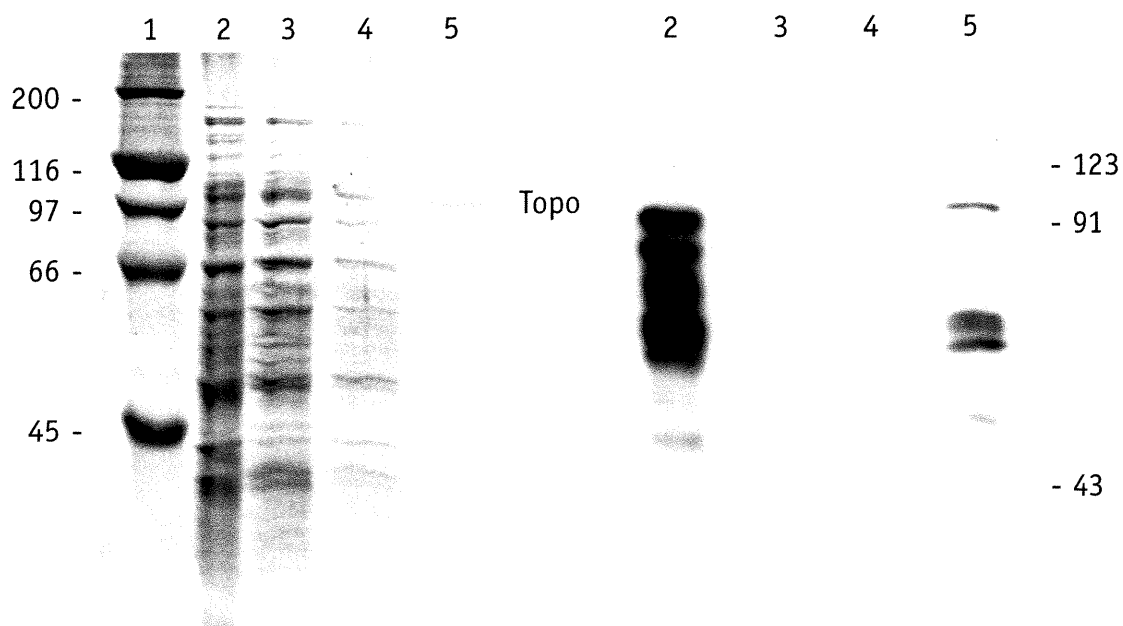
La purification de topo I par la méthode d'affinité a d'abord été testée. Cette méthode utilise des billes enrobées de calmoduline. La topo I contenue dans le lysat se lie aux billes via le peptide liant la calmoduline (PLC), qui est la protéine

de fusion (tag) située en N-terminal de la topo I recombinante. Cette méthode requiert l'utilisation de la protéine soluble seulement, puisque la forme insoluble possède une conformation qui ne favorise pas la liaison du tag aux billes.

Lors de cette expérience, la fraction soluble équivalant à 2 ml de culture en solution dans le tampon de liaison a été incubée avec 50  $\mu$ l de billes durant 16 heures. Des tests précédents avaient démontré que la liaison de topo I sur les billes augmentait avec le temps. Par la suite, la fraction non liée a été retirée et les billes ont été lavées avec du tampon de liaison. Aucune bande de topo I n'est présente dans les fractions de lavages (**figure 4B, puits 4**).

Afin de décrocher topo I des billes, celles-ci ont été lavées avec un tampon d'élution. Étant dépourvu de  $\text{CaCl}_2$ , le tampon d'élution entraîne un changement de conformation de la calmoduline et le relâchement de son ligand dans le milieu. Au cours des éluions avec le tampon d'élution à 150 mM de NaCl, un peu de topo I complète ainsi que la protéine incomplète ont décroché des billes. Le taux d'élution le plus élevé a cependant été obtenu avec le tampon d'élution contenant 1 M de NaCl. Nous avons donc rassemblé les fractions d'élutions correspondantes de plusieurs résines (**Figure 4, puits 5**). Le rendement de la purification par affinité a été jugé faible (environ 6  $\mu$ g/ml de culture). Nous avons donc décidé d'utiliser d'autres techniques afin d'obtenir un meilleur rendement.

**Figure 4: topo I recombinante purifiée à partir de lysats bactériens sur la résine d'affinité à la calmoduline**



A Coloration au bleu de Coomassie

B Immunobuvardage avec monoclonal de souris anti-topo I

- Puits 1 : Marqueurs de poids moléculaire, en KDa
- Puits 2 : Lysat bactérien total
- Puits 3 : Fraction non-liée de la résine à la calmoduline
- Puits 4 : Fraction de lavage
- Puits 5 : Groupement d'éluats 4 (1M NaCl)

Puisque la protéine insoluble est présente en plus grande quantité que la forme soluble dans le lysat, nous avons tenté de replier la protéine insoluble dans sa forme native afin de la soumettre à la colonne d'affinité: la fraction insoluble du lysat bactérien a été solubilisée dans une solution dénaturante (guanidine 6M, Tris 1M pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoéthanol 140 mM) puis dialysée contre la solution de liaison à la colonne d'affinité et concentrée. L'utilisation de ce protocole n'a pas permis la renaturation de la protéine, puisque celle-ci a été retrouvée dans le culot de centrifugation après la dialyse (Résultats non montrés).

