

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Caractérisation de RoBP1, nouveau partenaire cellulaire des ribonucléoprotéines Ro
humaines et autoantigène potentiel dans des maladies autoimmunes.

Par

ÉLIE BARBAR

Service de rhumatologie

Programme d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

de l'Université de Sherbrooke

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en immunologie

Février 2000



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-61703-3

Canada

Aux deux êtres les plus chers. Je dédie ce
mémoire à ma mère et à mon père pour leur
amour inconditionnel, leur appui constant et
tous leurs sacrifices.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	i
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
RÉSUMÉ	x
1. INTRODUCTION	1
1.1 TOLÉRANCE.....	1
1.1.1 Lymphocytes T	2
1.1.2 Lymphocytes B.....	3
1.1.3 Anergie clonale.....	5
1.2 AUTOIMMUNITÉ	6
1.2.1 Mimétisme moléculaire.....	6
1.2.2 Épitopes cryptiques.....	7
1.2.3 Épitopes du « soi » modifiés.....	8
1.2.4 Activation polyclonale et superantigènes	9
1.2.5 Défaut apoptotique.....	9
1.2.6 Facteurs hormonaux et âge	10
1.2.7 Autoanticorps naturels et pathogéniques	11
1.2.8 Lymphocytes $\gamma\delta$	12
1.3 MALADIES AUTOIMMUNES	13
1.3.1 Lupus érythémateux disséminé et syndrome de Sjögren.....	13

1.3.2 Les ribonucléoprotéines Ro humaines	14
1.3.3 Anticorps anti-RNP Ro	18
1.3.4 Ro Binding Protein 1 (RoBP1)	19
1.3.5 RoBP1 et propagation de déterminants antigéniques	24
1.4 Protéine Sa et histone macroH2A	25
Objectifs de recherche.....	28
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	30
<u>2.1 Description des vecteurs utilisés pour le Clone3</u>	<u>30</u>
2.2 Description des vecteurs utilisés pour RoBP1	33
2.3 Culture bactérienne et préparation de l'ADN	36
2.4 Sous-clonage du Clone3 (macro-histone mH2A)	36
2.5 Séquençage du Clone3	37
2.6 Préparation des protéines recombinantes.....	38
2.6.1 Expression et préparation des protéines recombinantes	38
2.6.2 Nouvelle approche pour l'expression de protéines insolubles.....	39
2.6.3 Purification des protéines recombinantes	39
2.6.4 Renaturation de protéines recombinantes insolubles.....	40
2.7 Analyse des protéines recombinantes	41
2.7.1 Séparation sur gel SDS	41
2.8 Coloration des gels de SDS-PAGE.....	42
2.9 Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	42
2.10 Production d'anticorps anti-RoBP1 chez le lapin.....	43
2.10.1 Immunisation de lapins avec la recombinante 6xHis-A161	43

2.10.2 Préparation de l'ADN pour l'immunisation de lapins	43
2.10.3 Immunisation de lapins avec l'ADN de RoBP1	46
2.11 Immunopurification d'IgG de lapin anti-6xHis-A161	46
2.11.1 Liaison chimique de protéines sur membrane.....	46
2.11.2 Isolement d'IgG spécifiques à 6xHis-A161	46
2.12 Séparation cytoplasme/noyau par fractionnement à la digitonine	47
2.13 Sérums utilisés	47
2.14 Expériences d'immunobuvardage (<i>Western Blot</i>)	48
2.15 Expériences d'immunoprécipitation	48
2.15.1 Réticulation d'anticorps sur des billes de protéine A	48
2.15.2 Incubation avec un extrait protéique.....	49
2.16 Immunofluorescence indirecte	50
2.16.1 Préparation des lames (fixation à l'éthanol)	50
2.16.2 Préparation des lames (fixation à la paraformaldéhyde).....	51
2.16.3 Microscopie à fluorescence et microscopie confocale.....	52
3. RÉSULTATS (Partie I : Macrohistone mH2A).....	54
3.1 Séquençage partiel de la macro-histone mH2A.....	54
3.2 Expression et purification des protéines recombinantes du Clone3	58
3.2.1 Criblage de sérums de patients avec 6xHis-Clone3.....	58
4. RÉSULTATS (Partie II : RoBP1).....	65
4.1 Expression des protéines recombinantes.....	65
4.1.1 Purification des protéines recombinantes	68
4.2 Criblage de sérums de patients.....	73

4.3 Anticorps anti-RoBP1 de lapin.....	83
4.3.1 Immunopurification des IgG de lapin anti-RoBP1	85
4.4 Localisation cellulaire de RoBP1 par immunobuvardage et IPP.....	87
4.4.1 Co-immunoprécipitation de RoBP1 avec Ro60.....	90
4.4.2 Vérification de l'effet du NaCl sur la co-immunoprécipitation.....	93
4.5 Études d'immunofluorescence indirecte.....	96
4.5.1 Études de co-immunofluorescence indirecte	104
5. DISCUSSION	107
5.1 Macrohistone mH2A.....	107
5.2 RoBP1	108
REMERCIEMENTS	117
BIBLIOGRAPHIE	118

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure secondaire des ARN hY et des protéines Ro60 et La.....	16
Figure 2. Homologie de séquence protéique entre PUF60 et RoBP1	21
Figure 3. Comparaison des différentes régions protéiques entre PUF60 et RoBP1	22
Figure 4. Représentation schématique de la macrohistone de rat mH2A.1	27
Figure 5. Vecteurs pGex-4T-1 et pTrcHis B utilisés pour la surexpression des protéines de fusion GST-Clone3 et 6xHis-Clone3	31
Figure 6. Vecteurs pRSET A et pET-15b utilisés pour la surexpression des protéines de fusion 6xHis-RoBP1, 6xHis-A152 et 6xHis-A161	34
Figure 7. Vecteur pcDNA3.1/V5/His-TOPO utilisé pour l'immunisation de lapins.....	45
Figure 8. Séquence de l'ADN du Clone3	55
Figure 9. Séquence protéique du Clone3	57
Figure 10. Détermination de la solubilité des protéines recombinantes du Clone3.....	59
Figure 11. Détermination de la solubilité des protéines recombinantes du Clone3m.....	60
Figure 12. Purification des protéines GST-Clone3m et 6xHis-Clone3	61
Figure 13. Immunobuvardage de 6xHis-Clone3 avec des sérums de patients.....	63
Figure 14. Expression des protéines recombinantes 6xHis-RoBP1, 6xHis-A152 et 6xHis-A161	67
Figure 15. Profil d'hydropathie de RoBP1	69
Figure 16. Comparaison de l'efficacité de la purification des protéines recombinantes 6xHis-RoBP1 et 6xHis-A161	70
Figure 17. Gel coloré à l'argent de l'expression/purification de 6xHis-A161.....	72

Figure 18. Immunobuvardage de 6xHis-A161 avec différents sérums	74
Figure 19. Immunobuvardage d'un extrait de cellules HeLa avec différents sérums LED, LED/anti-Ro60 et Sjs.....	76
Figure 20. Compilation du criblage des sérums avec la protéine recombinante 6xHis- A161	78
Figure 21. Immunoprécipitation de RoBP1 native d'un extrait de cellules HeLa par des sérums LED et LED anti-Ro60	81
Figure 22. Immunobuvardage des sérums de lapins anti-RoBP1 avec 6xHis-A161 et avec un extrait de cellules HeLa.....	84
Figure 23. Immunobuvardage et immunoprécipitation de RoBP1 avec 6xHis-A161 et un extrait de cellules HeLa.....	86
Figure 24. Immunobuvardage et immunoprécipitation de RoBP1 avec des fractions cytoplasme/noyau de cellules HeLa.....	88
Figure 25. Co-IPP de Ro60 avec RoBP1 dans un extrait de cellules HeLa.....	91
Figure 26. Co-IPP de Ro60 avec RoBP1 dans un extrait de cellules HeLa, en présence de différentes concentrations de NaCl.	94
Figure 27. Immunofluorescence indirecte du contrôle cytoplasmique Jo1 (fixation à la PF)	97
Figure 28. Immunofluorescence indirecte du contrôle nucléaire U1 (fixation à la PF)....	98
Figure 29. Immunofluorescence indirecte de Ro60 (fixation à la PF).....	100
Figure 30. Immunofluorescence indirecte de RoBP1 (fixation à la PF).....	101
Figure 31. Immunofluorescence indirecte de RoBP1 (fixation à l'éthanol).....	102
Figure 32. Immunofluorescence confocale de RoBP1 et Ro60 (fixation à la PF).....	105

LISTE DES ABRÉVIATIONS

6xHis	Séquence de six histidines
a.a.	Acide aminé
AAN	Autoanticorps naturel
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ANA	Anticorps antinucléaires
APC	Cellule présentatrice d'antigène (<i>Antigen presenting cell</i>)
ARN	Acide ribonucléique
BCR	Récepteur des cellules B (<i>B cell receptor</i>)
BSA	Albumine sérique bovine
CD	« <i>Cluster of differentiation</i> »
CLAP	Inhibiteurs de protéases : chemostatine, leupeptine, antipaïne, pepstatine
Co-IPP	Co-immunoprécipitation
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EtBr	Bromure d'éthidium
Fas-L	Fas-ligand
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
<i>g</i>	Force de centrifugation
h	Heure

HEPES	Acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[éthanesulfonique]
His	Histidine
Ig	Immunoglobuline
IPP	Immunoprécipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
KOAc	Acétate de potassium
kpb	Kilopaire de bases
LB	Milieu de culture Luria-Bertani
MCF	Microscopie confocale de fluorescence
ME	Mercapto-2-éthanol
MF	Microscopie de fluorescence
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
min.	Minute
NaN ₃	Azoture de sodium
NGF	Nerve growth factor
Ni-NTA	Résine de Nickel / Acide Nitrilotriacétique / Agarose
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nucléotide
pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PF	Paraformaldéhyde
PF	Paraformaldéhyde
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
RNP	Ribonucléoprotéine
RoBP1	Ro Binding Protein 1
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
TAE	Tampon Tris-acétate / EDTA
TBE	Tampon Tris-borate / EDTA
TBS	Tampon Tris borate salin
TBS	Tampon Tris salin
TCA	Acide trichloroacétique
TCR	Récepteur des cellules T (<i>T cell receptor</i>)
Th	Cellules T <i>Helper</i>
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TRITC	Isothiocyanate de tétraméthyl rhodamine
UTR	Région terminale non-traduite (<i>Untranslated Terminal Region</i>)

RÉSUMÉ

Les maladies du tissu conjonctif sont des maladies autoimmunes dont l'étiologie demeure inconnue. Les symptômes sont variés (arthrite, inflammation, destruction de tissus, etc.) et souvent la durée de vie des patients atteints est diminuée. Les recherches actuelles portent sur les autoantigènes et les autoanticorps caractéristiques de ces maladies, notamment en ce qui touche à la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé et le syndrome de Sjögren. Ces autoanticorps sont dirigés contre diverses composantes du soi, soit certaines protéines cytoplasmiques, protéines nucléaires et les acides nucléiques. Les ribonucléoprotéines Ro sont des complexes formés par un des ARN hY en association avec des protéines appelées Ro60 et La. Ces protéines sont des cibles courantes d'autoanticorps et aident même dans le diagnostic de certaines maladies autoimmunes.

Dans nos laboratoires, quelques clones soupçonnés de correspondre à l'autoantigène Sa avaient été isolés par criblage d'une librairie d'expression à l'aide de sérums de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Un de ces clones (Clone3) correspondait à la macrohistone mH2A, une nouvelle forme d'histone. Nous avons séquencé ce clone et effectué un immunocriblage afin de déterminer son immunogénicité. Nos résultats sont négatifs car un seul des sérums testés avait une réactivité faible. Ainsi, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un rôle potentiel de la macrohistone mH2A dans les maladies autoimmunes.

Également, dans notre laboratoire, une autre protéine avait été identifiée suite à un criblage d'interaction de protéine avec une RNP Ro. Cette protéine qu'on a nommée *Ro Binding Protein 1* (RoBP1) est spécifique au complexe RNP Ro60^{hY5}. Un criblage de plusieurs sérums de patients atteints de maladies du tissu conjonctif nous a révélé une reconnaissance faible par plusieurs de ces sérums. Afin de pouvoir mieux caractériser RoBP1, nous avons généré des anticorps polyclonaux chez le lapin. Cela nous a permis d'effectuer des études d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence dont les résultats montrent une présence ubiquiste dans la cellule mais à prédominance nucléaire. De plus, une colocalisation partielle de RoBP1 avec Ro60 a été observée par microscopie confocale.

Nos résultats constituent une démarche préliminaire dans la caractérisation de cet autoantigène potentiel. En y ajoutant d'autres outils et techniques de laboratoire, nous croyons que les anticorps générés nous permettront de poursuivre la caractérisation de RoBP1 en espérant d'élucider sa fonction et sa relation avec les RNP Ro.

1. INTRODUCTION

1.1 TOLÉRANCE

Malgré les recherches actuelles visant à élucider les mécanismes déclencheurs, les causes des maladies autoimmunes demeurent inconnues. L'étiologie des maladies autoimmunes est probablement multifactorielle avec des caractéristiques génétiques et d'autres aspects immunologiques agissant au niveau systémique (Keene, 1996). Il n'est pas clair si les cellules qui produisent ou contrôlent des réactions autoimmunes sont défectueuses, stimulées par des antigènes croisés ou si une combinaison de ces facteurs est nécessaire au développement de la maladie. Depuis que Burnet a énoncé son concept de sélection clonale (Burnet, 1957), la délétion de clones (ou plutôt cellules) auto-réactifs est stipulée comme étant un moyen de défense de l'organisme contre le développement d'une réaction immune dirigée contre des antigènes du « soi ». Le bris de la tolérance envers le soi génère des maladies autoimmunes où l'organisme développe une agression contre ses propres tissus et/ou organes.

Durant leur développement, les lymphocytes subissent des processus de sélection afin de discriminer entre les cellules auto-réactives et les cellules « saines ». Il s'agit d'un phénomène de tolérance dont le rôle est de prévenir une attaque contre les éléments du soi. Plusieurs des facteurs affectant le bris de la tolérance ne sont pas spécifiques à l'antigène, ce qui explique le fait qu'un individu puisse développer plus qu'une maladie autoimmune. Il existe plusieurs mécanismes régissant la tolérance, soit la délétion clonale, l'anergie et l'ignorance.

1.1.1 Lymphocytes T

Les lymphocytes T se développent à partir de la moelle osseuse mais leurs précurseurs migrent vers le thymus où ils mûrissent. Cette maturation est dépendante de diverses interactions avec les cellules du microenvironnement thymique. Dans le thymus, les cellules T immatures (thymocytes) prolifèrent et se différencient. Durant leur développement, les thymocytes subissent des réarrangements génétiques de leur récepteur (TCR) pour ensuite être sélectionnés positivement et négativement afin d'aiguiser la spécificité du répertoire du TCR. Le TCR est un hétérodimère composé de deux chaînes glycoprotéiques transmembranaires, soit les chaînes α et β . La chaîne α est formée de régions variable (V), jonctionnelle (J) et constante (C), tandis que la chaîne β comporte les régions variable, de diversité (D), jonctionnelle et constante (Janeway et Travers P., 1997). L'organisation de ces segments de gènes encodant le TCR est similaire à celle des immunoglobulines. Donc, le répertoire du TCR est diversifié par des réarrangements et des mutations somatiques (Tonegawa, 1983) qui ont lieu durant la maturation lymphocytaire. L'activation des cellules T se fait par une stimulation et une signalisation via le TCR associé avec un complexe de trois protéines qu'on appelle CD3 (Janeway et Travers P., 1997).

L'initiation d'une réponse immune dépend de la capacité du lymphocyte T à reconnaître un antigène via son TCR. Les cellules présentatrices d'antigène (APC) sont spécialisées dans le traitement d'antigènes complexes ainsi que la présentation de petits déterminants antigéniques sur leur surface dans le contexte de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité MHC. Lors de la sélection thymique (centrale), les cellules T

expriment deux corécepteurs, soit le CD4 et le CD8. À la fin du processus de sélection, les thymocytes matures prêts au transport en périphérie expriment un seul des deux corécepteurs. Les cellules T CD4⁺ reconnaissent des peptides liés aux molécules du MHC classe II et sont des cellules sécrétant des cytokines, alors que les cellules CD8⁺ reconnaissent des peptides liés aux molécules du MHC classe I et sont des cellules effectrices cytotoxiques (Janeway et Travers P., 1997).

Les cellules T CD4⁺ sont dites *T helper* (Th) et classées en trois catégories, Th0, Th1 et Th2, selon le patron de cytokines qu'elles produisent (Lafaille, 1998). Dans le système immunitaire périphérique, l'exposition de cellules T CD4⁺ à des complexes peptides/MHC en absence d'une menace d'agression induit la tolérance à l'antigène ; cela est la résultante d'une baisse de fréquence clonale (délétion périphérique) et de l'induction d'un état où la cellule est réfractaire à la prolifération (anergie clonale) (Malvey et al., 1998).

1.1.2 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont produits dans la moelle osseuse. Leur fonction est de synthétiser et sécréter des anticorps qui sont des immunoglobulines (Ig) solubles et circulantes. Il existe cinq isotypes d'anticorps (IgA, IgD, IgE, IgG et IgM) dont les rôles sont d'opsoniser, neutraliser ou activer le complément (Janeway et Travers P., 1997). Bien que la structure de base des Ig soit composée de deux chaînes légères identiques et deux chaînes lourdes identiques (Porter, 1973), les IgA et les IgM peuvent former des

multimères. Les IgM sont des pentamères et à l'occasion des hexamères, tandis que les IgA sont dimériques dans les muqueuses et non dans le plasma (Janeway et Travers P., 1997). Chaque chaîne est formée de plusieurs régions, soit variable, jonctionnelle et constante pour les chaînes légères, et variable, jonctionnelle, de diversité et constantes pour les chaînes lourdes. De façon similaire au TCR, les immunoglobulines subissent elles aussi un réarrangement génétique aléatoire (Tonegawa, 1983), ce qui leur confère un caractère de structure diversifiée nécessaire à la liaison spécifique des Ig aux divers antigènes. Lors de la réponse immune, les cellules B sont activées et prolifèrent ; l'hypermutation des régions variables des gènes d'immunoglobulines permet d'augmenter l'affinité des anticorps pour l'antigène (French *et al.*, 1989).

Les cellules B autoréactives sont sujettes elles aussi à une élimination et une anergie fonctionnelle à différentes étapes de leur développement (Reeves *et al.*, 1997). L'initiation de la tolérance de cellules B nécessite un seuil de concentration d'antigène et d'affinité de récepteur. Les cellules B semblent ignorer des antigènes du soi présents à des concentrations inférieures à ce seuil et ne sont par conséquent ni rendues tolérantes ni activées. De telles cellules B sont potentiellement activables si elles sont exposées à des niveaux plus élevés d'antigène en parallèle avec une aide de cellules T spécifiques à l'antigène (Reeves *et al.*, 1997).

1.1.3 Anergie clonale

L'anergie clonale est due à une liaison de l'antigène avec la cellule T en absence de co-stimulation, tandis que l'absence de reconnaissance entre une cellule T et un antigène est appelée l'ignorance (Hayday et Geng, 1997).

Le CD40 est un récepteur mitogénique exprimé sur tous les lymphocytes B matures. Son ligand est la protéine gp39 (CD40L), exprimée transitoirement sur les cellules Th CD4⁺ activées *in vitro*, et induite *in vivo* chez les cellules T CD4⁺ suite à l'administration d'un antigène (Van den Eertwegh *et al.*, 1993). Un modèle propose que la signalisation via CD40 régule l'expression de B7.1 et B7.2 sur les cellules B. La reconnaissance d'un antigène par le TCR déclenche la régulation à la hausse de gp39 qui à son tour régule à la hausse B7.1 et B7.2 ; la cellule B costimule ainsi les cellules T à proliférer et produire des lymphokines (Noelle *et al.*, 1997). Par conséquent, si le signal réciproque via gp39 est bloqué, les cellules T reçoivent un seul signal et deviennent anergiques. L'importance de CD40-CD40L est qu'une déficience en CD40L (e.g. par administration d'anti-CD40L) bloque plusieurs mécanismes responsables du développement de l'inflammation (Noelle *et al.*, 1997).