À l'induction, la quantité de protéine produite de façon soluble est plus petite que la quantité de protéine insoluble. Dans la fraction soluble, une certaine quantité de protéine ne se lie pas à la résine, diminuant encore davantage le rendement. De plus, même si l'analyse de la purification par coloration au bleu de Coomassie ne démontre que la bande de topo I fusionnée complète (**figure 4A, puits 5**), l'analyse de la même préparation par immunobuvardage utilisant l'anticorps monoclonal de type IgG anti-topo I montre la présence d'autres fragments de topo I (**figure 4B puits 5**). La possibilité que la purification ait entraîné également des protéines d'origine bactérienne a été envisagée. Puisque certains fragments de topo I ne sont visibles qu'en immunobuvardage, il est possible que des contaminants bactériens soient aussi présents mais en quantité insuffisante pour être détectés par coloration au bleu de Coomassie. Comme il est à peu près impossible de détecter ces contaminations par immunobuvardage, l'idée de purifier la topo I par électroélution semblait attrayante. Cette méthode permettrait

à la fois d'éliminer les protéines bactériennes et les fragments de topo I de poids autre que 100 kDa. Et comme cette méthode utilisait un gel dénaturant, il apparaissait possible de purifier topo I complète à partir de la fraction insoluble.

### **10.3 PURIFICATION DE TOPO I PAR ÉLECTROÉLUTION**

Lors de cette expérience, la fraction insoluble équivalant à 250 ml de culture a été recueillie suite à la sonication du culot, puis migrée sur un gel long, permettant une meilleure séparation des bandes. La bande de 100 kDa a été découpée puis la protéine a été éluée du gel par électroélution. Les éluats ont été rassemblés et concentrés avant d'être dosés par la méthode de Bradford [Bradford, 1976] ou par densitométrie. Encore ici, le rendement a été faible, soit en moyenne 60 µg pour 250 ml de culture (0,2 µg/ml).

Puisque c'est la protéine insoluble qui est purifiée par cette méthode, le protocole d'induction a été modifié afin d'en favoriser la production. Le temps d'induction a été allongé à 16 heures, à 25°C. La sonication a été préférée à la méthode d'extraction au B-PER, jugée trop douce.

Les essais de cette méthode ont été marqués d'une très grande variabilité. D'abord, chaque nouvelle induction a nécessité une nouvelle mise au point, puisque la grosseur des culots obtenus variait d'une induction à l'autre. La

quantité de protéine insoluble produite variant également, la méthode de sonication s'est parfois révélée inefficace pour diminuer la taille ou l'aspect du culot de façon significative et l'opération a dû être répétée. En d'autres occasions, la sonication du culot a semblé trop invasive, puisqu'il n'a été récolté qu'un culot blanc et filamenteux, correspondant à l'ADN génomique.

Pour ces raisons, l'équivalent en millilitre de culture à faire migrer sur le gel a également été sujet à de nombreuses variations. À chaque nouvelle induction correspond une quantité différente en équivalent de culture permettant d'éviter une surcharge de protéine dans le gel ou une quantité insuffisante pour apercevoir la bande de 100 kDa. Une fois ces paramètres établis, ceux-ci ont pu de nouveau varier lorsque le matériel est resté congelé durant une longue période.

Lors de l'électroélution, la protéine a été récupérée dans un tampon 25 mM Tris pH 8.0, 192 mM glycine, pouvant contenir des traces de SDS. Comme elle est également dosée par la méthode de Bradford dans ce même tampon, il se peut que le SDS restant soit responsable des déficiences de dosage. Différentes méthodes ont été tentées afin d'éliminer le SDS de la solution. La précipitation de la protéine à l'acétone entraîne parfois la précipitation du Tris et requiert la renaturation de la protéine. Par conséquent la lyophilisation de topo I semble une meilleure option puisqu'elle permet la solubilisation subséquente de la protéine dans le tampon voulu.

L'étape suivant la purification devait être la séparation de la topo I du tag PLC par clivage à l'entérokinase. En raison du faible rendement de la purification, il a été décidé d'omettre cette étape sous peine de perdre davantage de produit de purification. De par sa petite taille (4 kDa), il est peu probable que le PLC ait un effet sur la fonction ou la conformation de la protéine.

#### 10.4 PURIFICATION DES AUTO-ANTICORPS

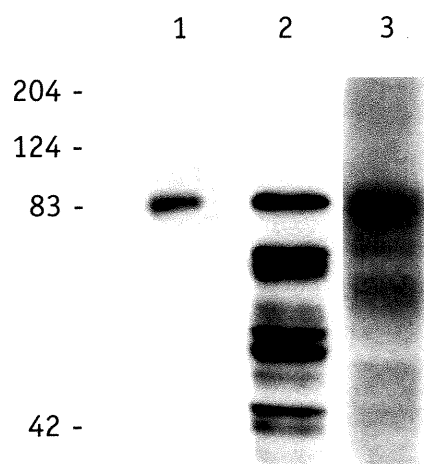
Lors de cette expérience, un échantillon de sérum de malade sclérodermique a été incubé en présence de la topo I recombinante purifiée par électroélution et adsorbée sur un carré de nitrocellulose. Les auto-anticorps spécifiques à l'antigène ont ensuite été élués par un tampon d'élution et analysés. Cette méthode a permis de recueillir 624 ng d'IgG tel que dosés par la méthode ELISA. Afin d'en vérifier la spécificité, les auto-anticorps purifiés ont été utilisés en immunobuvardage sur un lysat du clone BL21(DE3)p-Cal-n-Flag. La bande de 100 kDa représentant topo I complète a été reconnue par les auto-anticorps purifiés (**Figure 5, puits 3**).

Cependant, les autres bandes reconnues par les auto-anticorps sont de poids moléculaire différent des bandes reconnues par les anticorps monoclonaux IgM et IgG anti-topo I (**Figure 5, puits 1 et 2**). Les bandes de topo I reconnues par

les anticorps monoclonaux IgM et IgG sont différentes parce qu'ils ne reconnaissent pas les mêmes épitopes. L'IgG monoclonal est le produit d'une souris injectée avec topo I purifiée à partir de thymus de veau [Holden et al, 1997] et donc l'épitope n'est pas connu. Cet anticorps reconnaît la topo I complète de même que plusieurs bandes de la protéine dégradée. L'IgM monoclonal murin C-21 est dirigé contre un épitope situé en C-terminal de topo I purifiée à partir de thymus de veau [Samejima et al, 1999 et Holden et al, 1997]. Il ne reconnaît que topo I complète.