L'état d'ignorance proviendrait soit de l'anergie, soit d'une absence de signaux et mécanismes induisant l'anergie. Dans ce cas, les cellules T matures ne peuvent pas recevoir les signaux ou l'aide appropriés, ce qui les laisse dans leur état de quiescence (Theofilopoulos, 1995).

1.2 AUTOIMMUNITÉ

Lors d'une agression antigénique, le système immunitaire doit éliminer les agents étrangers sans s'attaquer lui-même. Une absence de contrôle dans la réponse immune engendre des dommages ou de la destruction de cellules/tissus voisins. Plusieurs mécanismes intrinsèques régulent le système immunitaire dans la périphérie : régulation d'inhibition, changements dans le patron de cytokines, cellules T suppressives et réseaux idiotypiques (Ragheb et Lisak, 1998; Shoenfeld et George, 1997). Les maladies autoimmunes se manifestent quand une réponse adaptative spécifique est déclenchée contre des antigènes du soi. Normalement, l'organisme se débarrasse d'un antigène étranger lors d'une réponse immune. Cependant, quand une réponse immune contre des autoantigènes est maintenue, il devient difficile d'éliminer complètement l'antigène par les mécanismes effecteurs. Ainsi, cela cause une inflammation chronique et des dommages aux tissus impliqués. Plusieurs possibilités étiologiques potentielles dans l'induction de réponses autoimmunes pathogéniques ont été proposées. Il faut mentionner que ces mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs. Quelques hypothèses seront donc présentées.

1.2.1 Mimétisme moléculaire

Il y a souvent une association entre une infection récente et le début de maladie autoimmune chez des individus susceptibles génétiquement. Des épitopes (linéaires et/ou conformationnels) exprimés par les agents infectieux peuvent ressembler à des séquences présentes sur les antigènes du soi. Ainsi, une réponse immune provoquée contre l'agent infectieux pourrait résulter en l'activation croisée de cellules B et T contre des antigènes

du soi. C'est le mimétisme moléculaire (Ragheb et Lisak, 1998). Plusieurs auteurs tentent de mettre en évidence le rôle potentiel d'épitopes partagés dans certaines maladies autoimmunes en se basant sur la théorie du mimétisme moléculaire. Par exemple, le cas d'une cassette d'acides aminés QKRAA partagée entre différents micro-organismes et les allèles du HLA-DR β 1 de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (La Cava *et al.*, 1997). Aussi, une implication potentielle du virus Epstein-Barr dans l'autoimmunité du lupus érythémateux disséminé a été proposée ; des anticorps induits par un peptide de 20 a.a. de l'antigène nucléaire viral EBNA-2 pourraient réagir de manière croisée avec la RNP SmD1 grâce à une homologie entre le domaine C-terminal de cette dernière et le peptide viral (Incaprera *et al.*, 1998).

1.2.2 Épitopes cryptiques

Certaines protéines du soi sont exposées au système immunitaire à des niveaux trop bas pour engendrer une tolérance ou une activation de lymphocyte T. Ceci reflète soit la faible abondance ou la séquestration dans des sites de privilège immun tels l'œil, les gonades et le cerveau (Ando *et al.*, 1994). Comme les cellules B exposées à des niveaux d'antigène inférieurs au seuil d'activation, les cellules T reconnaissant de tels antigènes ne sont ni éliminées, ni activées, ni rendues anergiques ; elles demeurent dans un état d'ignorance immunologique (Murakami *et al.*, 1992;Reeves *et al.*, 1997). Au niveau des cellules T, la tolérance est en principe centrale (i.e. intrathymique) et applicable aux antigènes, localement synthétisés ou transportés de la périphérie, présentés sur des molécules du MHC par les APC. Une tolérance périphérique a été suggérée (i.e.

extrathymique), cependant cela fait encore l'objet de débat. Il existe un modèle murin de sclérose en plaques induite par un peptide MBP (*Myelin basic protein*) de 11 résidus. La réponse T immune débute avec le peptide de 11 résidus, mais évolue rapidement pour inclure d'autres épitopes cryptiques présents sur la MBP. Ainsi, des peptides cryptiques durant la réponse primaire deviennent des épitopes dominants dans la maladie chronique ; il est vraisemblable qu'un traitement aberrant (*processing*) et la présentation des peptides cryptiques de la MBP stimulent une seconde réponse T dans la maladie chronique (Mamula, 1998).

1.2.3 Épitopes du « soi » modifiés

Il existe une possibilité où des déterminants provenant d'agents infectieux puissent lier un antigène du soi et ainsi créer de nouveaux déterminants antigéniques qui n'étaient pas présents lors du développement lymphocytaire et envers lesquels une tolérance n'a pas été établie. Plusieurs exemples ont été cités dont le plus évident est celui où de nouveaux épitopes sont créés sur les anticorps mutés somatiquement durant la maturation de la réponse immune (Theofilopoulos, 1995). Malgré la détection occasionnelle d'autoanticorps anti-idiotypiques, on croit que de tels déterminants idiotypiques n'atteignent généralement pas un niveau adéquat pour induire une réponse immune pathogénique. Le meilleur exemple est celui du facteur « néphritique », un terme référant à un autoanticorps contre des déterminants néoantigéniques révélés sur la protéine C3 du complément durant l'activation du complément (Spitzer *et al.*, 1992). D'autres modèles stipulent que la création de néo-autodéterminants a lieu via la liaison de médicaments ou

autres groupes hapténiques à des molécules du « soi », ainsi que via des modifications moléculaires introduites par les mutations génétiques (Theofilopoulos, 1995).

1.2.4 Activation polyclonale et superantigènes

La tolérance maintenue via l'anergie peut être contournée par une activation par un superantigène (SAg ; e.g. entérotoxine staphylococcale) qui sert comme activateur polyclonal de cellules B et T. Les SAg sont produits par divers pathogènes (bactéries, virus, mycoplasmes) et se lient directement aux molécules du MHC sans être modifiées au préalable (Janeway et Travers P., 1997). La résultante est une production massive de cytokines par les cellule T CD4⁺. Les cellules T réagissant avec les SAg liés par le MHC classe II de cellules B peuvent stimuler mutuellement ces dernières, menant à la production d'immunoglobulines polyclonales et, dans certaines conditions, d'autoanticorps (Theofilopoulos, 1995).

1.2.5 Défaut apoptotique

Comme la prolifération cellulaire, l'apoptose (mort cellulaire programmée) est un processus physiologique continu associé avec le développement embryonnaire, la métamorphose, la maturation du système immunitaire et le « turnover » cellulaire. Ce type de mort cellulaire diffère de la nécrose; c'est un processus hautement régulé et induit par des stimuli, alors que la nécrose (état pathologique) est issue d'un échec dans le maintien de l'homéostasie après une blessure (Griffith et Ferguson, 1997). La protéine

Fas (APO-1; CD95) est une protéine de 45 kDa, de type transmembranaire I, appartenant à la famille du TNF et du NGF (Itoh *et al.*, 1991). Son ligand, FasL, est une protéine transmembranaire de type II, appartenant à la famille du TNF (Suda *et al.*, 1993). L'interaction Fas-FasL amène des changements morphologiques distincts dans le noyau et le cytoplasme, un clivage de la chromatine à des intervalles réguliers et un clivage endonucléolytique de l'ADN génomique à des sites internucléosomiaux. Par la suite, des corps apoptotiques sont formés avant d'être éliminés par les macrophages. Ce processus est régulé et se fait sans réponse inflammatoire.

L'apoptose régit la délétion clonale. Chez plusieurs lignées de souris, les gènes *lpr* (*lymphoproliferative*) et *gld* (*generalized lymphoproliferative disease*) sont deux mutations récessives autosomales spontanées qui induisent la production d'autoanticorps et une lymphadénopathie massive par accumulation de cellules T CD4⁺CD8⁻, i.e. lymphocytes non matures (Suda et Nagata, 1997). Ces gènes encodent Fas et FasL; ainsi, le bris de la tolérance est en partie dû à une déficience dans le système apoptotique où les cellules T et B autoréactives ne sont pas éliminées.

1.2.6 Facteurs hormonaux et âge

Les facteurs hormonaux peuvent contribuer au bris de la tolérance. Il est bien connu que la fréquence de maladies autoimmunes est plus élevée chez les femmes, soit 10-20 fois plus pour le lupus érythémateux disséminé et 3 fois plus pour la polyarthrite rhumatoïde (Janeway et Travers P., 1997). Les mécanismes sous-jacents influençant l'autoimmunité

demeurent inconnus. Enfin, l'âge pourrait être un facteur étant donné que l'incidence de maladies autoimmunes augmente avec l'âge. Ceci reflète probablement un échec dans le contrôle des voies immunes centrale et périphérique.

1.2.7 Autoanticorps naturels et pathogéniques

Les cellules B autoréactives constituent une part substantielle du répertoire de cellules B. Ce répertoire sécrète les autoanticorps naturels (AAN), caractérisés par leur large spectre de réactivité contre des épitopes « publics » bien conservés chez les individus d'une même espèce (Dighiero, 1997). Ils sont classés comme autoanticorps car ils sont autoréactifs, cependant ils ne sont pas autospécifiques. La présence de ce répertoire en conditions normales remet en question la théorie de délétion clonale comme explication unique de la tolérance.

Les AAN peuvent constituer un système immunitaire archaïque pouvant jouer un rôle de défense primaire. Également, ce répertoire d'AAN polyréactifs est prévalent chez les poissons et les batraciens. Ces animaux sont incapables de générer des mutations somatiques et produire des anticorps de haute affinité/spécificité, d'où leur répertoire moins diversifié (Du Pasquier, 1993). Lorsque la possibilité de haute diversification est absente, il devient probable que la seule alternative soit la production de ces anticorps polyréactifs de faible affinité. Même lorsque la réponse mémoire contre des xénoantigènes est possible, 5-6 jours sont requis avant d'obtenir des anticorps de haute affinité. Le répertoire d'AAN pourrait contrer l'agression pendant ce temps (Dighiero, 1997).

Une autre hypothèse est que les autoanticorps pathogéniques (AAP) résulteraient d'une sélection des cellules B autoréactives guidée par l'antigène (Janeway et Bottomly, 1994) qui, sous la pression de sélection imposée par l'antigène, subit des mutations somatiques aboutissant aux AAP (Shlomchik *et al.*, 1987). Cependant, il n'est pas clair si les AAN encodés par les cellules germinales servent de modèle pour les AAP, ou si ces AAN dérivent d'une cellule B différente.

1.2.8 Lymphocytes $\gamma\delta$

Environ 1-5% des cellules T portent une forme alternative du TCR ayant des chaînes γ et δ au lieu de α et β (Janeway et Travers P., 1997). Contrairement au TCR $\alpha\beta$, le TCR $\gamma\delta$ ne semble pas restreint par le MHC de classe I ou II. En effet, les APC professionnelles (i.e. cellules dendritiques et macrophages) ne sont pas nécessaires en général pour la reconnaissance des cellules $\gamma\delta$ (Schild *et al.*, 1994). Des nouvelles observations intéressantes évoquent un nouveau mécanisme pouvant réguler la tolérance *in vivo*. Ainsi, les cellules T $\gamma\delta$ pourraient être impliquées dans la régulation de maladies autoimmunes en interagissant avec les ligands naturels du soi suivant un stress cellulaire (Hayday et Geng, 1997). Par conséquent, cela définit un potentiel d'autoréactivité des cellules $\gamma\delta$.

1.3 MALADIES AUTOIMMUNES

1.3.1 Lupus érythémateux disséminé et syndrome de Sjögren

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par des autoanticorps dirigés contre plusieurs composantes du soi, notamment l'ADN, les histones, les ribosomes, les snRNP (*Small nuclear ribonucleoproteins*) et les scRNP (*Small cytoplasmic ribonucleoproteins*) (Janeway et Travers P., 1997). La maladie est cliniquement très diversifiée et peut impliquer plusieurs organes et/ou systèmes. Le dénominateur commun parmi les patients atteints de LED est la production d'autoanticorps de type IgG et des niveaux sériques élevés d'anticorps antinucléaires (ANA) (Kotzin, 1996). De plus, contrairement à d'autres maladies autoimmunes, les cellules T ne semblent pas jouer un rôle direct dans le dommage tissulaire dans le LED; cependant, elles sont impliquées dans le développement d'autoanticorps, sachant que le LED est associé à des allèles particuliers du MCH classe II et qu'il y a une maturation d'affinité des autoanticorps IgG (Kotzin, 1996).

Le syndrome de Sjögren (SjS) est cliniquement moins diversifié que le LED et est généralement caractérisé par l'inflammation des glandes salivaires et lacrymales. Néanmoins, cette maladie est associée avec l'autoimmunité systémique, fréquemment sous forme de ANA (Scofield *et al.*, 1999).

1.3.2 Les ribonucléoprotéines Ro humaines

Les ribonucléoprotéines Ro (RNP Ro) humaines sont des complexes autoantigéniques composés d'un des quatre ARN hY (1,3,4 ou 5) et de protéine Ro60 et/ou La. Les ARN Y sont transcrits par l'ARN polymérase III et n'encodent aucune protéine. Les ARN hY sont des petits ARN de taille variant entre 83 et 112 nucléotides (Figure 1) et forment une structure tige/boucle avec une cytidine protubérante (*bulge*) nécessaire à la liaison d'une protéine de 60 kDa nommée Ro60 (Pruijn *et al.*, 1991; Wolin et Steitz, 1984). La protéine Ro60 s'associe aux ARN hY via une double hélice formée par l'appariement entre les extrémités 5' et 3' de l'ARN hY. Ro60 ne semble pas être essentielle à la survie de l'organisme; une invalidation du gène (*knock-out*) chez la souris n'affecte pas la viabilité mais engendre des défauts phénotypiques (S. Wolin, résultats non publiés). Il en est ainsi pour ROP-1 (l'homologue de Ro60 chez *Caenorhabditis elegans*) où l'inactivation du gène n'entraîne pas de défauts phénotypiques mais où au niveau moléculaire on observe une diminution importante de l'ARN Y (ARN CeY) associé à ROP-1 (Labbe *et al.*, 1999).

Quoique les ARN hY furent été décrits initialement comme étant cytoplasmiques (Hendrick *et al.*, 1981), des études de fractionnement de cellules HeLa montrent une rétention nucléaire de la RNP Ro^{hY5} et cytoplasmique des RNP Ro^{hY1,3,4} dans des cultures cellulaires humaines et murines (Gendron M., non publiés). D'autre part, des études d'immunofluorescence révèlent une distribution nucléaire de Ro60 (Keech *et al.*, 1994; Wahren *et al.*, 1996). Quant aux études d'énucléation, certaines indiquent une localisation cytoplasmique de la RNP Ro (O'Brien *et al.*, 1993) alors que d'autres

indiquent une présence cytoplasmique et nucléaire de Ro60 (Peek *et al.*, 1993). De plus, des études d'immunomicroscopie électronique (Farris *et al.*, 1997) et de microinjection de Ro60 dans des oocytes de grenouille (Simons *et al.*, 1996) supportent la localisation cytoplasmique et nucléaire de Ro60. Donc, ces diverses approches techniques et les résultats qui en découlent rendent difficile l'établissement d'un consensus sur la localisation des RNP Ro.

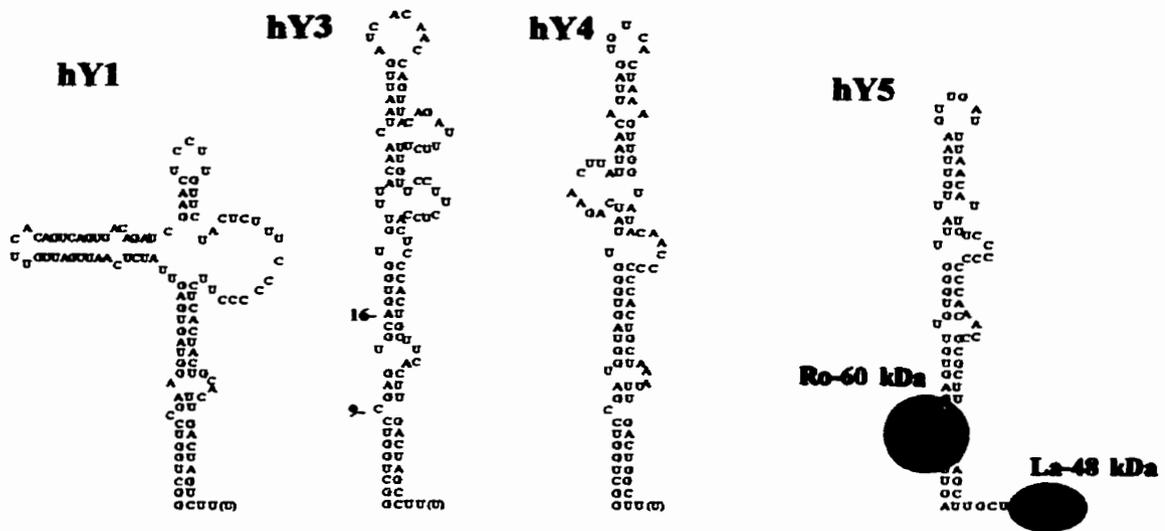


Figure 1. Structure secondaire des ARN hY et des protéines Ro60 et La

Les ARN hY sont des petits ARN de taille variant entre 83 et 112 nucléotides. La protéine Ro60 se lie aux ARN hY via une double hélice formée par l'appariement entre les extrémités 5' et 3' de l'ARN hY tandis que la protéine La se lie à l'extrémité 3' polyuridylée de l'ARN.

Une seconde protéine de 48 kDa nommée La s'associe à une fraction des RNP Ro humaines. Le polypeptide La comprend au moins deux domaines structuraux dont chacun contient un domaine antigénique distinct. La protéine La facilite la maturation des transcrits de l'ARN polymérase III, lie directement un large spectre d'ARN et s'associe du moins transitoirement avec Ro60 (Brucato *et al.*, 1999). Les protéines La sont des phosphoprotéines conservées, abondantes et prédominantes dans le noyau; elles se lient à l'extrémité 3' polyuridylée des transcrits de l'ARN polymérase III (Lin-Marq et Clarkson, 1998). Alors que les RNP Ro sont retrouvées principalement dans le cytoplasme, les autres RNP La sont principalement nucléaires (Pruijn *et al.*, 1997).

Il n'y a pas de fonction(s) associée(s) avec le complexe RNP Ro ou ses composantes dans les cellules de mammifères; néanmoins, un rôle possible pour la fraction nucléaire de Ro60 dans la voie d'élimination des précurseurs de l'ARNr 5S défectueux a été décrit chez les ovocytes de *Xenopus laevis* (O'Brien et Wolin, 1994). Aussi, chez *X. laevis*, un travail a porté sur une implication de Ro60 dans l'interaction alternative des protéines La et CNBP (*Cellular Nucleic Acid Binding Protein*) avec le 5'-UTR de l'ARNm de la protéine ribosomale L4 (Pellizzoni *et al.*, 1998). Enfin, Ro60 est phosphorylée *in vivo*, mais cela n'affecte pas le patron de reconnaissance par les anti-Ro60 (Ramos-Deleon et Herrera-Esparza, 1998).

Il existe une autre protéine Ro de 52 kDa, appelée Ro52, dont l'interaction avec les RNP Ro demeure un sujet de controverse. Certains croient que Ro52 lie le complexe RNP via la protéine Ro60 (Slobbe *et al.*, 1991), mais contrairement à cette idée, des études

biochimiques ont montré que Ro52 n'est pas une composante stable des complexes RNP Ro antigéniquement intacts (Boire *et al.*, 1995;Kelekar *et al.*, 1994). D'autre part, des données controversées ont été publiées concernant l'association de la calréticuline avec les RNP Ro, cependant des données récentes indiquent que la calréticuline non-phosphorylée peut interagir avec les ARN hY directement (Pruijn *et al.*, 1997). La signification physiologique de cette interaction demeure inconnue.