**Figure 5: Immunobuvardage sur lysats bactériens utilisant les auto-anticorps anti-topo I purifiés**



A - Lysat du clone  
BL21/DE3/p-Cal-n-Flag  
/topo I

Puits 1 : Anticorps monoclonal IgM anti-topo I  
Puits 2 : Anticorps monoclonal IgG anti-topo I  
Puits 3 : Auto-anticorps anti-topo I purifiés

## 10.5 ELISA SUR PEPTIDES DE TOPO I

Cette expérience est inspirée d'un protocole publié en 2000 [Rizou et al, 2000]. Il s'agit d'un test ELISA utilisant des peptides de topo I susceptibles d'être des épitopes importants en sclérodermie. Les peptides ont été produits de façon synthétique et non recombinante. Dans l'article cité, toute la séquence de la protéine a d'abord été analysée par le biais de 63 peptides superposés. De ce nombre, les 4 peptides ayant obtenu la plus grande réactivité sérique ont été retenus. Nous avons repris l'expérience à partir de ce point mais en changeant quelques paramètres. En premier lieu nous avons ajouté 2 peptides qui ont obtenu une réactivité significative des sérums anti-topo I dans l'article mais qui n'ont pas été sélectionnés [Rizou et al, 2000, figure 1]. Par contre, la synthèse du peptide 34 tel que représenté dans l'article a rencontré des difficultés particulières et n'a donc pu être achevée.

Les peptides de 20 acides aminés ont été synthétisés (NRC-Biotechnology Research Institute, Montréal, Qc) à partir de la séquence de topo I.

Peptide 18 (205-224):      WWEEERYPEGIKWKFLHKG

Peptide 30 (349-368):    RIANFKIEPPGLFRGRGNHP

Peptide 44(517-536):    ELDGQEYVVEFDLKGKDSIR

Les 2 peptides ajoutés à notre expérience:

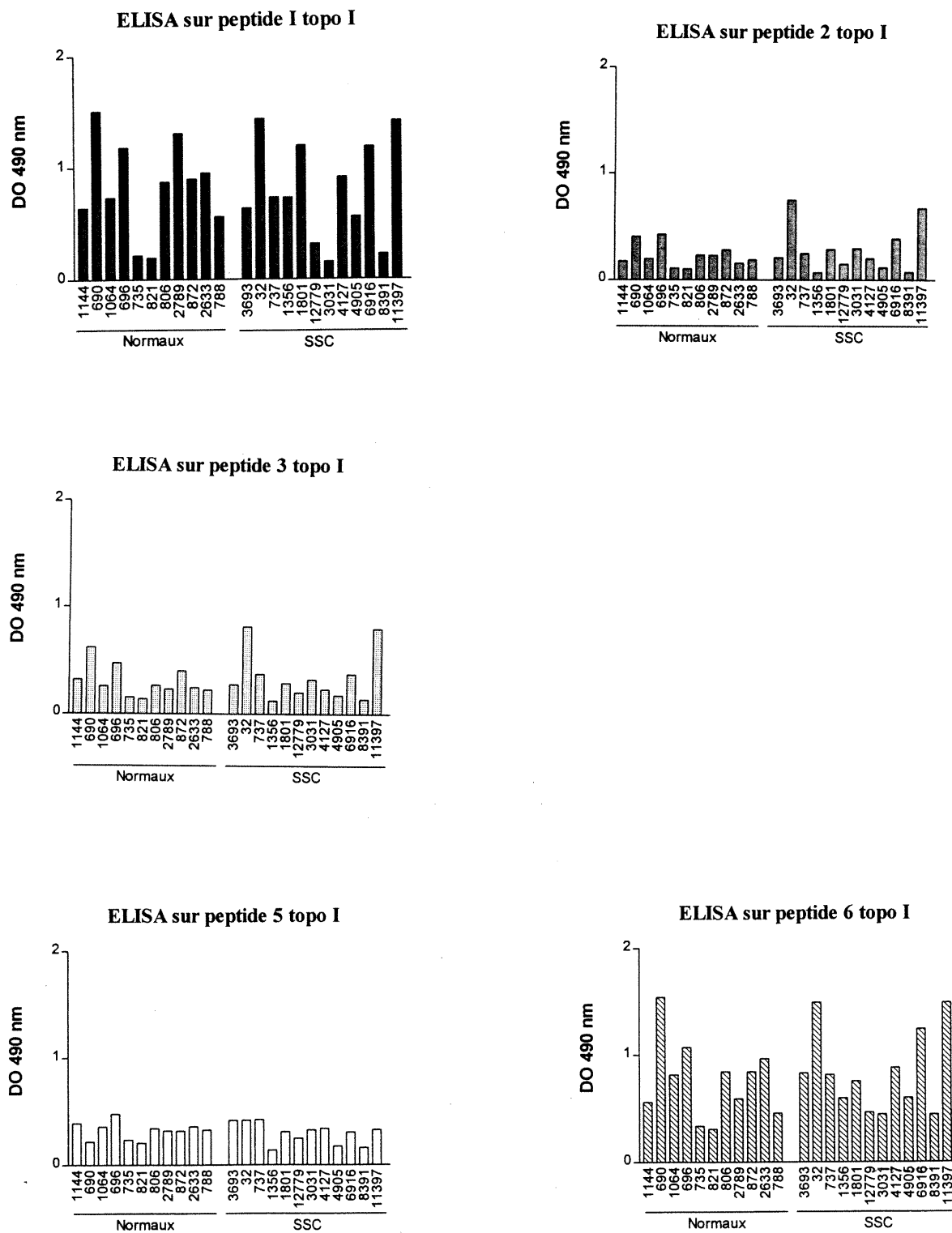
Peptide 19 (216-236): WKFLEHKGPVFAPPYEPLPE