1.3.3 Anticorps anti-RNP Ro

Durant les dernières décennies, les protéines ciblées par les ANA ont été caractérisées. Deux de ces autoantigènes sont les protéines Ro60 (ou *Sjögren's syndrome A*, SS-A) et La (SS-B). Les anti-Ro sont retrouvés dans les sérums de 30% à 50% des patients lupiques, alors que le pourcentage est plus élevé chez les patients atteints de SjS (Scofield *et al.*, 1999).

L'importance des RNP Ro est que les autoanticorps anti-RNP Ro sont les anticorps plus fréquemment développés par les patients souffrant de maladies du tissu conjonctif (Tan, 1989). Il s'agit de marqueurs sérologiques utilisés pour dépister certaines formes de lupus et de SjS. Malheureusement, leur implication au niveau pathologique est encore mal connu, à savoir s'ils possèdent un rôle pathologique ou s'ils dérivent d'une cascade autoimmune. L'absence de fonction(s) cellulaire(s) associée(s) aux RNP Ro empêche la compréhension de leur implication pathologique. Ainsi, il devient important de

déterminer les fonctions cellulaires des RNPs Ro de manière à éclaircir le mécanisme de développement et d'action des autoanticorps anti-RNP Ro.

Enfin, des autoanticorps contre une nouvelle phosphoprotéine de 75 kDa (*pp75*) ont été identifiés (Wang *et al.*, 1999). Cette protéine est associée avec Ro60 via l'extrémité C-terminale de Ro60. L'antigénicité de *pp75* n'est pas élevée (prévalence de 18% chez des mères ayant des bébés atteints de lupus néonatal), mais une interaction transitoire *in vivo* a été proposée.

1.3.4 Ro Binding Protein 1 (RoBP1)

Lors d'une recherche de partenaires cellulaires du complexe RNP Ro, les travaux du Dr Pascal Bouffard (Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke) ont permis d'identifier et de caractériser une protéine nouvelle contenant trois motifs de liaison à l'ARN (RRM) et capable de lier spécifiquement le complexe RNP Ro60^{hY5} ; on l'a nommée *Ro Binding Protein 1* ou RoBP1 (Bouffard *et al.*, 2000). La protéine a été identifiée par un criblage de librairie d'expression d'ADNc humains dans un système triple-hybride (SenGupta *et al.*, 1996) modifié utilisant le complexe Ro60/ARN hY5 comme appât (Bouffard *et al.*, 1999). La protéine RoBP1 possède trois motifs RRM (*RNA recognition motif*); donc, elle est membre de la famille des protéines liant l'ARN. La protéine complète possède 559 a.a. et migre par SDS-PAGE à ~65 kDa, mais il existe au moins deux ARNm différents correspondant à des protéines de 542 a.a. et 530 a.a. Ces observations suggèrent un épissage alternatif. Cependant on ignore s'il existe effectivement deux protéines

exprimées. L'ARNm est d'environ 2000 bases (présence d'une séquence 5'-UTR de 64 pb et d'une séquence 3'-UTR de 202 pb incluant la queue polyadénylée) et est présent dans 16 tissus humains testés, ce qui suggère une expression ubiquiste, comme Ro60.

Dans les banques de données, la séquence de RoBP1 correspond presque exactement à *Siah Binding Protein* humaine (SiahBP1) identifiée par David Bowtell (GenBank, numéro d'accès U51586) mais notre clone ne possède pas la région A (Figure 3). De plus, une protéine liant l'ARN, spécifique à des séquences d'ARN et homologue à la SiaBP1 a récemment été identifiée chez le rat par Poleev et Stamm (GenBank, numéro d'accès AF165892). L'homologie de l'ADNc de RoBP1 comparée à SiahBP1 humaine et de rat est de 99% et 89% respectivement, ce qui suggère une conservation entre les espèces. RoBP1 est identique à une autre protéine nommée PUF60 (*PolyU Factor 60*) identifiée par le Dr Patrick McCaw (laboratoire du Dr Phillip A. Sharp, MIT, Cambridge, MA) (Page-McCaw *et al.*, 1999). Un alignement de séquence protéique entre les protéines RoBP1 et PUF60 (programme *Multiple Alignment* disponible gratuitement sur le site internet http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html) montre une homologie de 100% (Figure 2) si on exclut la région A. Finalement, soulignons que ces trois protéines identiques (SiahBP humaine, SiahBP de rat et PUF60) ont été isolées dans des contextes différents du nôtre et qu'il n'y a pas encore de publications au sujet de SiahBP humaine et SiahBP de rat.

↓

```

PUF60, 1 MATATIALQVNGQQGGGSEPAAAAVVAAGDKWKPPQGTDS IKMENGQSTAAKLGLP
RoBP1, 1 MATATIAL-----GTDS IKMENGQSTAAKLGLP

PUF60, 61 PLTPEQQEALQKAKKYAMEQS IKSVLVKQTIAHQQQQLTNLQMAAVTMGFGDPLSPLQSM
RoBP1, 29 PLTPEQQEALQKAKKYAMEQS IKSVLVKQTIAHQQQQLTNLQMAAVTMGFGDPLSPLQSM

PUF60, 121 AAQRQRALAIMCRVYVGS IYYELGEDTIRQAFAPFGPIKS IDMSWDSVTMKHKGFAFVEY
RoBP1, 89 AAQRQRALAIMCRVYVGS IYYELGEDTIRQAFAPFGPIKS IDMSWDSVTMKHKGFAFVEY

PUF60, 181 EVPEAAQLALEQMNSVMLGGRNIKVGRPSNIGQAQPIIDQLAEEARAFNRIYVASVHQDL
RoBP1, 149 EVPEAAQLALEQMNSVMLGGRNIKVGRPSNIGQAQPIIDQLAEEARAFNRIYVASVHQDL

PUF60, 241 SDDDIKSVFEAFGKIKSCTLARDPTTGKHKGYGFIEYEKAQSSQDAVSSMNLFDLGGQYL
RoBP1, 209 SDDDIKSVFEAFGKIKSCTLARDPTTGKHKGYGFIEYEKAQSSQDAVSSMNLFDLGGQYL

PUF60, 301 RVGKAVTPPMPLLT PATPGGLPPAAAVAAAAATAKITAQEAVAGAAVLGTLGTPGLVSPA
RoBP1, 269 RVGKAVTPPMPLLT PATPGGLPPAAAVAAAAATAKITAQEAVAGAAVLGTLGTPGLVSPA

PUF60, 361 LTLAQPLGTLFQAVMAAQAPGVITGVTPARPPIPVTIPSVGVVNPILAS PPTLGLLEPKK
RoBP1, 329 LTLAQPLGTLFQAVMAAQAPGVITGVTPARPPIPVTIPSVGVVNPILAS PPTLGLLEPKK

PUF60, 421 EKEEEELFPESERPEMLSEQEHMSISGSSARHMVMQKLLRKQESTVMVLRNMVDPKDIDD
RoBP1, 389 EKEEEELFPESERPEMLSEQEHMSISGSSARHMVMQKLLRKQESTVMVLRNMVDPKDIDD

PUF60, 481 DLEGEVTEECGKFGAVNRV IYQEKQGEEDAEIIVKIFVEFSIASETHKAIQALNGRWF
RoBP1, 449 DLEGEVTEECGKFGAVNRV IYQEKQGEEDAEIIVKIFVEFSIASETHKAIQALNGRWF

PUF60, 541 AGRKVVAEVYDQERFDNSDLA
RoBP1, 509 AGRKVVAEVYDQERFDNSDLA

```

Figure 2. Homologie de séquence protéique entre PUF60 et RoBP1

L'identité est de 100% sur 522 a.a. communs à PUF60 et RoBP1, à partir de la flèche ↓ jusqu'à la fin des protéines. Les traits d'union (-) indiquent les acides aminés présents sur PUF60 mais pas sur RoBP1. Le domaine de dimérisation est indiqué en caractères gras.

Figure 3. Comparaison des différentes régions protéiques entre PUF60 et RoBP1

Le clone de PUF60 complet (A152) comporte les trois régions. Le clone de PUF60 tronqué (A161) ne possède pas la région D de dimérisation (domaine tronqué par délétion). Le clone de RoBP1 (Clone 2.1) ne possède pas la région A.

En bleu : région A présente chez PUF60 mais absente chez RoBP1

En rouge : région B

En souligné : région D de dimérisation en N-terminal.

PUF60 (A152, forme complète)

MATATIALQVNGQQGGGSEPAAAAVVAAGDKWKPPQGTDSIKMENGQSTAACKLGLPPLTPEQQEALQKAK
KYAMEQSIKSVLVKQTIHAHQQQQLTNLQMAAVTMGFGDPLSPLQSMQAQRQALAIMCRVYVGSIIYYELGE
DTIRQAFAPFGPIKSIDMSQDSVTMKHKGFAFVEYEVPEAAQLALEQMNSVMLGGRNIKVGRPSNIGQAQP
IIDQLAEEARAFNRIYVASVHQDLSDDDIKSVFEAFGKIKSCTLARDPTTGKHKQYGFIEYEKAQSSQDAV
SSMNLFDLGGQYLRVGKAVTPPMPLLT PATPGGLPPAAAVAAAAATAKITAQEAVAGA AVLGLTGLTPGLVS
PALTLAQPLGTLPOAVMAAQAPGVITGVTPARPPIPVTIPSVGVVNPILAS PPTLGLLEPKKEKEEEEELFP
ESERPEMLSEQEHMSISGSSARHMVMQKLLRKQESTVMVLRNMVDPKDIDDDLEGEVTEECGKFGAVNRVI
IYQEKQGEEEDAIEIVKIFVEFSIASETHKAIQALNGRWFAGRKVVQEVYDQERFDNSDLA-

PUF60 (A161, forme tronquée en C-terminal)

MATATIALQVNGQQGGGSEPAAAAVVAAGDKWKPPQGTDSIKMENGQSTAACKLGLPPLTPEQQEALQKAK
KYAMEQSIKSVLVKQTIHAHQQQQLTNLQMAAVTMGFGDPLSPLQSMQAQRQALAIMCRVYVGSIIYYELGE
DTIRQAFAPFGPIKSIDMSQDSVTMKHKGFAFVEYEVPEAAQLALEQMNSVMLGGRNIKVGRPSNIGQAQP
IIDQLAEEARAFNRIYVASVHQDLSDDDIKSVFEAFGKIKSCTLARDPTTGKHKQYGFIEYEKAQSSQDAV
SSMNLFDLGGQYLRVGKAVTPPMPLLT PATPGGLPPAAAVAAAAATAKITAQEAVAGA AVLGLTGLTPGLVS
PALTLAQPLGTLPOAVMAAQAPGVITGVTPARPPIPVTIPSVGVVNPILAS PPTLGLLEPKKEKEEEEELFP
ESERPEMLSEQEHMSISGSSARHMVMQKLLRKQESTVMVLRNMVDPKDIDDDLEGEVTEECGKFGAVNRVI
IYQEKQGEEEDAIEIVKI

RoBP1(Clone 2.1, sans la région A)

MATATIALGTDSIKMENGQSTAACKLGLPPLTPEQQEALQKAKKYAMEQSIKSVLVKQTIHAHQQQQLTNLQ
AAVTMGFGDPLSPLQSMQAQRQALAIMCRVYVGSIIYYELGEDTIRQAFAPFGPIKSIDMSWDSVTMKHKG
FAFVEYEVPEAAQLALEQMNSVMLGGRNIKVGRPSNIGQAQPIIDQLAEEARAFNRIYVASVHQDLSDDDI
KSVFEAFGKIKSCTLARDPTTGKHKGYGFIEYEKAQSSQDAVSSMNLFDLGGQYLRVGKAVTPPMPLLT PA
TPGGLPPAAAVAAAAATAKITAQEAVAGA AVLGLTGLTPGLVSPALTLAQPLGTLPOAVMAAQAPGVITGV
TPARPPIPVTIPSVGVVNPILAS PPTLGLLEPKKEKEEEEELFPESERPEMLSEQEHMSISGSSARHMVMQK
LLRKQESTVMVLRNMVDPKDIDDDLEGEVTEECGKFGAVNRV IYQEKQGEEEDAIEIVKIFVEFSIASETH
KAIQALNGRWFAGRKVVAEVYDQERFDNSDLA-

1.3.5 RoBP1 et propagation de déterminants antigéniques

La réponse immune envers une région peptidique d'un autoantigène peut se propager de façon intramoléculaire sur tout l'autoantigène et/ou de façon intermoléculaire sur les protéines qui lui sont associées. Cette propagation est courante dans les maladies systémiques non spécifiques aux organes. Des modèles murins tentent d'expliquer ce phénomène. Une immunisation de souris saines avec les composantes protéiques individuelles des RNP Ro/La induit la production d'anticorps reconnaissant les protéines Ro60, Ro52, La et, dans certains cas, les chaperones moléculaires calréticuline et Grp78 (McCluskey *et al.*, 1998). Les antigènes endogènes menant à la propagation de déterminants pourraient dériver d'apoptose physiologique, ce qui expliquerait l'implication de chaperones dans la réponse immune. Curieusement, toutes ces protéines ne partagent pas de déterminants antigéniques entre elles (Brucato *et al.*, 1999). Rappelons également l'hypothèse du mimétisme moléculaire qui est étroitement lié à la propagation d'épitopes (Incaprera *et al.*, 1998)

La propagation des déterminants antigéniques semble être l'hypothèse la plus plausible pour expliquer le fait que des autoanticorps soient dirigés contre toutes les composantes protéiques des RNP Ro. De plus, la théorie des épitopes cryptiques a récemment été élargie en postulant qu'une fois la réponse initiée contre un déterminant cryptique, il se pourrait qu'une seconde vague de réponses, contre des épitopes cryptiques intermoléculaires et intramoléculaires additionnels, soit déclenchée par le mécanisme de propagation d'épitopes (Theofilopoulos, 1995).

Étant donné l'interaction des RNP Ro avec RoBP1, il est possible que cette dernière soit elle aussi une cible d'autoanticorps issus d'une expansion d'épitopes, soit par des homologies linéaires ou conformationnelles avec les autres composantes des RNP Ro.

1.4 Protéine Sa et histone macroH2A

La protéine Sa est un autoantigène identifié dans nos laboratoires et dont la nature et le rôle sont inconnus ; les autoanticorps dirigés contre cette protéine montrent une spécificité de 98.9% pour la polyarthrite rhumatoïde (Després *et al.*, 1994). Lors d'un criblage pour identifier l'autoantigène Sa, les travaux du Dr Normand Després (Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke) ont mis en évidence quelques clones dont un (le Clone3) correspondait à une macrohistone H2A (mH2A) identifiée chez le rat (Pehrson et Fried, 1992). Le Clone3 semblait être l'homologue humain de mH2A de rat ; effectivement, la macroH2A humaine a été isolée du foie humain (Lee *et al.*, 1998) et des cellules souches hématopoïétiques humaines CD34⁺ (Mao *et al.*, 1998). Les réactions autoimmunes dirigées contre les histones sont bien connues (Fritzler et Tan, 1978) ; un criblage de sérums effectué par M. Marc-André Laniel (Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke) indiquait que le Clone3 n'apportait rien de nouveau en tant qu'autoantigène, d'autant plus qu'un seul sérum le reconnaissait.

La macroH2A est une nouvelle histone nucléosomale contenant une région ressemblant à l'histone H2A ainsi qu'une grande région nonhistone (Figure 4). La protéine est

d'environ 39 kDa, soit trois fois la taille de l'histone conventionnelle, et il existe deux sous-types, soit macroH2A1 et macroH2A1.2 (Pehrson *et al.*, 1997). On note également la présence d'une région basique et un motif « *leucine zipper* » d'interactions protéine-protéine (McKnight *et al.*, 1988) absente chez les histones conventionnelles, ce qui suggère un rôle dans le positionnement du nucléosome à une séquence spécifique d'ADN, via une interaction avec des facteurs de transcription (Pehrson et Fried, 1992).

La macrohistone H2A semble être assez conservée chez les espèces malgré la distance phylogénique qui les sépare dans l'évolution (Pehrson et Fuji, 1998). Sa distribution est concentrée dans le foie et le rein adulte, plus faible dans le foie et le rein foetaux et indétectable dans les testicules et le thymus, soit des tissus où la division et la différenciation cellulaires sont actives (Pehrson *et al.*, 1997). De plus, la partie nonhistone a été cristallisée (Vijay-Kumar *et al.*, 1995). Présentement, la distribution est connue mais la fonction de la macrohistone H2A est inconnue. Un rôle dans l'inactivation du chromosome X chez la femelle des mammifères a été suggérée (Costanzi et Pehrson, 1998).

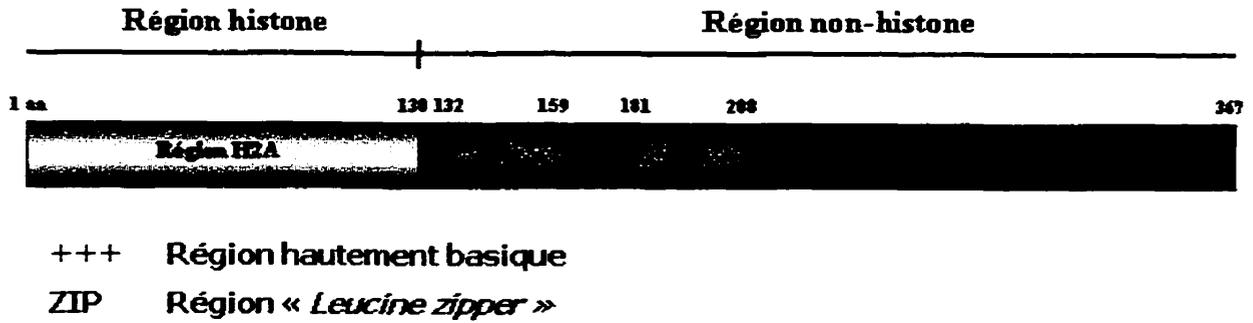


Figure 4. Représentation schématique de la macrohistone de rat mH2A.1

La macrohistone mH2A est une protéine d'environ 39 kDa. Le premier tiers est une région histone correspondant à l'histone H2A ; les deux tiers restants correspondent à une grande région nonhistone comprenant une région hautement basique et un motif « *leucine zipper* » d'interaction protéine-protéine (Pehrson et Fried, 1992).

Objectifs de recherche

La première partie (résultats et discussion) de ce mémoire traitera de la caractérisation du Clone3 correspondant à la macrohistone. Ce clone avait été séquencé partiellement et sa séquence correspondait à une macrohistone de rat. Nous voulions caractériser le Clone3 (mH2A) en effectuant une surexpression en bactérie comme protéine de fusion, en séquençant (afin de permettre sa comparaison avec les banques de données) et en étudiant son immunogénicité, étant donné que le clone avait été isolé suite à un criblage avec des sérums de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.

La deuxième partie du mémoire concerne RoBP1. Notre hypothèse est que l'immunogénicité des RNP Ro découle de leur(s) fonction(s), structure et/ou interactions intracellulaires. La définition des fonctions des RNP Ro et de leurs partenaires cellulaires est cruciale pour comprendre les liens entre les maladies autoimmunes et la production d'autoanticorps dirigés contre les composantes des RNP Ro. Ayant identifié la protéine RoBP1 et démontré une interaction spécifique avec la particule RNP Ro60^{hY5} dans un système eucaryote de levure, le Dr Pascal Bouffard a tenté de surexprimer RoBP1 par la voie d'une protéine recombinante en fusion avec une séquence de polyhistidine dans un système procaryote. Le but était d'obtenir une source protéique abondante aidant à la caractérisation, mais malheureusement les tentatives ont été vaines. Malgré l'essai de deux types de vecteurs d'expression permettant l'obtention d'une protéine de fusion 6xHis ou GST, il était très difficile de produire la protéine.

La base de mon travail repose sur les travaux précédents du Dr Bouffard. Mon rôle était donc d'intervenir au niveau protéique et immunologique en essayant de produire RoBP1 et de la purifier. Avec cette recombinante nous voulions vérifier son immunogénicité en criblant des sérums de patients atteints de différentes maladies du tissu conjonctif, notamment le LED et le SjS, afin de trouver une source abondante d'anticorps dirigés contre RoBP1. En même temps, nous voulions produire des anticorps dirigés contre RoBP1 chez le lapin au cas où nous serions dans l'impossibilité d'identifier un sérum humain apte à la reconnaître dans des conditions natives. L'identification ou l'obtention d'un sérum anti-RoBP1 nous permettra de poursuivre nos études de caractérisation de l'interaction avec le complexe RNP Ro60, soit par immunoprécipitation, co-immunoprécipitation, localisation cellulaire, microscopie de fluorescence et microscopie confocale.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Description des vecteurs utilisés pour le Clone3

Les vecteurs procaryotes utilisés permettent l'expression de protéines recombinantes soit en fusion avec la GST ou en fusion avec une séquence de six histidines (6xHis) permettant de les purifier sur une colonne de glutathione ou de nickel respectivement. Aussi, la taille de 6xHis est inférieure à 0.7 kDa, comparée à la GST qui est de 26 kDa. Donc, 6xHis n'affecte pratiquement pas la protéine recombinante ce qui offre un avantage, surtout lorsque l'expression protéique est difficile et implique des protéines insolubles. Nous avons travaillé en premier avec le vecteur pGex-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie-D'Urfé, QC) et par la suite nous avons utilisé le vecteur pTrcHis B (Invitrogen Corp., San Diego, CA) et travaillé avec ce dernier pour la plupart des expériences.

Les vecteurs pTrcHis B et pGex-4T-1 (Figure 5) sont utilisés pour l'expression du Clone3 qui y est inséré au site de restriction EcoRI (pour la protéine complète, Clone3) ou par les enzymes BamHI/EcoRI (pour la partie « macro » non-histone, Clone3m [m : macro]) et maintenu dans la souche bactérienne *E. coli* K12 PR745 déficiente en protéases, ce qui réduit la dégradation des protéines surexprimées.

Figure 5. Vecteurs pGex-4T-1 et pTrcHis B utilisés pour la surexpression des protéines de fusion GST-Clone3 et 6xHis-Clone3

L'ADNc du Clone3 a été sous-cloné dans ces vecteurs qui possèdent un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication permettant leur sélection dans *E. coli* et une protéine GST ou une séquence de six histidines (6xHis) en N-terminal suivie d'un site de clivage à la thrombine, pour pGex-4T-1 et pTrcHis B respectivement. Il y a trois variantes du vecteur pTrcHis, soit la forme A, B ou C; chacune possède une séquence dans le site de clonage multiple permettant un décalage dans le cadre de lecture à partir du site de restriction BamHI. Pour nous, pTrcHis B offre le bon cadre de lecture. La transcription du vecteur pGex-4T-1 est régulée sous l'action d'un promoteur *taq*, tandis que celle du vecteur pTrcHisB est régulée sous l'action d'un promoteur *trc*. **A)** Carte du vecteur pGex-4T-1; **B)** Carte du vecteur pTrcHis B.

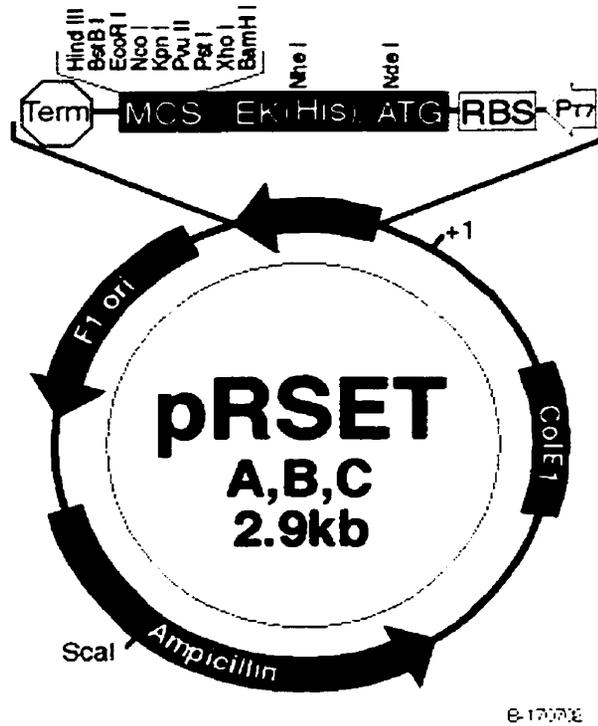
2.2 Description des vecteurs utilisés pour RoBP1

Le vecteur pRSET A (Invitrogen; Figure 6A) a été utilisé pour l'expression du clone 2.1 (RoBP1) qui y est ligué par les sites de restriction BamHI et XhoI (Pascal Bouffard, Thèse de doctorat) et maintenu dans la souche bactérienne *E. coli* BL21 (DE3) déficiente en protéases. Les ADNc des protéines A152 et A161 ont été fournis par le Dr Patrick McCaw (laboratoire du Dr Phillip A. Sharp, MIT, Cambridge, MA) et avaient été sous-clonés dans le vecteur pET-15b (Novagen; Figure 6B) et maintenus dans la souche bactérienne *E. coli* BL21 (DE3). Ces constructions permettent la surexpression de protéines de fusion avec 6xHis dans un système procaryote.

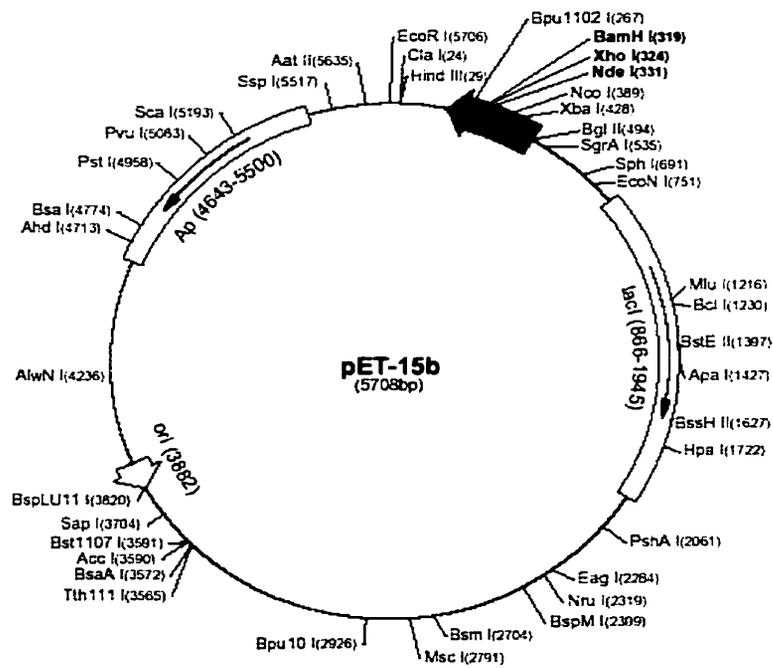
Figure 6. Vecteurs pRSET A et pET-15b utilisés pour la surexpression des protéines de fusion 6xHis-RoBP1, 6xHis-A152 et 6xHis-A161

Ces vecteurs possèdent un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de répllication permettant leur sélection dans *E. coli* et une séquence de six histidines (6xHis) en N-terminal suivie d'un site de clivage à la thrombine. La transcription est régulée sous l'action d'un promoteur T7. L'ADNc de RoBP1 (clone 2.1) avait été sous-cloné dans pRSET A tandis que les ADNc des protéines A152 et A161 avaient été sous-clonés dans pET-15b. **A)** Carte du vecteur pRSET A; **B)** Carte du vecteur pET-15b.

A)



B)



2.3 Culture bactérienne et préparation de l'ADN

Des souches de la bactérie *E.coli* sont rendues compétentes par la méthode du CaCl_2 (Ausubel *et al.*, 1995) et transformées par des produits de ligation ou des plasmides contenant déjà des fragments d'ADN insérés. Les bactéries sontensemencées sur des boîtes de Pétri de 100x15mm (Baxter, Pointe-Claire, QC) constituées de milieu autoclavé Luria-Bertani (LB; (Sambrook *et al.*, 1989)) contenant 1,5% d'agar et 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline, leur croissance est maintenue pendant 16h à 37°C. Les colonies obtenues sont repiquées, mises en culture liquide dans du milieu LB autoclavé contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline, pendant 16h à 37°C, sous agitation à 225 rpm. L'ADN est extrait et isolé par la méthode de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4 Sous-clonage du Clone3 (macro-histone mH2A)

Après digestion avec les enzymes de restriction EcoRI ou BamHI/EcoRI (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) du vecteur pTrcHis B (Invitrogen), du vecteur pGex-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) et du vecteur pUC19 contenant l'insert du Clone3 (Marc-André Laniel, Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke), les vecteurs pGex-4T-1 et pTrcHis B digérés ont été traités avec la phosphatase alcaline (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) selon les recommandations du fabricant. Tous les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (Southern, 1979) à 100 V pendant 45 min. dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA). Le gel est coloré au bromure d'éthidium (EtBr, 1 $\mu\text{g/ml}$) pour visualiser les bandes d'ADN sous

lumière ultraviolette à 300 nm. Les bandes d'ADN correspondant au Clone3, à pGex-4T1 et pTrcHis B linéaires ont été excisées et purifiées à l'aide de la trousse *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen Inc., Mississauga, ON) selon les recommandations du fabricant. L'ADN est élué ensuite dans 20 µl d'eau distillée puis nettoyé sur une colonne Microspin™ S-200 HR (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) selon les recommandations du fabricant. Le Clone3 a été ensuite inséré dans les vecteurs pGex-4T-1 et pTrcHis B à l'aide de la trousse *Rapid DNA Ligation Kit* (Boehringer-Mannheim, Laval, QC). L'insertion de l'ADN dans les vecteurs est vérifiée par digestion avec les enzymes de restriction et par séquençage partiel de l'extrémité 5' en utilisant l'amorce 5'-[GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG]-3' pour le vecteur pGex-4T-1 et l'amorce 5'-[GAGGTATATATTAATGTATCG]-3' pour le vecteur pTrcHis B (voir section 2.5).

Le vecteur pGex permet la production d'une protéine de fusion avec la GST (Gluthation S-transférase) pour une purification sur une colonne de glutathion insolubilisé. Quant au vecteur pTrcHis B, celui-là permet la production d'une protéine de fusion avec une séquence de polyhistidine pour une purification sur une colonne de nickel chélaté.

2.5 Séquençage du Clone3

Le Clone3 sous-cloné dans le vecteur pTrcHis B a été séquencé selon la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) à l'aide de la trousse de séquençage T7 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) en suivant les recommandations du fabricant. Les amorces utilisées en aval de l'extrémité 5' de l'insert sont 5'-[GAGGTATATATTAATG-

TATCG]-3', 5'-[GTGATCGCTGTCGTTACCCG]-3', 5'-[GCAGACAAGTGTGAAG-AACTTCTG]-3'; en amont de l'extrémité 3', les amorces sont 5'-[CACT-AGTCAGACACGGCTGG]-3' et 5'-[ATCTTCTCTCATCGGCCA]-3'.

La séquence d'ADN a été analysée à l'aide de la banque informatisée du National Center for Biotechnology Information (National Institute of Health, Bethesda, MD) en utilisant le logiciel BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.6 Préparation des protéines recombinantes

2.6.1 Expression et préparation des protéines recombinantes

Quelques μ l de bactéries sont incubées dans du milieu LB contenant 50 μ g/ml d'ampicilline pendant 16h à 37°C sous agitation à 225 rpm. Une culture secondaire est effectuée en diluant 1/50 pour laisser croître jusqu'à une $DO_{600nm} \sim 0.6$, selon les mêmes conditions de culture. Ensuite, l'expression des protéines recombinantes est induite en ajoutant 0.5mM-1mM IPTG (Promega, Madison, WI).

L'expression est induite pour un minimum de 2h. La culture est centrifugée pendant 5 min. (ou 20 min. pour les culture de 400 ml et plus) à 3000 rpm. Le culot peut ensuite être entreposé à -20°C. Pour des conditions natives, le culot est resuspendu dans du PBS (8 mM Na_2HPO_4 , 1 mM $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15 M NaCl, CLAP [0.5 mg/L pour chaque enzyme, soit chemostatine, leupeptine, antipaine, pepstatine], 1 mM PMSF, pH 7.4),. Pour des conditions dénaturantes, les manipulations se font à 25°C. Le culot bactérien est

resuspendu dans un tampon d'urée à 8 M (8 M urée, 0.1 M NaH₂PO₄•7H₂O, 0.01 M Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0), soit 5 ml de tampon par gramme de culot. Les cellules sont lysées pendant 60 min. sous agitation rotative et centrifugées à 10000 g pendant 30 min. à 25°C.

2.6.2 Nouvelle approche pour l'expression de protéines insolubles

Ce protocole nous a été suggéré par le Dr Patrick McCaw pour produire des protéines insolubles dans un système procaryote. On inocule et on choisit les colonies « jeunes », c'est-à-dire petites. On fait une culture primaire de courte durée ($DO_{600nm} < 0.5$) en milieu minimal pour un meilleur rendement et on aliquote les bactéries dans un volume de 1 ml contenant 3.5% DMSO. Les tubes sont congelés à -80°C. Au besoin, on fait dégeler un ou deux tubes pour faire une culture secondaire dans laquelle on effectue une induction avec 0.5-1 mM IPTG. Cette méthode permet d'obtenir les bactéries dans les mêmes conditions d'induction.

2.6.3 Purification des protéines recombinantes

Les protéines de fusion avec la GST sont purifiées à 25°C sur colonne de Glutathion Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) selon les recommandations du fabricant.

Les protéines de fusion avec une séquence de polyhistidine sont purifiées sur colonne de Ni-NTA Agarose (Qiagen Inc.) à 25°C selon les recommandations du fabricant, mais avec de légères modifications. On ajoute 1 ml de résine Ni-NTA par 10 ml de lysat et on mélange pour 60 min. sous agitation rotative. Après la liaison des protéines à la résine, le mélange est déposé dans une colonne de plastique (Bio-Rad, Mississauga, ON) et des lavages sont effectués à pH 6.3 avec le tampon 8 M urée jusqu'à une $DO_{280nm} < 0.01$. Enfin, l'éluion de la protéine de fusion est effectuée avec le tampon 8 M urée ajusté à pH 4.5.

2.6.4 Renaturation de protéines recombinantes insolubles

Ce protocole nous a été suggéré par le Dr Patrick McCaw pour renaturer des protéines insolubles. Les protéines sont préparées dans des conditions dénaturantes et liées sur une résine Ni-NTA (sections 2.6.1 à 2.6.3). La résine resuspendue est mise dans un sac de dialyse Spectra/Por® (Spectrum Laboratories Inc., Laguna Hills, CA) et placée dans 500ml d'une solution QR6 (6 M urée, 500 mM KCl, 20% glycérol, 20 mM HEPES [Sigma-Aldrich] pH 7.9, 10 mM ME). Une dialyse est réalisée à 4°C pendant 2 h. Ensuite, un volume de 100 ml du tampon QR6 est enlevé et remplacé par un volume équivalent de tampon QR0 (500 mM KCl, 20% glycérol, 20 mM HEPES pH 7.9, 10 mM ME) ne contenant pas d'urée. Par la suite, une autre dialyse est effectuée pendant 1-2 h à 4°C. Les étapes d'enlèvement de tampon de dialyse et d'ajout de tampon QR0 sont répétées pour que la concentration d'urée décroisse approximativement à 6 M, 5 M, 4 M, 3 M, 2 M, 1 M. La dialyse finale avec le tampon à 1 M urée (QR1) peut être effectuée

pendant plusieurs heures. Finalement, la protéine de fusion est éluée avec le tampon QR1 contenant 250 mM imidazole (Sigma-Aldrich) et dialysée contre un tampon PBS à 4°C pendant 4 h.

2.7 Analyse des protéines recombinantes

2.7.1 Séparation sur gel SDS

La séparation de protéines est effectuée en SDS-PAGE en conditions réductrices (Laemmli, 1970). La composition du gel concentrateur est de 4% acrylamide pH 6.8 tandis que celle du gel séparateur est de 12% acrylamide pH 8.8 (ratio acrylamide:bis-acrylamide de 37.5:1). Les protéines sont dénaturées dans le tampon d'application SDS 1X final (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 5% ME) et chauffées à 100°C pendant 3 min. dans un bain-marie. L'électrophorèse est effectuée à 200 V pendant 45 min., dans le tampon d'électrophorèse (1% SDS, 25 mM Tris, 0.25 M glycine). Le marqueur de masse moléculaire utilisé est le « *Prestained SDS-PAGE Low Range Standard* » (Bio-Rad).

Pour les expériences d'immunobuvardage, les protéines sont fractionnées par SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide 15% (ratio acrylamide:bis-acrylamide de 187:1) afin d'obtenir une meilleure séparation des protéines autour de 50 kDa, notamment Ro52 et La (Buyon *et al.*, 1990).

2.8 Coloration des gels de SDS-PAGE

La coloration des gels de protéines peut être effectuée au bleu de Coomassie (Towbin *et al.*, 1979). La coloration des gels est effectuée en les plaçant dans une solution de coloration (0,2% bleu de Coomassie R250 [Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON], 45% méthanol, 10% acide acétique glacial) pendant 1 h à 25°C sous légère agitation, suivie de la décoloration dans une solution décolorante (15% éthanol, 5% acide acétique glacial) pendant 4-16 h à 25°C sous légère agitation.

La coloration à l'argent est faite en fixant les protéines dans une solution 50% méthanol, 10% acide acétique glacial pendant 1h, sous agitation. Après 3 lavages de 10 min. dans une solution 10% éthanol et 1 lavage dans l'eau, les gels sont incubés pendant 7-8 min. dans une solution 0.0034 M $K_2Cr_2O_7$ / 0.0032 N HNO_3 gardée à l'obscurité. Ensuite, 4 lavages de 5 min. dans l'eau sont suivis d'une incubation de 30 min. dans une solution 0.012 M $AgNO_3$. Les gels sont par la suite lavés une fois rapidement dans l'eau distillée et 3-4 lavages de 2-3 min. avec une solution de développeur (0.24 M Na_2CO_3 , 0.05% formaldéhyde). Enfin, les gels sont rincés à l'eau distillée et la réaction est arrêtée avec une solution 1% d'acide acétique glacial.

2.9 Transfert sur membrane de nitrocellulose

L'électrotransfert (Towbin *et al.*, 1979) des protéines sur membranes de nitrocellulose Hybond™-C (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) est effectué à 110 V, 4°C, 1h, dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 0.2 M glycine, 20% méthanol). Le blocage de la

membrane est effectué dans une solution de TBS-5% gélatine de poisson pH 7.4 pendant 16 h à 4°C.

2.10 Production d'anticorps anti-RoBP1 chez le lapin

2.10.1 Immunisation de lapins avec la recombinante 6xHis-A161

Trois lapins blancs de race Nouvelle-Zélande âgés de 5 semaines ont été immunisés avec la protéine A161 recombinante exprimée à l'aide du vecteur pET-15b (Novagen, Madison, WI) et purifiée sur colonne de Ni-NTA Agarose (Qiagen Inc.) en conditions dénaturantes. On fait migrer 100 µg de l'antigène par SDS-PAGE puis la bande correspondante est découpée et broyée (Harlow et Lane, 1988). La bande est mélangée vigoureusement avec l'adjuvant de Freund à une proportion 1:1 antigène / adjuvant, soit un volume total de 500µl. Quatre immunisations sous-cutanées (entre le dos et le cou de l'animal) sont effectuées mensuellement dont la première avec l'adjuvant complet de Freund (Gibco BRL/Life Technologies, Burlington, ON) et les trois suivantes avec l'adjuvant incomplet de Freund (Gibco). Une aiguille de calibre 21G est utilisée pour injecter les suspensions.