Peptide 35 (408-428): KVTWLVSWTENIQGSIKYIM

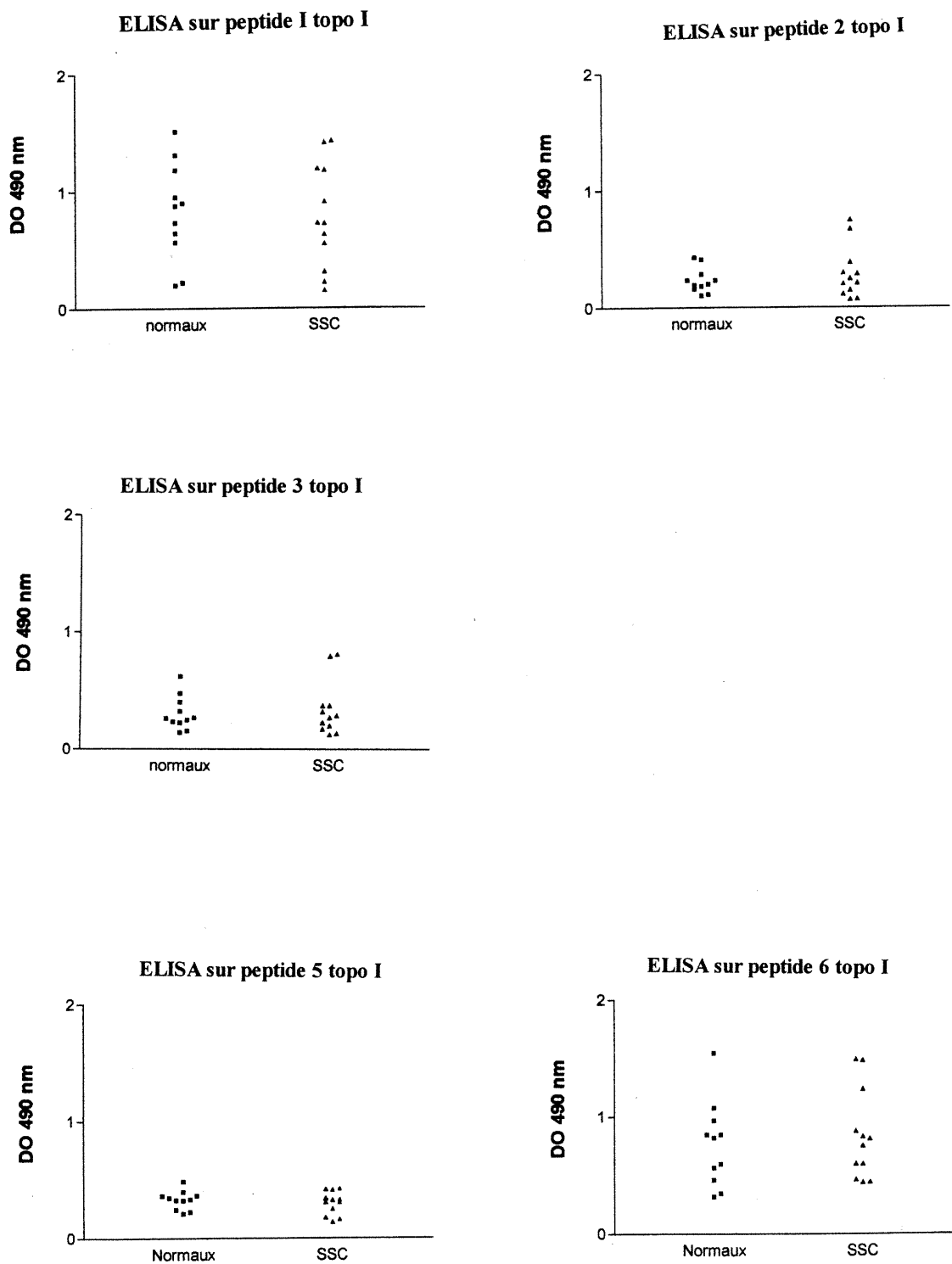
Enfin, nous avons mis au point les conditions du test ELISA tels la concentration des peptides adsorbés, les tampons d'adsorption et de blocage, et la dilution des sérums à analyser.

Un groupe de sérums provenant de 11 individus normaux et un autre groupe de sérums provenant de 12 malades sclérodermiques ont été analysés à une dilution de 1/100. Les peptides 1 et 5 ont obtenu une réactivité générale plus grande que les 3 autres peptides. Chez les malades sclérodermiques comme chez les sujets normaux, on a remarqué que certains sérums (sérums 690, 696, 32 et 11397) démontraient une réactivité élevée contre les 5 peptides. D'autres sérums (sérums 735, 721, 12779 et 3031) n'ont réagi que faiblement aux 5 peptides. Les deux cohortes se comportent en général de la même façon. Seuls 2 sérums de malades sclérodermiques démontrent une réactivité pouvant être considérée comme significativement positive, et cela pour 2 peptides seulement (sérums 32 et 11397 pour les peptides 2 et 3) (**Figures 6 et 7**). Par test de t, la D.O. moyenne d'anti-topo I obtenue par le groupe SSc n'était pas statistiquement différente de la D.O moyenne du groupe de témoins normaux.

**Figure 6 : Réactivité de sérums de sujets normaux et sclérodermiques sur peptides de topo I en ELISA : Résultats individuels.**



**Figure 7 :** Réactivité de sérums de sujets normaux et sclérodermiques sur peptides de topo I en ELISA : Diagramme de dispersion par groupe.



## 11 Discussion

## 11 DISCUSSION

L'isolation de composantes cellulaires (enzymes, récepteurs etc) est nécessaire à l'étude de leur fonction au niveau cellulaire, systémique et parfois même, pathologique. En sclérodermie, la purification des molécules jouant le rôle d'auto-antigènes pourrait servir à élucider le mécanisme de formation des auto-anticorps et indirectement, à découvrir le rôle de ces anticorps dans la pathogénèse de la maladie par la caractérisation de ces auto-anticorps.