2.10.2 Préparation de l'ADN pour l'immunisation de lapins

Le clone 2.1 (RoBP1) avait été amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et sous-cloné dans le vecteur eucaryote pcDNA3.1/V5/His-TOPO (Invitrogen Corp., San Diego,

CA) selon les recommandations du fabricant. Ces manipulations ont été effectuées par le Dr Pascal Bouffard (Thèse de doctorat) Des bactéries *E.coli* DH10B compétentes ont été transformées avec le plasmide contenant le clone 2.1. Une culture bactérienne a été obtenue et l'ADN plasmidique a été isolé à l'aide d'une trousse *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* employant des *QIAGEN-Tip 500* (Qiagen Inc.), selon les directives du fabricant.

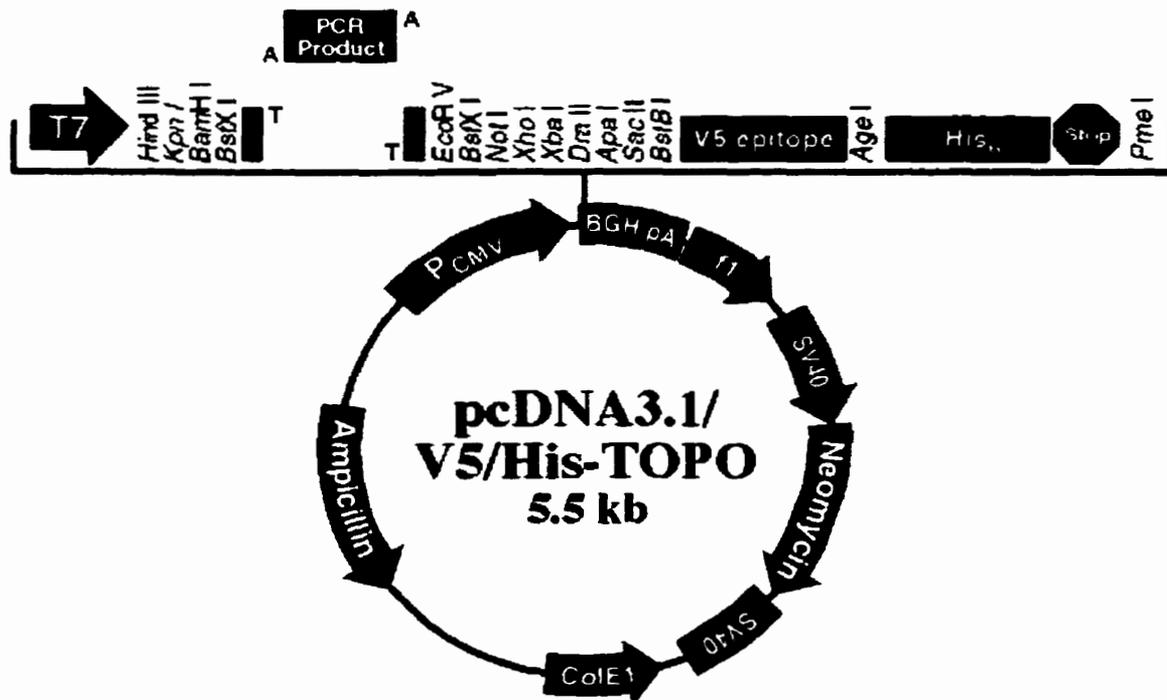


Figure 7. Vecteur pcDNA3.1/V5/His-TOPO utilisé pour l'immunisation de lapins

L'ADNc de RoBP1 a été inséré dans le vecteur eucaryote pcDNA3.1/V5/His-TOPO. Ce vecteur contient un promoteur CMV et un signal de polyadénylation. Il permet aussi la production de protéines de fusion portant à l'extrémité C-terminale un épitope V5 et une séquence de polyhistine permettant la purification de protéines recombinantes sur une colonne de nickel. Ce vecteur est optimisé pour sous-cloner directement des produits de PCR portant à leur extrémité 3' une extension adénosine ajoutée par la polymérase d'ADN Taq.

2.10.3 Immunisation de lapins avec l'ADN de RoBP1

L'immunisation avec l'ADN (La Cava *et al.*, 1997) est faite avec 400 µg d'ADN (préparé à la section 2.10.2) resuspendu dans de l'eau distillée et administré avec une aiguille de calibre 26G, à raison de quatre immunisations intramusculaires hebdomadaires.

2.11 Immunopurification d'IgG de lapin anti-6xHis-A161

2.11.1 Liaison chimique de protéines sur membrane

La protéine recombinante renaturée (section 2.6.4) est couplée chimiquement sur deux membranes *MAC Active Disc* (Amicon Inc., Oakville, ON) selon les recommandations du fabricant (méthode sèche), puis entreposée dans du tampon PBS à 4°C.

2.11.2 Isolement d'IgG spécifiques à 6xHis-A161

Les IgG totales de lapin immunisé avec 6xHis-A161 sont isolées à l'aide d'une membrane *MAC Capsule-Protein A* (Amicon Inc.) selon les recommandations du fabricant, puis entreposées dans du tampon PBS à 4°C. Les IgG spécifiques à 6xHis-A161 sont isolées en utilisant les membranes préparées à la section 2.11.1, selon les recommandations du fabricant.

2.12 Séparation cytoplasme/noyau par fractionnement à la digitonine

Des cellules HeLa sont maintenues en culture à 37°C en présence de 5% CO₂ dans un milieu RPMI 1640 supplémenté de 5% de sérum foetal bovin (FBS; décomplémenté à 55°C pendant 30 min.), 60 µg/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine. Les cellules sont lavées deux fois dans du tampon TBS froid puis resuspendues à une concentration de 2x10⁶ cellules/ml dans un tampon TKB froid (0.25 M sucrose, 0.05 M Tris-HCl, 0.025 M KCl, 0.005 M MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, pH 7.4) contenant 3 mM DTT, CLAP et 40 U/ml d'inhibiteurs de RNAses (RNAGuard; Amersham Biotech Pharmacia Inc.). Ensuite, la digitonine (25-40 µg/ml) est ajoutée aux cellules et ces dernières sont agitées délicatement à 4°C pendant 5 min. Les noyaux sont précipités à 1000 g pendant 5 min. La fraction cytoplasmique est obtenue par centrifugation du surnageant à 13000 g pendant 5 min. Les noyaux sont lavés une fois avec du TKB froid, brisés par sonication sur glace dans du tampon NET-2 et la fraction nucléaire soluble est récupérée par centrifugation à 13000 g pendant 5 min. Avec cette technique, moins de 1% de l'ADN cellulaire est retrouvé dans la fraction cytoplasmique.

2.13 Sérums utilisés

Les sérums de patients atteints de LED, de SjS et de PR proviennent de la banque de sérums de l'Unité des maladies rhumatismales, Université de Sherbrooke. Les sérums ont été choisis en fonction du diagnostic, indépendamment du sexe, et dilués à 1:200 dans le tampon d'immunobuvardage (TBS, 0.5% gélatine, 0.1% Tween 20™, pH 7.4).

2.14 Expériences d'immunobuvardage (*Western Blot*)

Les membranes de nitrocellulose portant les protéines recombinantes sont lavées 2 fois pendant 10 min. avant d'être placées dans un appareil « mini-blotteur » (Immunitics, Cambridge, MA). Chaque puits de l'appareil contient 40 µl des solutions de sérums dilués dans le tampon d'immunobuvardage (TBS, 0.5% gélatine, 0.1% Tween 20™, pH 7.4) pendant 1 h à 25°C sous légère agitation. Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 h à 25°C sous légère agitation, dans une solution de protéine A-péroxydase (Sigma) diluée 1/5000 dans le tampon d'immunobuvardage. Trois lavages de 10 min. à 25°C dans le tampon Tris-NaCl (10 mM Tris, 1 M NaCl, 0.1% Tween 20™, pH 7.4) sont suivis de deux lavages dans le tampon TBS. La révélation (Bradd et Dunn, 1993) est effectuée avec le réactif de chemiluminescence ECL (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) selon les recommandations du fabricant, et l'exposition est effectuée à l'obscurité sur un film X-Omat AR (Eastman-Kodak, Rochester, NY).

2.15 Expériences d'immunoprécipitation

2.15.1 Réticulation d'anticorps sur des billes de protéine A

La réticulation des anticorps est effectuée selon la méthode décrite par Harlow et Lane (Harlow et Lane, 1988). Pour chaque IPP, 12 µl de sérum sont liés sur 10 mg de billes de protéine A-Sépharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) dans du tampon d'IPP (10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, pH 7.4) pendant 16 h à 4°C, sous agitation rotative. Ensuite, les billes sont centrifugées pendant 1 min. à 13000 g et lavées

deux fois avec 10 volumes du tampon d'IPP et deux fois dans 10 volumes d'une solution 0.2 M borate de sodium (Fisher) pH 9.0. Les anticorps liés sont réticulés dans 10 volumes d'une solution 0.2 M borate de sodium pH 9.0, 20 mM diméthylpimélimidate (Sigma) pendant 30 min. à 25°C, sous agitation rotative. La réaction de réticulation est arrêtée par un lavage des billes dans 10 volumes d'une solution 0.2 M éthanolamine pH 8.0 pendant 2 h à 25°C sous agitation rotative. Finalement, les billes sont centrifugées pendant 2 min. à 13000 g et lavées deux fois dans 10 volumes de tampon NET-2 (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% NP-40). Les billes sont resuspendues à une concentration de 10 mg de billes/0.5 ml de tampon NET-2 contenant 0.02% NaN₃, puis entreposées à 4°C pour usage ultérieur.

2.15.2 Incubation avec un extrait protéique

Les extraits protéiques de cellules HeLa sont préparés par sonication (4 fois 15 sec.) sur glace dans du tampon NET-2/CLAP, suivie d'une centrifugation (13000 g, 20 min., 4°C) de laquelle on garde le surnageant. Chaque expérience d'IPP est effectuée dans 500 µl de NET-2 contenant un extrait de cellules HeLa équivalent à 2.5x10⁶ ou 5x10⁶ de cellules. L'incubation des billes avec les extraits cellulaires est faite pendant 1.5 h à 4°C. Par la suite, les billes sont centrifugées à 13000 g pendant 1 min. et lavées 6-8 fois dans 10 volumes de NET-2. Les antigènes sont séparés des anticorps/billes en ajoutant 25 µl de NET-2 et 25 µl de tampon d'application SDS 2X (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 5% ME). Les échantillons sont chauffés pendant 3 min. à 100°C dans un bain-

marie et les protéines immunoprécipitées présentes dans le surnageant sont récupérées pour l'analyse par immunobuvardage.

2.16 Immunofluorescence indirecte

2.16.1 Préparation des lames (fixation à l'éthanol)

Les premières expériences d'immunofluorescence ont été faites suivant la méthode de fixation à l'éthanol. Toutes les étapes (dilutions, lavages) sont faites dans du tampon PBS pH 7.4. Des cellules HeLa sont comptées (concentration finale 1.5×10^5 cellules/ml) et lavées 2 fois. Six gouttes sont placées sur une lame qui est centrifugée ensuite avec l'appareil Cytospin 2 (Shandon Inc., Pittsburg, PA) pendant 10 min. à 50 rpm. Les lames sont séchées à l'air libre pendant 10 min. La fixation des cellules est faite dans l'éthanol 100% pendant 10 min., puis les lames sont séchées à l'air libre. Les lames peuvent être entreposées dans l'éthanol 100% à -20°C pendant 6-8 semaines. Un cercle avec un crayon gras est appliqué autour des cellules pour délimiter le périmètre. On applique sur les cellules 25 μl d'anticorps primaire anti-RoBP1 de lapin ou anti-Ro60 humain dilué 1:50 pendant 30 min., dans une boîte humide et à l'obscurité. Ensuite, la lame est lavée pendant 10 min. Le périmètre des cellules est essuyé délicatement. L'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-lapin conjugué à la fluorescéine [Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA] ou IgG de chèvre anti-humain conjugué à la rhodamine [Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA]) est appliqué à une dilution 1:400 pendant 30 min, dans la boîte humide et à l'obscurité. Il faut éviter que les cellules sèchent une fois que l'incubation avec les anticorps est

enclenchée. Si la coloration nucléaire est nécessaire, les lames sont incubées pendant 5 min. dans du PBS contenant 0.01% EtBr, puis lavées dans le PBS. Les lames sont gardées à l'obscurité à 4°C pour analyse de la fluorescence. La lame est montée avec une lamelle en utilisant une petite goutte d'adhésif PBS/glycérol/octane (4 ml PBS, 16 ml glycérol, 500 mg 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane [DABCO; Fluka Chemical Corp., Ronkonkoma, NY]).

2.16.2 Préparation des lames (fixation à la paraformaldéhyde)

La fixation à l'éthanol est connue pour causer des agrégats protéiques. De plus, la cytocentrifugation n'est pas adéquate pour la microscopie confocale car elle cause une déformation des cellules. Enfin les signaux de fluorescence sont en général diffus avec l'éthanol. C'est pour cela que nous préférons la fixation à la paraformaldéhyde (PF), puisque cette dernière permet de réduire les effets énumérés plus haut.

Une solution PBS-PF (PBS, 4% PF [Sigma], pH 7.4) est préparée en chauffant dans un bain-marie à une température inférieure à 56°C. Après solubilisation, la solution est entreposée à l'obscurité à 4°C. Trois millions de cellules HeLa sont utilisées pour chaque expérience. La fixation des cellules est faite dans 1 ml de PBS-PF pendant 30 min. sous agitation rotative à 25°C. Les cellules sont centrifugées 30 sec. puis lavées une fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution de PBS-Triton (PBS, 0.1% Triton[®] X-100 [J.T. Baker, Phillipsburg, NJ]) pendant 30 min. sous agitation rotative à 25°C. Les incubations suivantes avec les anticorps primaires et secondaires à

dilution 1:200 sont faites à 25°C. Un lavage avec du PBS est effectué entre chaque incubation. La coloration nucléaire de l'ADN est effectuée en incubant les cellules avec 10µM de colorant Hoechst 33258 (H-33258, pentahydrate [bis-benzimide]; Boehringer-Mannheim) pendant 30 min. Enfin, une goutte d'échantillon est montée sur une lame avec du PBS-glycérol-octane et les lames sont gardées à l'obscurité à 4°C pour analyse subséquente de la fluorescence.

2.16.3 Microscopie à fluorescence et microscopie confocale

L'immunofluorescence indirecte est examinée sans contre-coloration avec un microscope à épifluorescence Axioscop 2 (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY) couplé à un microscope inversé avec un objectif de 100X (Nikon) à immersion d'huile et muni de filtres à bande passante pour l'excitation du FITC ou du TRITC. Les photomicrographies sont obtenues en utilisant une caméra numérique (Empix Imaging Inc., Niagara, NY) accentuées par le logiciel SPOT. Les cellules sont examinées avec un microscope confocal à balayage (NORAN Instruments Inc., Middleton, WI) muni d'un laser au krypton/argon et couplé à un microscope inversé avec un objectif 100X (Nikon) à immersion d'huile. Les échantillons sont excités à 488 nm et 586 nm et l'émission est mesurée à 525-550 nm et >590 nm pour le FITC et le TRITC respectivement. Les sections optiques sont captées à des intervalles de distance de 0.25 µm avec une ouverture de 10µm de l'objectif du laser. Les images numériques sont obtenues avec une moyenne effectuée sur 256 prises d'images et sont accentuées et traitées avec le logiciel INTERVISION (NORAN

Instruments Inc.) sur une station informatique Silicon Graphics O2 opérant avec le système d'exploitation UNIX.

3. RÉSULTATS (Partie I : Macrohistone mH2A)

3.1 Séquençage partiel de la macro-histone mH2A

Le Clone3 sous-cloné dans pGex-4T-1 a été séquençé presque complètement. Nous avons séquençé la grande partie du Clone3 (Figure 8). Il existe plusieurs codons « stop » dans ce que nous avons séquençé mais cela est probablement dû à des erreurs dans la lecture des bandes découlant de certaines régions de compression des nucléotides; cela crée des décalages dans le cadre de lecture, d'où la création des codons « stop » (Figure 9).

En comparant la séquence d'ADN du Clone3 (1497 pb) aux séquences humaines de mH2A1.1 (1114 bp) et mH2A1.2 (1920 nt), nous obtenons des homologies de 94.3% et 85.5% respectivement. L'homologie avec mH2A1.2 est un peu plus faible qu'avec mH2A1.1 étant donné que la taille du Clone3 est plus courte que celle de mH2A1.2. Nous ne comparons pas les séquences protéiques vu les multiples codons « stop » obtenus, ce qui faussait la séquence protéique.

Figure 8. Séquence de l'ADN du Clone3

Le Clone3 séquencé jusqu'à présent possède 1497 pb, soit la région en 5' (1077 pb) et la région en 3' (420 pb). Les séquences GAATTC et GGATCC représentent les sites de restriction EcoRI et BamHI respectivement. La partie histonique H2A s'étend entre l'extrémité 5' et le site BamHI. La partie non-histonique (macro) s'étend du site BamHI jusqu'à l'extrémité 3'. En surligné jaune sont les régions où des amorces ont été synthétisées pour le séquençage en 5' tandis que la région en surligné gris est celle où une amorce a été synthétisée pour le séquençage en 3'. Les symboles + indiquent la région manquante non-séquencée qui est d'environ 50-100pb.

gaattcgggcgggggtacatcaagaaaggccacccaagtacaggattggagtgggcgacccgtgtacatg
gccggccgtcctggaatacctgacacgggagattctggacgtgctgccaatgcagcgagagacaacaaga
agggacgggtcacaccccgccacatcctgctggctgtggccaatgatgaagagctgaatcagctgctaaaa
ggagtccacatagccagtggggtgtgttacccaacatccaccccgagttgctagcgaagagcggg**gatcc**
aaaggaaagtgggaagccatcatcacaccacccagccaaaaggccaagtctccatcccagaagaagcct
gtatctaaaaagcaggaggcaagaaaggggcccggaaatccaagaagcaggggtgagtcagtaaggcagcc
agctagctagctagcgacagcacaaccgagggccacacctgccgactcagcgttcacagtcctctccacca
agagcctctccttgcgcccagaagttgcaagttgtacaggctgacattgcctcgatcgacag**tgatcgct**
gtcgttcacccgacaacactgacttctacatcggctcgggtgaagtaggaaacacgctggagaagaaaggagg
caaggagtttggtggaagctgtcctggaactccggaaaaagaacggggcccttggaagtagctggagctgctg
tcagcgcaggccatggctcgtgccaaagtttgatccactgtaatagtcagtttgggg**gcagacaagtg**
tgaagaacttctggaaaagacagtgaaaaactgcttggccctggctgatgataagaagctgaaatccattg
catttccatccatcggcagcggcaggaacgggttttccaaagcagacagcagctcacgtgattctgaaggcc
atctccagttacttcgtgtctacatgtctctccatcaaaacgggtgacttcgctcgttttgacagcgagag
tataggcatctatgtcaggaatgcacgtggacgcaactaggctgacgatgacagacacagctgacctgt
accgctcagaagaaaatc+++++++ccttcattcagttcgtctactagaatac
gttgttcagttatgtttgactctatgtttatgtagcactgatagtgcgattactgtgtaagcactgtgtt
[REDACTED]taacctagagattttatagttttattttaatgaccctgattgaccgacacga
gtgggggagaacagcgacttttacctgtcaccgaaggcccaggaaggccccggttgtaagcggagagaagagg
tgctttattgtacatcctccagtggcggttcttttactetaatgttcttttggttccccgctcgtcag
aagaatcatgaatttgcaacagacctaattttgggttacttttgtcttattgatggatttgaaaatgaaa
gatttaagaaggcaaggcagaatctgttgtcccc**gaattc**

GRGYIKKGHPKYRIGVGDPTWPAVLEYLTREILDVRANAARDNKKGRVTPRHILLAVA
NDEELNQLLKGVTIASGGVLPNIHPELLAKSGDPKESWKPSSHHPQPKGQVSIPEEACI
*KSRRQERGPEIQEAG*VSKAAS*LASDSTTEGHTCRLSVHSPLHQEPLPCAQKLQVVQ
ADIASIDSDRCRSPDNTDFYIGR*SRKHAGEERWQVCGSCPGETPEKERALGSSWSCCQ
RRPWLVPST*STVIVQFGVQTSVKNEFKRQ*KTAWPWL MIRS*NPLHFHPSAAAGTVFQ
SRQQLT*F*RPSFVTSCLHVSSIKTVYFVVL TARV*ASMSRNARGRN*ADDDRHS*PCT
AQKKI

Figure 9. Séquence protéique du Clone3

Seulement la partie en 5' de l'ADN du Clone3 est traduite en acides aminés car la région manquante non-séquencée empêche la détermination du cadre de lecture pour l'extrémité 3' (voir Figure 8). Les astérisques indiquent les codons « stop » générés.

3.2 Expression et purification des protéines recombinantes du Clone3

Outre le séquençage, nous avons surexprimé le Clone3 comme protéine recombinante avec la GST et la séquence 6xHis afin de l'utiliser dans un criblage de sérums pour déterminer l'immunogénicité.

La surexpression dans la souche bactérienne *E. coli* K12 PR745 produit les protéines GST-Clone3 à environ 65 kDa et 6xHis-Clone3 à environ 40 kDa. Mais, ces deux protéines sont insolubles (Figure 10). Par contre, une délétion de la région H2A (~10 kDa) rend la protéine GST-Clone3m soluble (« m » pour la partie macro). Curieusement, la protéine 6xHis-Clone3m n'était pas exprimée (Figure 11). Il faut mentionner que cela était dans la souche bactérienne TOP10 (recommandée pour le vecteur pTrcHis). Une transformation dans la souche K12 PR745 aurait probablement généré une forme soluble, mais malheureusement nous ne l'avons pas essayé.

3.2.1 Criblage de sérums de patients avec 6xHis-Clone3

Une fois exprimées, nous avons purifié les deux recombinantes avec la GST-Clone3m dans des conditions natives et la 6xHis-Clone3 dans des conditions dénaturantes avec 8M d'urée (Figure 12). Nous avons utilisé la 6xHis-Clone3 pour le criblage de quelques sérums de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) et de lupus érythémateux disséminé (LED). L'avantage avec les recombinantes 6xHis est le moindre risque de

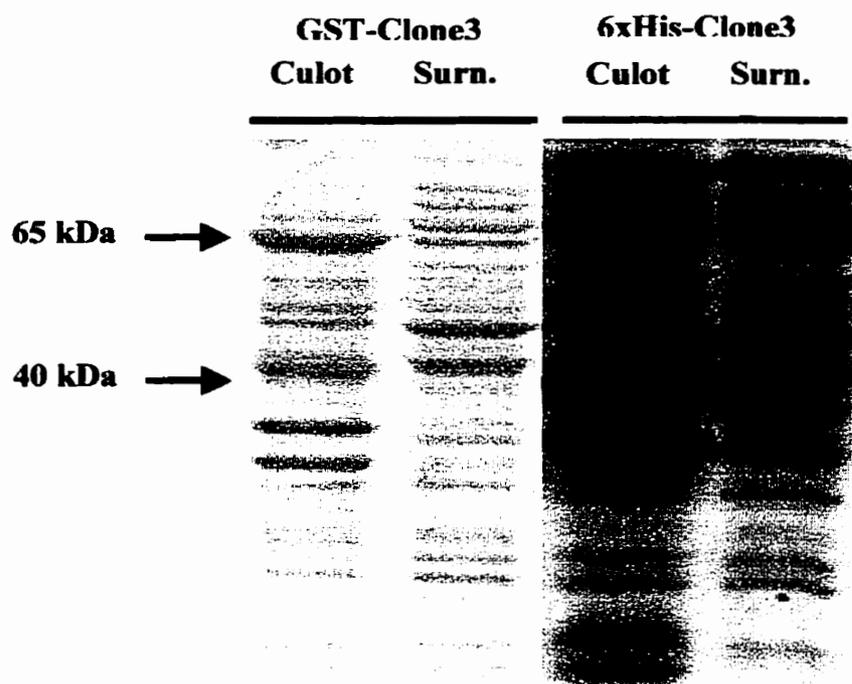


Figure 10. Détermination de la solubilité des protéines recombinantes du Clone3

Le Clone3 en fusion avec la GST (GST-Clone3) et la séquence 6xHis (6xHis-Clone3) est surexprimé dans *E.coli* K12 PR745. Les bactéries sont soniquées, puis le culot et le surnageant (surn.) sont fractionnés par SDS-PAGE. Nous observons la GST-Clone3 à environ 65 kDa et la 6xHis-Clone3 à environ 40 kDa.

N.B. Le contrôle des bactéries avant et après l'induction n'est pas présenté dans cette figure mais d'autres expériences montrent bel et bien une surexpression de protéines à 65 kDa et 40 kDa. De plus, la purification subséquente indique l'enrichissement (Figure 12) des protéines d'intérêt.

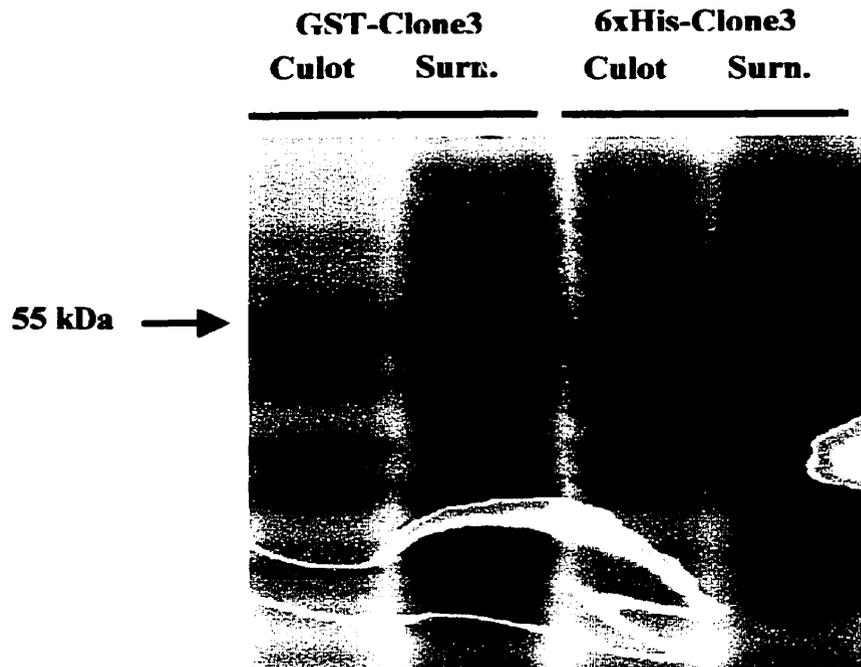


Figure 11. Détermination de la solubilité des protéines recombinantes du Clone3m

Le Clone3m tronqué en fusion avec la GST (GST-Clone3m) et la séquence 6xHis (6xHis-Clone3m) est surexprimé dans *E.coli* K12 PR745 et TOP10. Les bactéries sont soniquées, puis le culot et le surnageant (surn.) sont fractionnés sur un SDS-PAGE. Nous observons la GST-Clone3m à environ 55 kDa tandis que la 6xHis-Clone3m (exprimée dans TOP10) n'était pas présent.

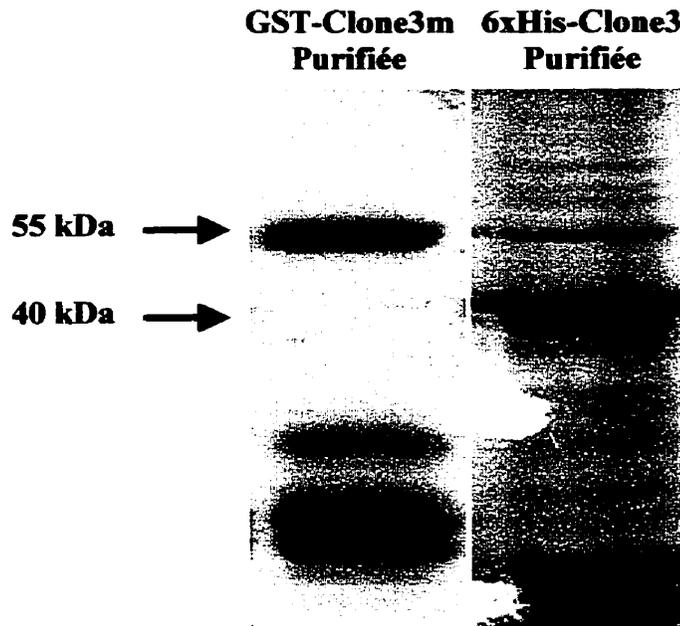


Figure 12. Purification des protéines GST-Clone3m et 6xHis-Clone3

Les protéine de fusion GST-Clone3m et 6xHis-Clone3 sont surexprimées et purifiées sur une colonne de Glutathion Sépharose 4B et de Ni-NTA agarose respectivement, selon les recommandations du fabricant. La fraction éluée ayant la DO_{280nm} la plus élevée est séparée par SDS-PAGE et les gels sont colorés au bleu de Coomassie. La recombinante GST-Clone3m est observée à 55 kDa tandis que la recombinante 6xHis-Clone3 est observée à 40 kDa. Les autres bandes au bas du gel correspondent probablement à des protéines inconnues ou de dégradation.

réactivité croisée en comparaison avec les recombinantes GST, sans oublier le coût et l'étape supplémentaire pour un clivage à la thrombine. De toute manière, le criblage des sérums est fait en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et l'usage d'une protéine native en fusion avec la GST est inutile.

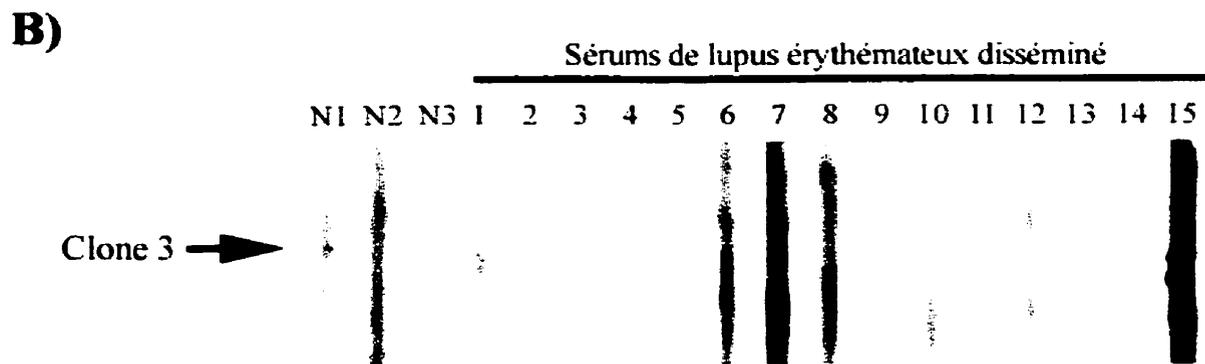
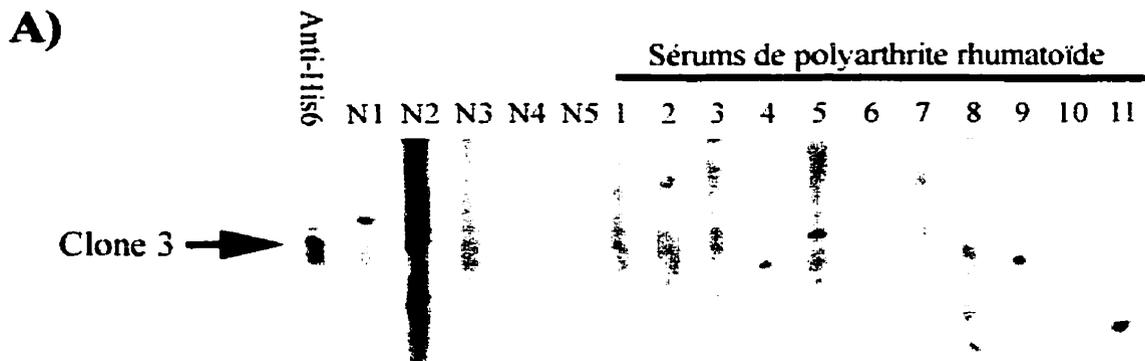
Nous avons testé par immunobuvardage 11 sérums PR et 15 sérums LED (Figure 13). Le résultat de ce criblage est négatif : il n'y a qu'un seul sérum PR qui reconnaît la protéine. Nous avons délété la région histonique H2A du Clone3 en fonction de ce criblage. Nous espérons avoir une plus grande réactivité avec le clone complet avant de caractériser l'immunogénicité de la région non-histonique. Une immunogénicité de la région non-histone aurait été une nouveauté car les histones sont déjà connues pour être une cible d'autoanticorps (Bustos *et al.*, 1994); ce n'était pas le cas, ce qui nous a incité à arrêter nos études sur le Clone3 et entreprendre la caractérisation de RoBP1.

Figure 13. Immunobuvardage de 6xHis-Clone3 avec des sérums de patients

La protéine de fusion purifiée 6xHis-Clone3 est séparée par SDS-PAGE et transférée sur une membrane de nitrocellulose. Plusieurs sérums de patients atteints de maladies autoimmunes sont testés contre la protéine recombinante. Des contrôles négatifs (sérums humains normaux) et positifs (IgG polyclonales anti-His₆ de lapin; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ont été employés. **A)** sérums PR; **B)** sérums LED. Les pistes numérotées représentent des sérums différents. Les résultats sont tabulés selon le nombre de patients positifs relativement au nombre des sérums testés pour chaque catégorie.

Contrôles négatifs : Sérums normaux (N1 à N5)

Contrôle positif : Sérum de lapin anti-His₆



Sérums Positifs :

A) Sérums PR (1/11)

B) Sérums LED (0/15)

4. RÉSULTATS (Partie II : RoBP1)

4.1 Expression des protéines recombinantes

Le premier but est d'exprimer le clone 2.1 correspondant à RoBP1. Ce clone n'est pas surexprimé par les méthodes conventionnelles de surexpression de protéines dans un système procaryote. Les bactéries semblent être rapidement sélectionnées pour des changements génétiques et épigénétiques qui réduisent le rendement. Cependant, l'application d'un protocole suggéré par le Dr McCaw nous a permis d'exprimer la protéine chez la bactérie. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de cellules fraîchement transformées dont la culture est rapidement congelée après la première croissance. Ainsi, on obtient des cellules qui n'ont pas eu le temps de sélectionner pour des répresseurs d'expression.

Par cette approche, nous avons réussi à obtenir la protéine RoBP1. Sur un gel SDS-PAGE, la protéine recombinante migre comme une protéine d'environ 130 kDa, ce qui est le double de ce qui est prévu, soit environ 65 kDa. Cela est dû à un domaine de dimérisation en C-terminal de la protéine RoBP1, tel qu'il nous a été communiqué par le Dr McCaw (résultats non publiés). En prélevant un échantillon de culture bactérienne avant et après l'induction à l'IPTG, nous observons que le clone 2.1 n'est pas exprimé en très grande quantité; en effet, nous obtenons une expression très faible (Figure 14A) et difficilement purifiable. En même temps, nous avons obtenu généreusement des Drs Patrick McCaw et Phillip Sharp (MIT) deux clones de la protéine PUF60, dont un exprime la protéine complète (A152) et l'autre exprime une forme tronquée en C-

terminal (A161) obtenue par délétion moléculaire de l'ADN. De plus, les Drs McCaw et Sharp nous ont fourni des anticorps de poulet anti-PUF60 induits par immunisation avec des peptides encodant des RRM de PUF60 afin de détecter ces recombinantes en immunobuvardage. Les ADNc de A152 et de A161 sont insérés dans le vecteur pET-15b permettant l'expression de protéines en fusion avec une queue d'histidines et sont maintenus dans *E. coli* BL21 (DE3). La région absente dans A161 est un domaine de dimérisation qui résiste à la dénaturation, même dans les conditions très dénaturantes du SDS-PAGE. Soulignons que ce phénomène est décrit dans la littérature (Klatt *et al.*, 1995; Miettinen *et al.*, 1994). Une représentation de l'homologie entre les trois protéines (RoBP1, A152 et A161) est illustrée à la Figure 3. Nous avons opté pour l'utilisation de la protéine A161 étant donné l'homologie très élevée avec notre clone 2.1 et vu qu'elle permet l'obtention d'un monomère facilement purifiable et en très grande quantité (Figure 14C). Notons également que même le dimère A152 est exprimé faiblement à un niveau comparable au clone 2.1 (Figure 14B).

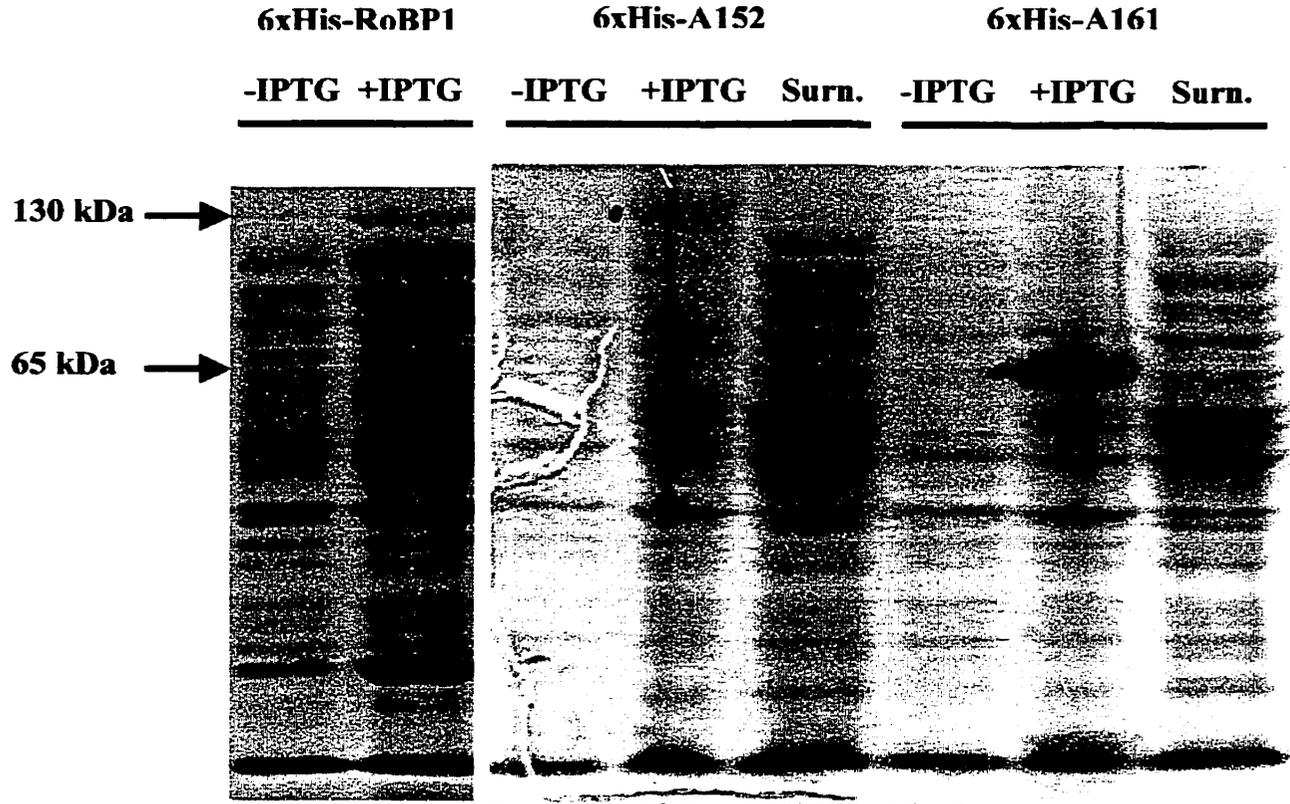


Figure 14. Expression des protéines recombinantes 6xHis-RoBP1, 6xHis-A152 et 6xHis-A161

Les protéines recombinantes RoBP1, A152 et A161 en fusion avec une séquence 6xHis sont surexprimées dans des souches de *E. coli* BL21 (DE3). Des échantillons prélevés avant et après l'induction ainsi que du surnageant après sonication sont séparés sur un gel SDS-PAGE et les gels colorés au bleu de Coomassie. A) Clone 2.1 (RoBP1); B) A152; C) A161.