Dans le cadre du présent projet, nous avons cloné l'ADN topoisomérase I humaine dans le vecteur pCal-n-Flag et l'avons exprimé dans un système bactérien. Afin de l'isoler, nous avons d'abord tenté d'utiliser le système de purification par affinité fonctionnant avec des billes saturées de calmoduline compatible avec le tag PLC, situé en N-terminal de la topo I produite. Nous avons réussi à produire topo I mais le rendement était faible. Devant le faible rendement obtenu, nous avons tenté des méthodes de repliement de la protéine précipitée sous forme insoluble afin de la soumettre à la chromatographie d'affinité. Nous avons ensuite tenté d'isoler sur gel SDS-Polyacrylamide la protéine complète et de l'électroéluer hors du gel. Cette technique a permis d'amasser une quantité suffisante de topo I pour tenter la purification des auto-anticorps à partir d'un sérum de malade sclérodermique. Pour ce faire le sérum a été incubé en présence de la topo I adsorbée sur un carré de nitrocellulose et les anticorps liés ont ensuite été recueillis dans un tampon d'élution.

Nous avons également tenté de reproduire le test ELISA sur des épitopes de topo I tel que décrit dans un article [Rizou et al, 2000]. Cinq peptides qui avaient obtenu dans cet article une réactivité significative des sérums anti-topo I ont été produits de façon synthétique, et nous les avons utilisés dans un test ELISA portant sur des sérums de sujets sclérodermiques et normaux.

Dans un projet futur, des modifications devront être faites au niveau du clonage, de l'expression et de la purification afin d'améliorer le rendement.

### **11.1 EXPRESSION DE TOPO I**

Les principales difficultés rencontrées lors de l'expression de topo I en système bactérien ont été la précipitation de la protéine dans le corps d'inclusion (phase insoluble) de la bactérie ainsi que la protéolyse subie par la protéine. Afin de minimiser la proportion de protéine précipitant sous forme insoluble, les conditions de température et de temps d'induction ont été optimisées. Malgré des variations acceptables des conditions d'induction d'une expérience à l'autre, cette proportion a tout de même grandement varié, suggérant une sensibilité extrême du clone BL21(DE3)/pCal-n-Flag par rapport aux autres clones existants ou alors l'existence d'un facteur encore inconnu pouvant influencer la production. Il est possible que les propriétés même de la protéine produite en soient responsables.



Afin de contourner les problèmes d'insolubilité, il serait important de tenter le clonage du gène de la topo I dans un système spécialisé dans l'expression de protéines toxiques, tel des bactéries possédant des chaperones moléculaires ou un vecteur d'expression dont le promoteur est régulé par la tétracycline. Ce promoteur permettrait un plus grand contrôle de l'expression, c'est-à-dire un niveau basal de transcription plus bas et une réduction de la formation des corps d'inclusion.

La protéolyse subie par topo I lors de sa production semble inhérente à sa fonction catalytique sur l'ADN bactérien. La lyse de topo I serait une réaction de défense contre la liaison de celle-ci à l'ADN bactérien. Dans une prochaine étude, il serait intéressant de tenter une mutation du site catalytique de topo I. Cependant, il faudrait veiller à ce que cette mutation ne change en rien la conformation de la protéine, puisque certains épitopes se situent dans cette région de la protéine (**Figure 2**).

## **11.2 PURIFICATION DE TOPO I**

La forte propension de topo I à former des corps d'inclusion dans le système d'expression BL21(DE3)/p-Cal-n-Flag a rendu difficile l'utilisation de la méthode de purification par affinité avec la protéine de fusion. Ce système ne fonctionne

que si la protéine à purifier est soluble. Or, la quantité de topo I soluble a été jugée insuffisante pour qu'il en reste une quantité intéressante à la fin des étapes de purification. Différentes méthodes de repliement de la protéine insoluble ont donc été tentées [Rudolph et al, 1996] afin de pouvoir utiliser la chromatographie d'affinité sur cette fraction, mais ces expériences ont été infructueuses. Les méthodes utilisées ont peut être échoué à replier correctement la topo I de façon à exposer le site de liaison aux billes, ou alors les produits contenus dans le tampon de renaturation ont nui au bon fonctionnement de la colonne d'affinité.

### **11.3 PURIFICATION DES AUTO-ANTICORPS ANTI- TOPO I**

La méthode de purification des auto-anticorps utilisée a permis de récolter des anticorps que nous pouvons associer à des auto-anti-topo I mais également d'autres anticorps dont l'identité reste à déterminer. Certaines bandes ont été reconnues par les auto-anticorps mais non par les anticorps anti-topo I monoclonaux. Il est possible que les auto-anticorps purifiés reconnaissent des épitopes différents des anticorps monoclonaux. Comme les sérum humains contiennent fréquemment des anticorps dirigés contre des protéines bactériennes, ces bandes peuvent également représenter soit une réaction croisée avec les topoisomérases procaryotes ou alors une réaction contre d'autres protéines bactériennes entraînées avec la topo I lors de la purification.

Puisque cette expérience n'a pu être tentée qu'une fois, elle présente forcément des faiblesses au niveau de la méthodologie. Tout d'abord, il n'a pas été possible de connaître la quantité de topo I purifiée ayant adhéré à la membrane de nitrocellulose ni même de vérifier si le rinçage de la membrane a pu décrocher une quantité de protéine. De par la difficulté d'obtenir une grande quantité de protéine purifiée, il n'a pas été possible d'effectuer une courbe de titrage qui aurait permis d'établir la quantité de protéine nécessaire pour saturer la membrane et limiter le nombre de sites non spécifiques. Différents tampons de blocage ainsi qu'une variation du temps de blocage seraient à essayer. De même l'effet du tampon d'élution des anticorps sur la membrane et la protéine est inconnu. Il est possible que les étapes subséquentes à la première élution d'anticorps aient été compromises par le décrochage de la protéine liée à la membrane ou par un blocage insuffisant des sites non spécifiques. Encore à cette étape une mise au point sera souhaitable. Un rinçage insuffisant de la membrane entre l'étape d'élution des anticorps et celui du blocage pourrait également avoir été en cause.