4.1.1 Purification des protéines recombinantes

La surexpression des protéines recombinantes RoBP1, A152 et A161 donnent des produits insolubles qui se retrouvent dans le culot bactérien après centrifugation (Figure 14), probablement par formation de corps d'inclusion. De plus, le profil d'hydropathie (Figure 15) indique une tendance légèrement hydrophile de la protéine, ce qui pourrait expliquer en partie cette insolubilité. Une approche dénaturante pour la purification s'avère donc nécessaire, soit l'emploi d'un protocole impliquant l'usage de tampons dénaturants contenant 8 M urée ou 6 M guanidine (section 2.6.3). La lyse de cellules dans un tampon contenant 8 M urée permet une solubilisation de la plupart des protéines et des corps d'inclusion tout en facilitant leur analyse par SDS-PAGE. L'urée est préférée à la guanidine car cette dernière, bien qu'elle soit un agent plus efficace pour dénaturer, forme un précipité lors d'un traitement au SDS, ce qui nécessite des étapes supplémentaires, soit une dilution dans l'eau et une dialyse, ou une séparation des protéines par précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA). Ainsi, en suivant les recommandations du fabricant, nous arrivons à purifier facilement A161 et RoBP1 (Figure 16A et Figure 16B) dans les conditions dénaturantes utilisant 8 M urée. La coloration à l'argent d'un gel d'acrylamide est une technique très sensible pour détecter de très petites quantités protéiques; ainsi, en effectuant cette coloration sur un gel SDS-PAGE de 6xHis-A161 purifiée, nous observons la présence d'impuretés persistantes malgré les conditions strictes de lavage (Figure 17). Quoique l'obtention d'une protéine pure à 100% soit ardue, nous obtenons un produit purifié acceptable pour un criblage de sérums de patients ou une immunisation de lapins.

Mean Hydropathy = -0.161
Scale: Kyte and Doolittle (1982)
W = 11 Hydropathy threshold for helices = 1.6

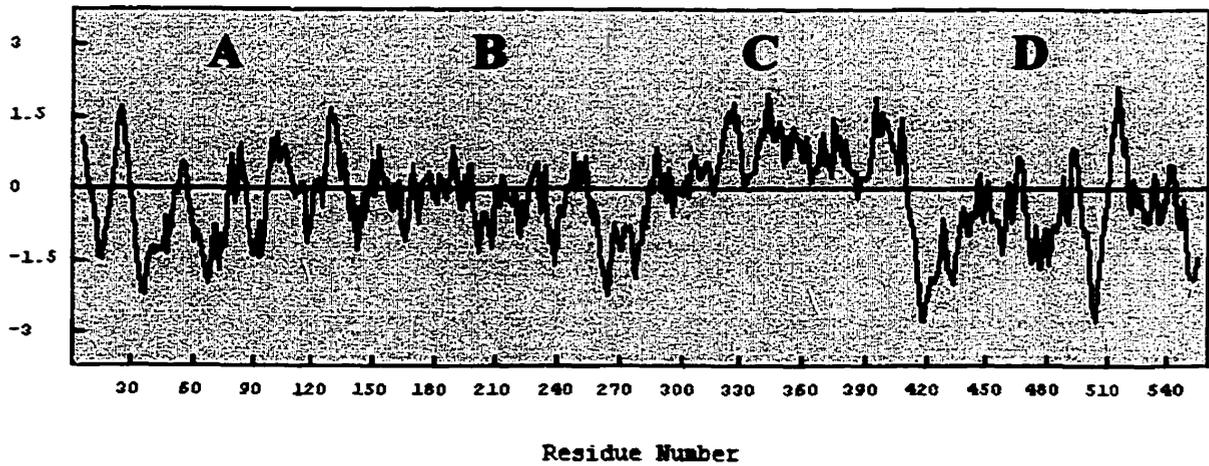


Figure 15. Profil d'hydropathie de RoBP1

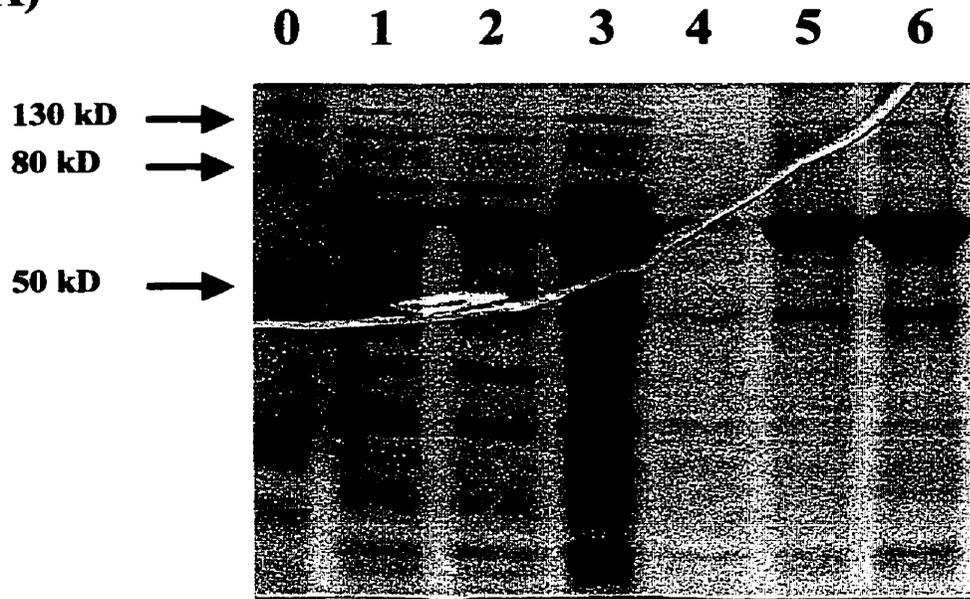
Le profil et l'indice d'hydropathie de RoBP1 sont générés à l'aide du logiciel WinPep v1.22 (Lars Hennig, 1999) selon l'algorithme de Kyte et Doolittle (Kyte et Doolittle, 1982). L'indice d'hydropathie est en ordonnée du graphique. Les valeurs positives et négatives indiquent les régions hydrophobes et hydrophiles respectivement. Les sections A et D sont légèrement hydrophiles, la section B relativement neutre, tandis que la section C est hydrophobe. L'hydropathie moyenne de RoBP1 est de -0.161.

Figure 16. Comparaison de l'efficacité de la purification des protéines recombinantes 6xHis-RoBP1 et 6xHis-A161

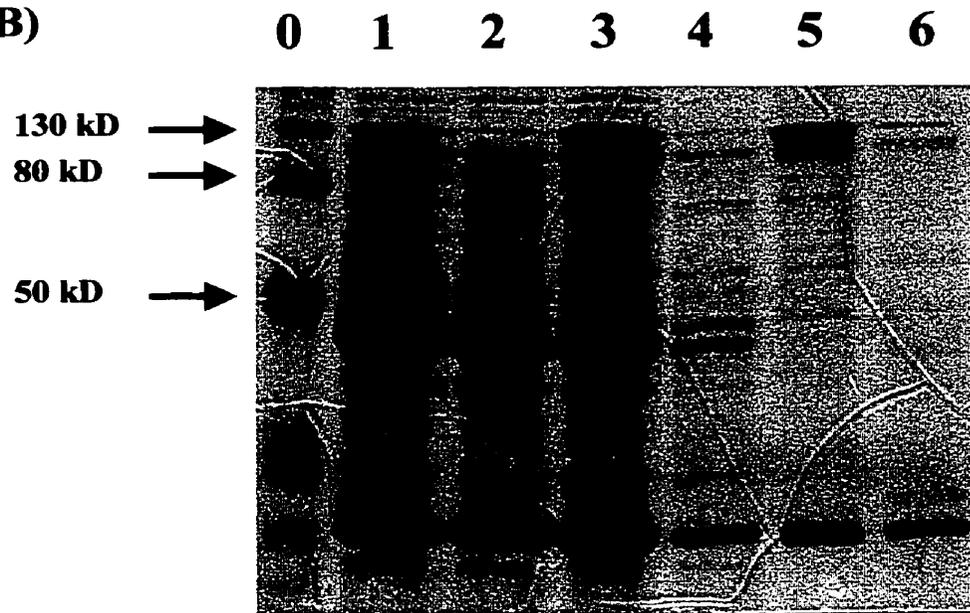
Les protéines 6xHis-RoBP1 et 6xHis-A161 sont exprimées dans *E. coli* puis purifiées sur une colonne de nickel. Des échantillons de quelques étapes de la purification sont prélevés et analysés par gel SDS-PAGE. **A)** Purification de 6xHis-A161; **B)** Purification de 6xHis-RoBP1.

- Piste 0:** Échelle de masse moléculaire
- Piste 1:** Surnageant après lyse dans le tampon 8 M urée, i.e. échantillon chargé sur la colonne de nickel;
- Piste 2:** Fraction non retenue sur la résine
- Piste 3:** Résine chargée après le passage de la fraction non-retenue
- Piste 4:** Fraction du lavage
- Piste 5:** Résine finale après élution
- Piste 6:** Fraction éluee ayant la DO_{280nm} la plus élevée

A)



B)



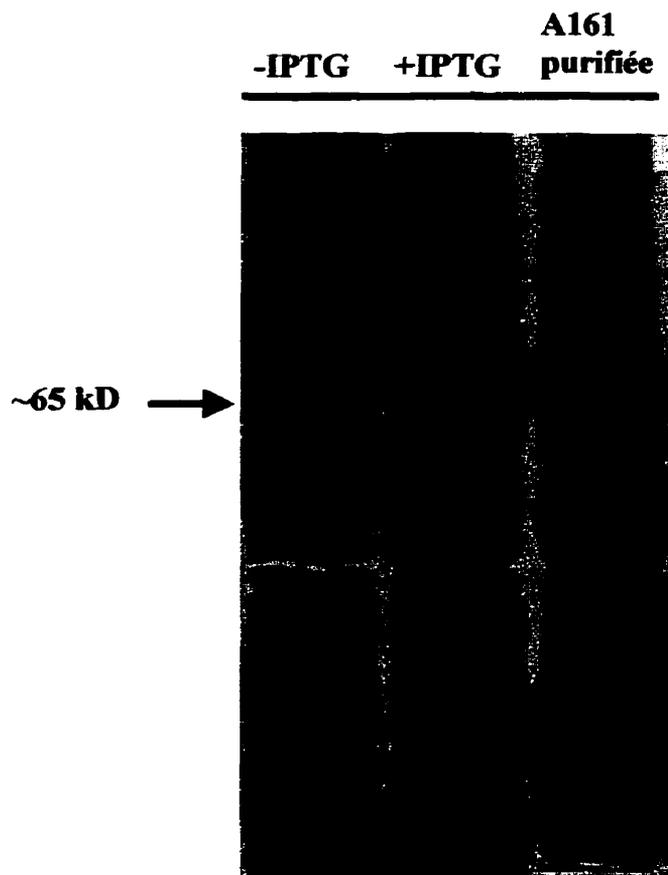


Figure 17. Gel coloré à l'argent de l'expression/purification de 6xHis-A161

La protéine de fusion 6xHis-A161 est surexprimée et purifiée sur une colonne de Ni-NTA agarose selon les recommandations du fabricant. La protéine est chargée sur la résine de Ni-NTA à pH 8.0 dans un tampon contenant 8 M urée. Des lavages sont faits à pH 6.3 et l'élution est faite à pH 4.5. Des échantillons avant, après l'induction à l'IPTG et après l'élution (fraction éluee ayant la DO_{280nm} la plus élevée) sont séparés sur gel SDS-PAGE et le gel est coloré à l'argent.

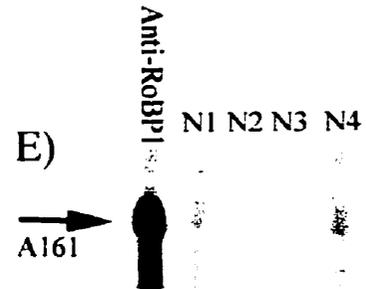
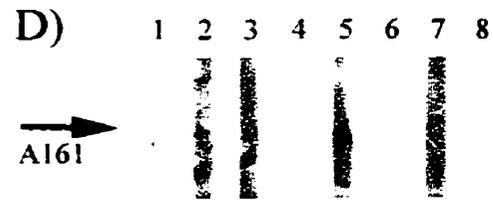
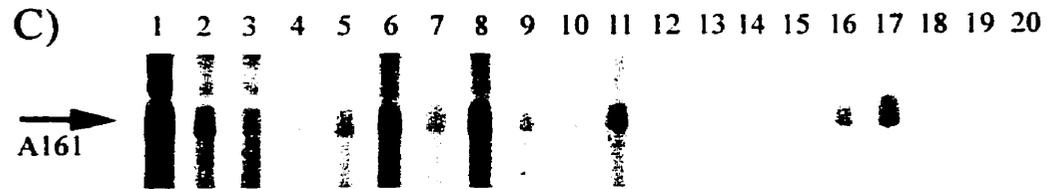
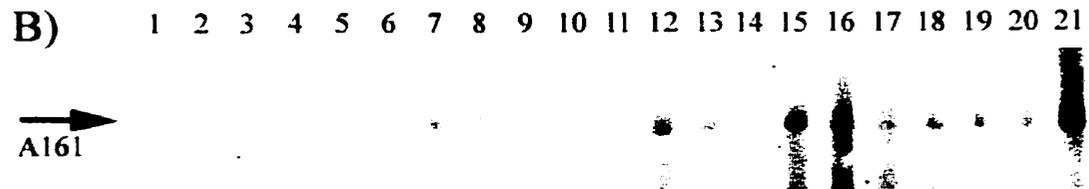
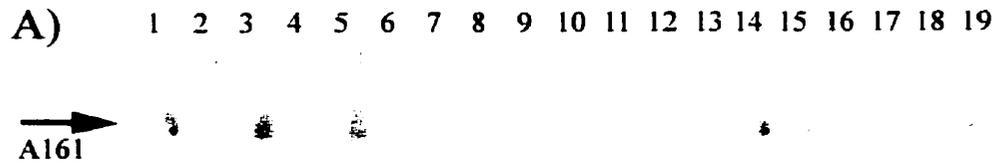
4.2 Criblage de sérums de patients

La recombinante 6xHis-A161 étant purifiée, nous avons procédé à un criblage de sérums de patients atteints de diverses maladies du tissu conjonctif dans le but d'identifier des sérums aptes à reconnaître sous conditions dénaturantes d'immunobuvardage. Étant donné que plusieurs patients atteints de SjS primaire et de LED produisent des IgG spécifiques contre les antigènes Ro et La (McCluskey *et al.*, 1998), nous avons voulu vérifier l'hypothèse de la propagation de déterminants antigéniques, laquelle pourrait s'appliquer à RoBP1. Nous avons donc testé plusieurs sérums de patients atteints de SjS, LED sans anti-Ro (anti-Ro-), LED produisant des anti-Ro (anti-Ro+) et polyarthrite rhumatoïde (PR). Nous obtenons plusieurs sérums qui reconnaissent 6xHis-A161, soit 8/20 sérums LED anti-Ro-, 13/21 sérums LED/anti-Ro+, 7/20 sérums SjS et 0/8 sérums PR (Figure 18). Le sommaire des résultats est illustré à la Figure 20. Soulignons que nous obtenons les signaux les plus forts avec les sérums lupiques qui sont anti-Ro (Figure 18B) et avec quelques sérums de patients atteints de SjS (Figure 18C), ce qui est explicable si l'on tient compte de la théorie de la propagation d'épitopes et du fait que ces sérums produisent des anti-Ro.

Ensuite, les sérums ont été testés en immunobuvardage avec un extrait protéique de cellules HeLa pour confirmer les résultats avec la recombinante chez les cellules humaines. Les résultats obtenus sont plus ou moins négatifs; nous n'obtenons pas de signaux significatifs comparés aux signaux anti-La ou anti-Ro60 (Figure 19).

Figure 18. Immunobuvardage de 6xHis-A161 avec différents sérums

La protéine de fusion 6xHis-A161 est séparée par SDS-PAGE et transférée sur une membrane de nitrocellulose. Plusieurs sérums de patients atteints de maladies autoimmunes sont testés contre la protéine recombinante. **A)** sérums LED; **B)** sérums LED/anti-Ro; **C)** sérums SjS; **D)** sérums PR (polyarthrite rhumatoïde); **E)** contrôles positif (lapin anti-RoBP1 produit par immunisation de lapins, voir section 2.10) et négatifs (sérums humains normaux; N1-N4). Les pistes numérotées représentent des sérums différents. Les résultats sont compilés selon le nombre de patients positifs relativement au nombre des sérums testés pour chaque catégorie.



Sérums Positifs :

A) Sérums LED/anti-Ro- (9/20)

B) Sérums LED/anti-Ro+ (13/21)

C) Sérums SjS (9/20)

D) Sérums PR (0/8)

Figure 19. Immunobuvardage d'un extrait de cellules HeLa avec différents sérums LED, LED/anti-Ro60 et SjS

Un extrait de cellules HeLa est séparé par SDS-PAGE et transféré sur une membrane de nitrocellulose. Des sérums de patients LED, LED anti-Ro60 et SjS sont testés; les numéros des sérums correspondent à ceux de la Figure 18. **A)** sérums LED et sérums LED/anti-Ro; **B)** sérums SjS. Les pistes numérotées représentent des sérums différents. Les catégories de sérums sont compilées selon le nombre de patients positifs relativement au nombre de sérums testés.

Contrôles négatifs : Sérums normaux (N1, N2)

Contrôles positifs : Sérums humains anti-La, anti-Ro60 et anti-U1

Sérum de poulet anti-PUF60 couplé à des IgG de lapin anti-poulet

Sérum de lapin anti-RoBP1

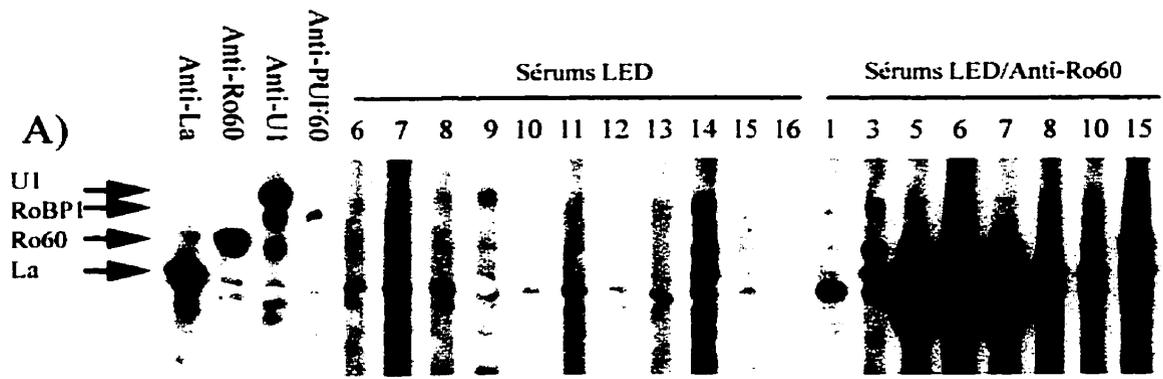


Figure 20. Compilation du criblage des sérums avec la protéine recombinante 6xHis-A161

Les résultats du criblage avec la recombinante 6xHis-A161 sont compilés. La colonne α Ro (anti-Ro) représente le diagnostic clinique des patients produisant des anticorps anti-Ro. La colonne α A161 représente les résultats des signaux relatifs de l'immunobuvardage avec la recombinante (Figure 18), soit (+) pour un signal faible et (++) pour un signal fort.