La méthode de purification telle qu'utilisée ne tient compte que des IgG lors du dosage et de la détection, alors qu'à l'étape de purification tous les types d'anticorps sont susceptibles de se lier à topo I. Cependant, le fait que les auto-anticorps soient majoritairement de type IgG nous permet de croire que cette méthode est tout de même valide. Il aurait été intéressant d'effectuer la même

expérience sur des IgG purifiés de sérums pour éliminer l'influence possible des éléments plasmatiques sur le déroulement de l'expérience.

Enfin, comme le degré de pureté de topo I purifié n'a pu être établi, il est possible que des contaminants aient été présents dans la solution et que des anticorps reconnaissant ces contaminants aient été purifiés. Cependant, le trop grand nombre de bandes reconnues par les anticorps autres que la topo I de même que la variété de leur poids moléculaire suggère une cause autre que celle-ci. Par exemple, un blocage insuffisant des sites non spécifiques de la membrane a pu entraîner la liaison à la membrane d'anticorps possédant une faible affinité pour ces sites.

Dans une prochaine étude, il importerait d'avoir purifié suffisamment de topo I pour pouvoir mettre au point les conditions de liaison, de blocage, de lavage et d'élution des anticorps et ce, avec des contrôles de sérums anti-topo I positifs et négatifs. De plus, l'analyse de la purification pourrait être faite sur des lysats bactériens autres que le clone produisant topo I ainsi que sur des lysats de cellules humaines. Ceci afin de vérifier les hypothèses de réaction croisée ou de réaction contre des contaminants bactériens. La purification des auto-anticorps sur colonne d'affinité serait également à envisager à condition d'obtenir une quantité suffisante de topo I purifiée à adsorber sur les billes de la colonne.

## 11.4 ELISA SUR PEPTIDES DE TOPO I

Dans l'article de Rizou et al [Rizou et al, 2000], la fibrose pulmonaire chez le sujet sclérodermique de nationalité grecque était associée à une réactivité contre des épitopes particuliers de topo I et non plus seulement à une réactivité globale contre la molécule. Ceci avait pour effet de préciser davantage les facteurs de prédiction du développement de la fibrose pulmonaire, d'où le projet de reproduire l'expérience avec une cohorte de patients Canadiens français. Parce que les facteurs pouvant influencer les résultats d'une expérience sont nombreux, il a été décidé de remettre d'abord au point les conditions de l'expérience selon des critères plus rigoureux que ceux utilisés dans l'article. L'uniformité a été visée à tous les niveaux, que ce soit pour la concentration des peptides adsorbés, des tampons d'adsorption et de blocage utilisés de même que pour la dilution des sérums à analyser. Or, l'expérience exécutée selon ces critères plus rigoureux révèle une réaction contre les peptides aussi élevée chez les individus normaux que chez les patients sclérodermiques. Cela suggère soit des résultats biaisés dans l'article de Rizou par des conditions techniques disparates, soit une réactivité totalement différente des patients Canadiens français par rapport aux patients grecs. Afin de vérifier cette hypothèse, la sélection des épitopes pourrait être refaite dès le début avec des sérums de sujets Canadiens français. Les peptides pourraient également être coupés différemment (longueur ou chevauchement différent de l'article) pour découvrir des épitopes différents.

## 12 Conclusion

## 12 CONCLUSION

La sclérodermie est une maladie qui, encore aujourd'hui, laisse la science perplexe autant par sa pathogenèse que par l'étendue de ses manifestations cliniques. La présence dans le sang des patients d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes intra-nucléaires reste également inexplicée. Cependant, des liens intéressants ont été établis entre la présence de certains auto-anticorps et des manifestations cliniques précises, faisant des auto-anticorps des marqueurs diagnostiques.

Dans le présent projet, la production de topo I complète dans un système bactérien a été tentée dans le but d'isoler et de caractériser les auto-anticorps dirigés contre cette protéine chez les malades sclérodermiques. Le faible rendement de la production de topo I humaine recombinante dans un système bactérien dans le vecteur pCal-n-Flag de même que les difficultés de purification n'ont pas permis d'expérimenter suffisamment la méthode de purification des auto-anticorps anti-topo I sur membrane de nitrocellulose.

Pour la continuité du projet il serait recommandé d'abord d'améliorer la production de la protéine soit en transférant le vecteur dans un système adapté aux protéines toxiques. Des systèmes visant une production accrue de protéines en phase soluble seraient à conseiller. La mutation du gène sur les sites

sensibles à la protéolyse serait également à envisager mais alors la réactivité des auto-anticorps à cette protéine modifiée pourrait différer de la protéine native.

Au niveau de la purification de la protéine, une méthode par affinité et ne requérant qu'une étape serait idéale.

La production de topo I humaine recombinante en système bactérien est moins coûteuse que la production en système eucaryote. L'utilisation de topo I purifiée d'un système bactérien dans un test de détection ELISA chez un grand nombre de patients permettrait de mieux définir les sous-groupes de patients sclérodermiques. Une détection précoce des auto-anticorps anti-topo I par un test ELISA chez les patients permettrait un meilleur suivi de ces patients au niveau pulmonaire puisqu'il a largement été démontré qu'il existe une relation entre la présence de ces auto-anticorps et le développement d'une fibrose pulmonaire potentiellement grave.

Les auto-anticorps sont le dénominateur commun des maladies auto-immunes. La purification des auto-anticorps à l'aide de leur antigène cible, comme dans la présente étude, pourrait être utile à la compréhension de la pathogenèse de ces maladies.



## 13 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arlett, C.M., J.B. Smith, et S.A. Jimenez. 1999. New perspectives on the etiology of systemic sclerosis. *Mol Med Today* 74-78
- Benjamini E, Sunshine G, Leskowitz S. 1991. Immunology : A short course 3<sup>rd</sup> edition Wiley-Liss New York
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Briggs, D.C., R.W. Vaughan, K.I. Welsh, A. Myers, R.M duBois, et C.M Black 1991. Immunogenetic prediction of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Lancet.* 338: 661-662.
- Casiano, Carlos A., et E.M Tan. 1996. Antinuclear autoantibodies : probes for defining proteolytic events associated with apoptosis. *Mol. Biol. Reports.* 23 :211-216.
- Casciola-Rosen, L., F. Wigley, et A. Rosen. 1997. Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalysed oxidation reactions : implication for pathogenesis. *J. Exp. Med.* 185 :71-79.
- Catoggio, L.J., R. M Bernstein, C.M Black, G.R.V Hugues, et P.J. Maddison. 1983. Serological markers in progressive systemic sclerosis : clinical correlations. *Ann. Rheum. Dis.* 42 :23-27.
- Cram, D.S., N. Fisicaro, L.J. McNeilage, R.L. Coppel, et L.C. Harrison. 1993. Antibody specificities of Thai and Australian scleroderma sera with topoisomerase I recombinant fusion proteins. *J. Immunol.* 151 :6872-6881.
- D'Arpa, P., H. White-Cooper, D.W. Cleveland, N.F. Rothfield, et W.C. Earnshaw. 1990. Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Scl-70) recognized by sera of scleroderma patients. *Arthritis Rheum.* 33 :1501-1511.
- D'Arpa, P., P.S. Machlin, H. Ratrie, N.F. Rothfield, D.W. Cleveland, et W.C. Earnshaw. 1988. cDNA cloning of human DNA Topoisomerase I : Catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 :2543-2547.

- Douvas, A.S, M. Achten, et E.M Tan.1979. Identification of a nuclear protein (SCL-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254 :10514-10522.
- Grodzicky, T., et K.B. Elkon. 2000. Apoptosis in rheumatic diseases. *Am J Med.* 108 :73-82
- Holden, J.A., M.P. Rahn, C.J. Jolles, S.V. Vorobyev, et I.B. Bronstein. 1997. Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase I in formalin fixed, paraffin wax embedded normal tissues and in ovarian carcinomas. *J. Clin. Pathol. : Mol. pathol.* 50 :247-253.
- Jacobsen, S., P. Halberg , S. Ullman , M. Hoier-Madsen , J. Petersen, J. Mortensen , et A.Wiik.1997. A longitudinal study of pulmonary function in Danish patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.*16: 384-90.
- Kane, G.C, J.Varga, E.F. Conant, P.W Spirn Jimenez S et J.E. Fish. 1996. Lung involvement in systemic sclerosis (scleroderma) relation to classification based on extent of skin involvement or autoantibody status. *Respir. med.* 90 :223-230
- Klippel, J.H, et Dieppe, P.A. Rheumatology 2<sup>nd</sup> Edition.1998. Mosby, London.
- Kuwana, M., T.A Medsger Jr., et T.M. Wright. 1995. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J. Immunol.* 155 :2703-2714.
- Kuwana, M., T.A Medsger Jr., et T.M. Wright. 1995.T cell proliferative response induced by DNA topoisomerase I in patients with systemic sclerosis and healthy donors. *J. Clin. Invest.* 96 :586-596.
- Kuwana, M., T. Fudjii, T. Minori, et J. Kaburaki. 1996. Enhancement of Anti-DNA topoisomerase I autoantibody response after lung cancer in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 39 :686-691.
- Kuwana, M., T.A Medsger Jr., et T.M. Wright. 1997. Highly restricted TCR- $\alpha\beta$  usage by autoreactive human T cell clones specific for DNA topoisomerase I. *J. Immunol.* 158 :485-491.
- Kuwana, M., Y. Okano, J. Kaburaki, T.A. Medsger, et T.W. Wright. 1998. Autoantibodies to RNA polymerase recognize multiple subunits and demonstrate cross-reactivity with RNA polymerase complexes. *Arthritis Rheum.* 42:275-284
- Kuwana, M., J. Kaburaki, T.A. Medsger Jr., et T.M Wright. 1999. An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature. *Arthritis Rheum.* 42 :1179-1188.

Kuwana, M., T.A Medsger Jr., et T.M. Wright. 2000. Analyse of soluble and cell surface factors regulating anti-DNA topoisomerase I autoantibody production demonstrates synergy between Th1 and Th2 autoreactives T cells. *J. Immunol.* 164 :6138-6146.

Laing, T.J., B.W.Gillespie, M.B. Toth , M.D. Mayes, R.H. Jr. Gallavan, C.J Burns, J.R. Johann, B.C. Cooper, B.J Keroack, et M.C.M. Wasko. 1997. Racial differences in scleroderma among women in Michigan. *Arthritis Rheum.* 40 :734-742.

Lee, P., P. Langevitz , et D.Buskila. 1990. Mortality in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* Suppl 33 :S156.

Lee P, P.Langevitz, CA. Alderdice, M. Aubrey , PA. Baer, M. Baron, D. Buskila, JP Dutz, I. Khostanteen, et S.Piper. 1992. Mortality in systemic sclerosis (scleroderma). *Q J Med* 82:139-48.

Liu, L.F., and K.G. Miller. 1981. Eukaryotic DNA topoisomerases : two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 :3487-3491.

Lonzetti L.S., F. Joyal, J.P.Raynauld , A.Roussin , J.R. Goulet , E. Rich , D. Choquette, Y. Raymond, JL. Sénécal . 2001. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum.* 44:735-6.

Lonzetti L.S., F. Joyal, J.P.Raynauld , A.Roussin, E. Rich, J.R. Goulet, Y. Raymond, JL. Sénécal. 2002. Predicting mortality in systemic sclerosis. Analysis of a cohort of 309 french canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medecine.* 81: 154-167.

Maul, G.G, S.A Jimenez, E. Riggs, et D. Ziemnicka-Kotula. 1989. Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I : sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :879-8496.

Mayer, J.L.R, et D.S Beardsley. 1996. Varicella-Associated Thrombocytopenia: Autoantibodies against Platelet Surface Glycoprotein V. *Pediatr Res.* 40:615-619

Mayes, M.D. 1996. Scleroderma epidemiology. *Rheum Dis Clin North Am* 22 : 751-764

Mayes, M.D. 1997. Epidemiology of systemic sclerosis and related diseases. *Cur. Op. Rheumatol.* 9 :557-561.

Mayes, M.D. 1998. Classification and epidemiology of scleroderma. *Seminars in cutaneous medecine and surgery.* 17 :22-26

Meesters, T.M., M. Hoet, F.H.J. van den Hoogen, R. Verheijen, W.J. Habets, et W.J van Venrooij. 1992. Analysis of an immunodominant epitope of topoisomerase I in patients with systemic sclerosis. *Mol. Biol Rep.* 16 :117-123.

Meyer, K.N., E. Kjeldsen, T. Straub, B.R. Knudsen, I.D. Hickson, A. Kkuchi, H. Kreipe, et F. Boege. 1997. Cell cycle-coupled relocation of Types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J. Cell. Biol.* 136 :775-788.

Moore, J.T, A.Uppal, F.Maley et G.F. Maley. 1993. Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. *Protein expression and purification.* 160-163.

Murray, J.F, et J.A Nadel. 1988. Textbook of respiratory medicine. WB Saunders company.

Nash, H.H. 1998. Topological nuts and bolts. *Science.* 279 :1490-1491.

Okano, Y. 1996. Antinuclear antibody in systemic sclerosis. *Rheumatic disease clinics of North America.* 22 :709-735.

Paul W.E 1993. Fundamental immunology 3<sup>rd</sup> edition. Raven Press New York

Piccinini, G., E Cardellini, G Reimer, F.C. Arnett, et E. Durban. 1991. An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognised by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol Immunol.* 28 :333-339.

Redinbo, M.R. L. Stewart, P Kuhn, J.J Champoux, et W.G Hol. 1998. Crystal Structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* 279 :1504-1513.

Rizou, C., J.P.A. Ioannidis, E. Panou-Pomonis, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, H. M. Moutsopoulos, et P.G. Vlachoyiannopoulos. 2000. B-Cell epitope mapping of DNA topoisomerase I defines epitopes strongly associated with pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22 :344-351.

Rudolph, R., et H. Lillie. 1996. In vitro folding of inclusion proteins. *FASEB J.* 10 :49-56.

Samejima, K., P.A Svingen, G.S Basi, T. Kottke, P.W. Mesner, L. Stewart, F. Durrieu, G.G. Poirier, E.S. Alnemri, J.J. Champoux, S.H. Kaufmann et W.C Earnshaw. 1999. *J. Biol. Chem.* 274:435-4340.

Seelig, H.P., H. Schöter, H. Ehrfeld, et M. Renz. 1993. Autoantibodies against topoisomerase I detected with the natural enzyme and overlapping recombinant peptides. *J. Immunol. Methods.* 165 :241-252.

- Shero, J.H, B Bordwell, N.F. Rothfield, et W.C Earnshaw. 1986. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science*. 231 :737-740.
- Steen, V.D. 1996. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Bulletin on the rheumatic diseases* 45 : 6-8.
- Steen, VD., D.L Powell et T.A Medsger. 1988. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 31:196-203.
- Stewart, L., G.C. Ireton, L.H. Parkers, K.R. Madden, et J.J. Champoux. 1996. Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem*. 13 : 7593-7601.
- Stewart, L., M.R. Redinbo, X. Qiu, W.G.J. Hol, et J.J. Champoux. 1998. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*. 279 :1534-1540.
- Tan, E.M., E.K.L Chan, K.F. Sullivan, et R.L. Rubin. 1988. Antinuclear antibodies (ANAs) : diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 47 :121-141.
- Tsay, J.G., R-H. Fann, et J. Hwang. 1990. Specificity of anti-Scl-70 antibodies in scleroderma : increased sensitivity of detection using purified DNA topoisomerase I from calf thymus. *J. Rheumatol*. 17 :1314-1319.
- Verheijen, R., B.A de Jong, E.H Obery, et W.J. van Venrooij: 1992. Molecular cloning of a major CENP-B epitope and its use for the detection of anticentromere autoantibodies. *Mol.Biol.Rep*. 16: 49-59
- Whyte, J., W.C. Earnshaw, J.J. Champoux, L.H. Parker, L. Stewart, N.D. Hall, et N.J. McHugh. 1995. Detection of anti-topoisomerase I antibodies using a full length human topoisomerase I recombinant protein purified from a baculovirus expression system. *Clin. Exp. Immunol*. 100 :214-218.
- Wong, C., S.Sridhara, J.C. Bardwell, et U. Jakob. 2000. Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques*. 28: 426-8

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche, M. Yves Raymond et D<sup>r</sup> Jean-Luc Senécal, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire de recherche, me permettant d'apprendre tant de choses.

Un merci tout particulier à Nathalie Brassard pour avoir répondu à mes nombreuses questions avec une égale patience, ainsi qu'à Mélanie Dieudé, Mélanie Arbour, Isabelle Clément et Monique Bernard pour tout le soutien technique... et moral! Merci pour les Vendredis après-midi et les conversations pas toujours scientifiques.

Enfin, j'aimerais remercier mon amie Manon Bernard qui est là pour moi depuis si longtemps et avec qui j'ai traversé la meilleure partie de cette longue période d'études.