No.	LED anti-Ro-		LED anti-Ro+		SjS		PR	
	α Ro	α A161	α Ro	α A161	α Ro	α A161	α Ro	α A161
1	-	-	+	-	-	++	-	-
2	-	-	+	-	-	+	-	-
3	-	+	+	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-	-	-
5	-	+	+	-	-	+	-	-
6	-	+	+	-	-	++	-	-
7	-	+	+	+	+	+	-	-
8	-	+	+	+	+	++	-	-
9	-	-	+	-	-	-		
10	-	-	+	-	-	-		
11	-	-	+	+	+	++		
12	-	-	+	++	-	-		
13	-	-	+	+	-	-		
14	-	+	+	+	+	-		
15	-	+	+	++	-	-		
16	-	-	+	++	+	+		
17	-	+	+	+	+	++		
18	-	-	+	+	-	-		
19	-	-	+	+	-	-		
20	-	-	+	+	-	-		
21	-	-	+	++	-	-		

Suite à ce criblage par immunobuvardage, nous avons testé trois des sérums LED et un sérum LED/anti-Ro en immunoprécipitation afin d'évaluer leur aptitude à reconnaître la protéine en conditions natives dans un extrait de cellules HeLa. Donc, les sérums ont été testés par des expériences d'IPP avec des extraits protéiques de cellules HeLa suivies d'immunobuvardage. Les résultats obtenus sont négatifs (Figure 21) et indiquent que les sérums utilisés ne reconnaissent pas la protéine native, mais plutôt des épitopes linéaires, si l'on se fie à leur réactivité contre la recombinante en immunobuvardage.

En somme, ces études nous ont permis de détecter avec la protéine recombinante plusieurs patients produisant des anti-RoBP1, mais ce n'est pas le cas avec un extrait de cellules HeLa. Cela est peut-être dû à une quantité faible d'anticorps anti-RoBP1 présents dans les sérums, ou même une faible quantité de RoBP1 dans l'extrait protéique de cellule HeLa. Outre cela, la plupart des sérums de patients atteints de maladies du tissu conjonctif ont des anticorps très divers, notamment anti-La et/ou anti-Ro60. La détection de RoBP1 native (dilution 1:200) chez les cellules HeLa est difficile étant donné que les signaux générés par les anti-La ou les anti-Ro (dilution 1:1000 ou plus) sont souvent très forts et qu'une exposition prolongée sur film - pour détecter RoBP1 - occasionne un bruit de fond qui masque tous les signaux, incluant anti-Ro/La. Par contre, une dilution des sérums réduit le bruit de fond mais cela a pour effet de réduire le signal anti-RoBP1 qui est déjà plus faible comparé au signal anti-Ro/La. Il est donc difficile d'établir un équilibre entre ces facteurs. Ainsi, le criblage des sérums nous a permis d'identifier plusieurs sérums de patients reconnaissant RoBP1 recombinante, mais aucun ne semble reconnaître RoBP1 native, ce qui définirait un potentiel autoantigénique de RoBP1.

Figure 21. Immunoprécipitation de RoBP1 native d'un extrait de cellules HeLa par des sérums LED et LED anti-Ro60

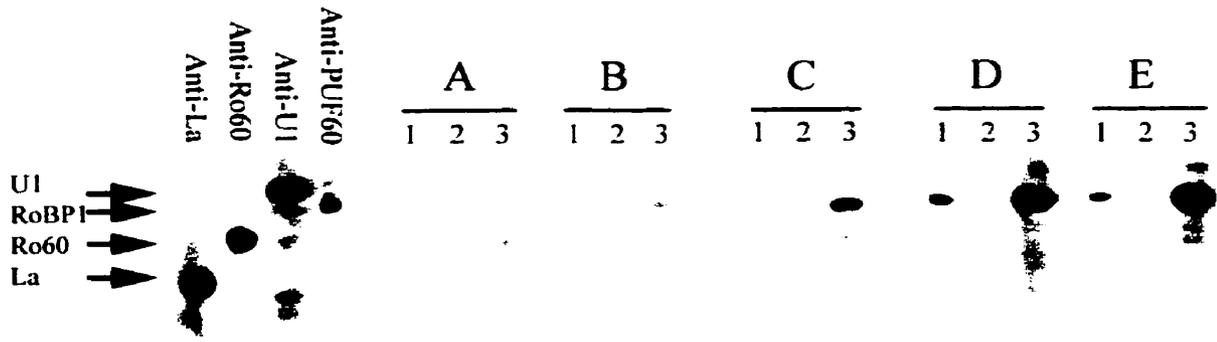
Des sérums de patients reconnaissant 6xHis-A161 recombinante sont réticulés sur des billes de sépharose/protéine A puis incubés avec un extrait de cellules HeLa. Les protéines immunoprécipitées sont séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et blottées avec un sérum normal, un sérum humain anti-Ro60 et le même sérum utilisé pour l'IPP. Les numéros des sérums correspondent à ceux de la Figure 18. **A)** IPP sérum normal; **B)** IPP sérum LED anti-Ro #6; **C)** IPP sérum LED anti-Ro #7; **D)** IPP sérum LED anti-Ro #15; **E)** IPP sérum LED anti-Ro #19;

Piste 1: Sérum humain normal

Piste 2: Sérum poulet anti-PUF60 couplé à IgG de lapin anti-poulet

Piste 3: Sérum humain anti-Ro60

N.B. Le sérum humain normal semble reconnaître la protéine Ro60 dans les expériences D et F. La reconnaissance par ce sérum est artéfactuelle car il s'est avéré reconnaître parfois d'autres protéines (La, Ro60, RoBP1) dans d'autres expériences. Donc, son emploi fut inadéquat. Aussi, le sérum humain anti-Ro60 semble reconnaître son antigène à la même hauteur que RoBP1, mais cela est causé par la séparation des protéines par SDS-PAGE.



4.3 Anticorps anti-RoBP1 de lapin

Vu l'échec d'identifier des sérums humains capables d'immunoprécipiter RoBP1 native, nous avons tenté de générer les anticorps chez le lapin en immunisant trois lapins avec la recombinante 6xHis-A161 purifiée et préparée tel que décrit à la section 2.10.1. Les lapins ont été immunisés par la suite avec un plasmide eucaryote pcDNA3.1/V5/His-TOPO (Figure 7) contenant l'ADNc de RoBP1 afin d'induire une expression de RoBP1 native directement chez le lapin, étant donné que les sérums prélevés après l'immunisation avec la protéine recombinante n'immunoprécipitaient pas. La qualité des sérums anti-RoBP1 des lapins a été évaluée par immunobuvardage avec la recombinante ayant servi à l'immunisation (6xHis-A161) et avec un extrait de cellules HeLa. Les analyses d'immunobuvardage montrent que tous les lapins ont produit une population d'anticorps reconnaissant fortement la recombinante 6xHis-A161 purifiée (Figure 22A) ainsi que la protéine RoBP1 dans un extrait de cellules HeLa (Figure 22B). Toutefois, le lapin C produisait le signal avec le titre le plus élevé (Pistes 4 de Figure 22A et B) et c'est son sérum qui fut utilisé pour les expériences ultérieures d'immunobuvardage, d'IPP et d'immunofluorescence. Nous avons aussi comparé nos sérums de lapin avec le sérum anti-PUF60 de poulet (Figure 22) et nous avons obtenu une reconnaissance des mêmes antigènes, cependant il faut mentionner que le sérum de poulet présente un bruit de fond élevé, sans oublier que l'IPP avec ce sérum est très laborieuse et requiert des anticorps secondaires (e.g. chèvre anti-poulet) car la protéine A ne reconnaît pas les IgG de poulet. De plus, les expériences d'IPP du Dr. McCaw avec ce sérum de poulet avaient échoué.

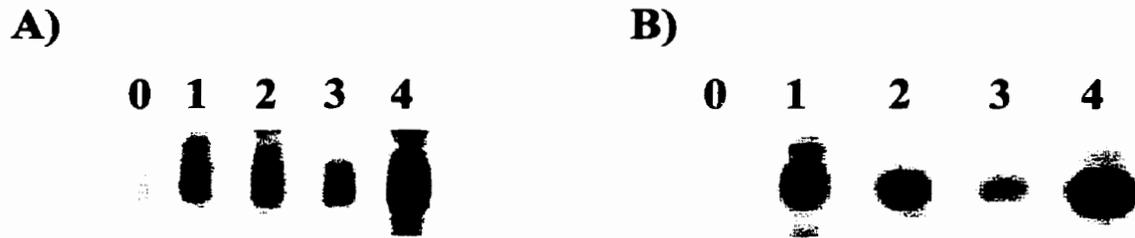


Figure 22. Immunobuvardage des sérums de lapins anti-RoBP1 avec 6xHis-A161 et avec un extrait de cellules HeLa

La protéine de fusion 6xHis-A161 et un extrait protéique de cellules HeLa sont fractionnés par SDS-PAGE et analysés par immunoblot. Les sérums utilisés proviennent des lapins immunisés avec 6xHis-A161, d'un lapin préimmun, et du sérum anti-PUF60 de poulet. **A)** Immunoblot de 6xHis-A161: **B)** Immunoblot d'un extrait de cellules HeLa.

- Piste 0:** Lapin préimmun
- Piste 1:** Sérum anti-PUF60 de poulet couplé à IgG de lapin anti-poulet
- Piste 2:** Lapin A immunisé avec 6xHis-A161
- Piste 3:** Lapin B immunisé avec 6xHis-A161
- Piste 4:** Lapin C immunisé avec 6xHis-A161

4.3.1 Immunopurification des IgG de lapin anti-RoBP1

Suite à l'obtention des anticorps de lapin anti-RoBP1, nous avons essayé d'immunopurifier les IgG spécifiques à RoBP1. Pour ce faire, nous avons effectué en premier lieu une purification des IgG totales de lapin sur une membrane de protéine A. Ensuite, il fallait enlever l'urée restante dans la solution de protéines, après la purification en conditions dénaturantes, et renaturer la protéine afin d'obtenir un repliement natif. Ainsi, la protéine recombinante 6xHis-A161 a été renaturée par dialyse contre un gradient décroissant d'urée et ensuite contre du tampon PBS. La protéine a ensuite été réticulée sur une membrane puis incubée avec les IgG totales de lapin déjà isolées. L'élution et la concentration des IgG retenues ont ainsi donné des IgG spécifiques à RoBP1. Nous avons vérifié ces IgG par immunobuvardage (Figure 23A), cependant le rendement de la méthode utilisée n'a pas été élevé et les dilutions équivalentes des solutions d'anticorps totaux en comparaison aux IgG totales et les IgG immunopurifiées donnent des signaux beaucoup plus élevés, ce qui indique une faible quantité d'IgG immunopurifiées. De plus, ces dernières ne sont pas aptes à immunoprécipiter RoBP1 native dans un extrait de cellules HeLa (Figure 23B), ce qui nous a poussé à poursuivre nos expériences avec le sérum total du lapin.

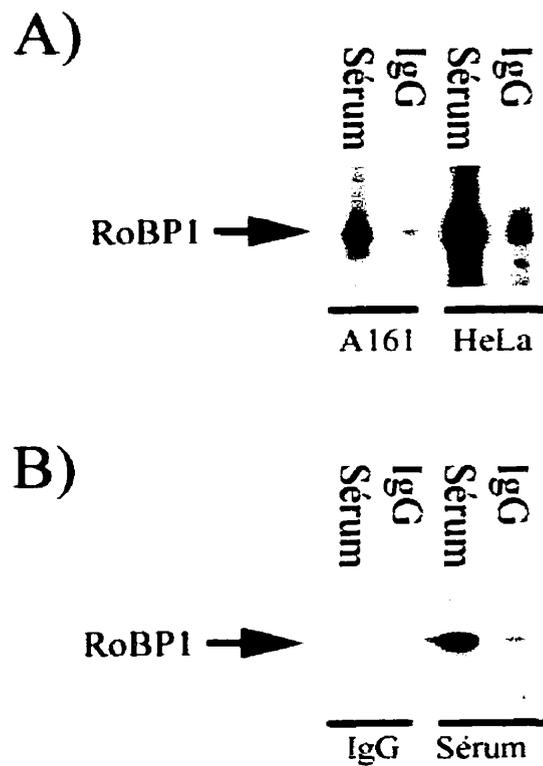


Figure 23. Immunobuvardage et immunoprécipitation de RoBP1 avec 6xHis-A161 et un extrait de cellules HeLa

A) Immunobuvardage. La recombinante 6xHis-A161 et un extrait protéique de cellules HeLa sont fractionnés par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et incubés avec le sérum anti-RoBP1 de lapin et avec les IgG anti-RoBP1 immunopurifiés.

B) Immunoprécipitation. Un extrait de cellules HeLa est incubé avec le sérum anti-RoBP1 de lapin et avec les IgG anti-RoBP1 immunopurifiés réticulés sur des billes de Sépharose/protéine A. Les immunoprécipités sont fractionnés par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et incubés avec les même anticorps utilisés sur les billes.

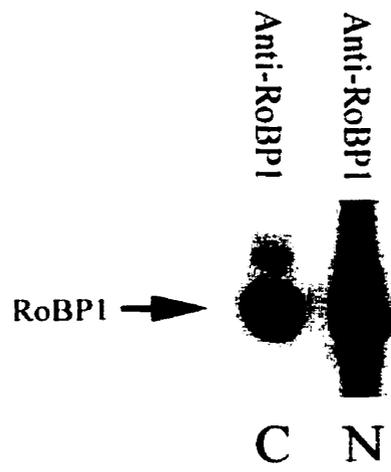
4.4 Localisation cellulaire de RoBP1 par immunobuvardage et IPP

Nous avons entrepris des expériences d'immunobuvardage et d'IPP afin d'examiner la localisation de RoBP1 dans les cellules HeLa. Nous avons utilisé une méthode de fractionnement à la digitonine qui permet de séparer le cytoplasme du noyau de cellules HeLa. Ainsi, les fractions nucléaire et cytoplasmique ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose, avec ou sans immunoprécipitation préalable par le sérum anti-RoBP1 de lapin réticulé sur des billes de sépharose/protéine A. L'immunobuvardage montre une distribution presque égale de RoBP1 entre le noyau et le cytoplasme (Figure 24A) tandis que l'IPP détecte une présence uniquement nucléaire de RoBP1 (Figure 24B). Il est ainsi possible que RoBP1 ne possède pas la même conformation tridimensionnelle dans le noyau et le cytoplasme; les anticorps générés chez le lapin pourraient reconnaître la forme dénaturée (immunobuvardage) et la forme nucléaire native dont la conformation aurait été modifiée. Si c'est le cas, nous ignorons pourquoi les lapins ont pu générer uniquement les anticorps spécifiques à la forme nucléaire, cependant il est possible que ce soit dû à l'immunogénicité plus élevée de cette dernière et/ou à sa quantité.

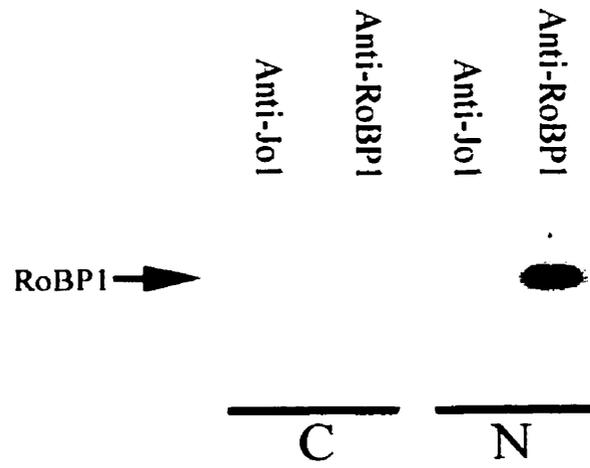
Figure 24. Immunobuvardage et immunoprécipitation de RoBP1 avec des fractions cytoplasme/noyau de cellules HeLa

Le cytoplasme et le noyau de cellules HeLa sont séparés à l'aide d'une technique de fractionnement à la digitonine. **A)** Les extraits de cytoplasme et de noyau sont séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et incubés avec un anticorps anti-RoBP1 polyclonal de lapin. **B)** Les extraits de cytoplasme et de noyau sont incubés avec un anticorps anti-RoBP1 polyclonal de lapin réticulé sur des billes de sépharose/protéine A. Les immunoprécipités sont fractionnés par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et incubés avec les même anticorps utilisés sur les billes ainsi que des sérums contrôle anti-Jol (anti-tRNA^{his} synthétase). (C) indique le cytoplasme et (N) indique le noyau.

A)



B)



4.4.1 Co-immunoprécipitation de RoBP1 avec Ro60

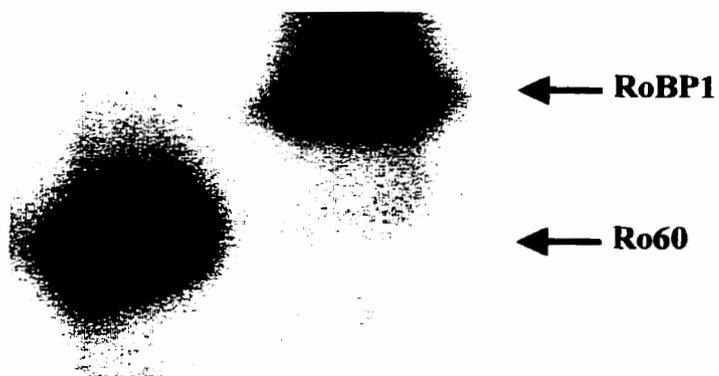
Étant donné l'évidence chez la levure d'une interaction entre RoBP1 et la RNP Ro60^{hY5}, nous voulions vérifier cette interaction chez les cellules humaines en déterminant s'il y a une co-immunoprécipitation (co-IPP) de RoBP1 avec Ro60 chez les cellules HeLa. Nous avons effectué des expériences d'IPP d'extraits de cellules HeLa avec les anticorps anti-RoBP1 de lapin et des anti-Ro60 humains réticulés sur des billes de sépharose/protéine A. L'immunobuvardage des immunoprécipités a été effectué avec les mêmes sérums ayant servi à l'IPP. Le résultat montre une co-IPP réciproque (Figure 25), quoique l'expérience soit difficile à reproduire. Les sérums de lapin sont peut-être insensibles à la forme native de la protéine, étant donné que RoBP1 est endogène au lapin (conservation chez les espèces). On pourrait immuniser des lapins avec des doses plus élevées de protéine renaturée afin de contrer la tolérance envers RoBP1, ou encore utiliser des adjuvants autres que celui de Freund (peut-être que l'effet serait différent dans ce cas-là).

Figure 25. Co-IPP de Ro60 avec RoBP1 dans un extrait de cellules HeLa

Deux extraits de cellules HeLa sont incubés avec des anticorps réticulés sur des billes de sépharose/protéine A dont le premier est anti-Ro60 humain et le deuxième est anti-RoBP1 polyclonal de lapin. Les immunoprécipités sont séparés sur gel SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et incubés avec les mêmes anticorps utilisés sur les billes. **A)** Immunoprécipité de Ro60 blotté avec un anti-Ro60 humain et anti-RoBP1 polyclonal de lapin; **B)** Immunoprécipité de RoBP1 blotté avec un anti-Ro60 humain et anti-RoBP1 polyclonal de lapin.

A)

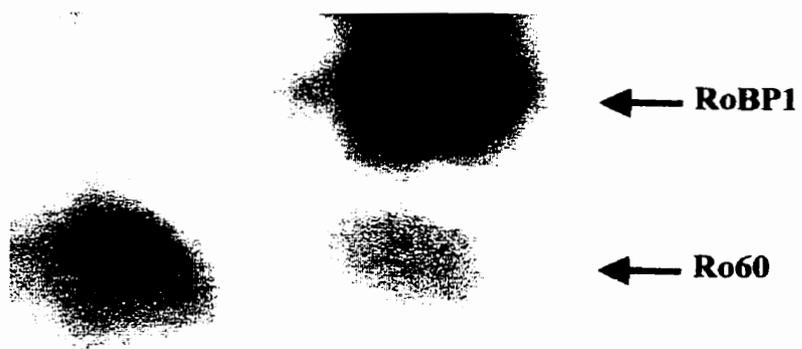
Anti-Ro60 Anti-RoBP1



Immunoprécipitation de Ro60

B)

Anti-Ro60 Anti-RoBP1



Immunoprécipitation de RoBP1

4.4.2 Vérification de l'effet du NaCl sur la co-immunoprécipitation

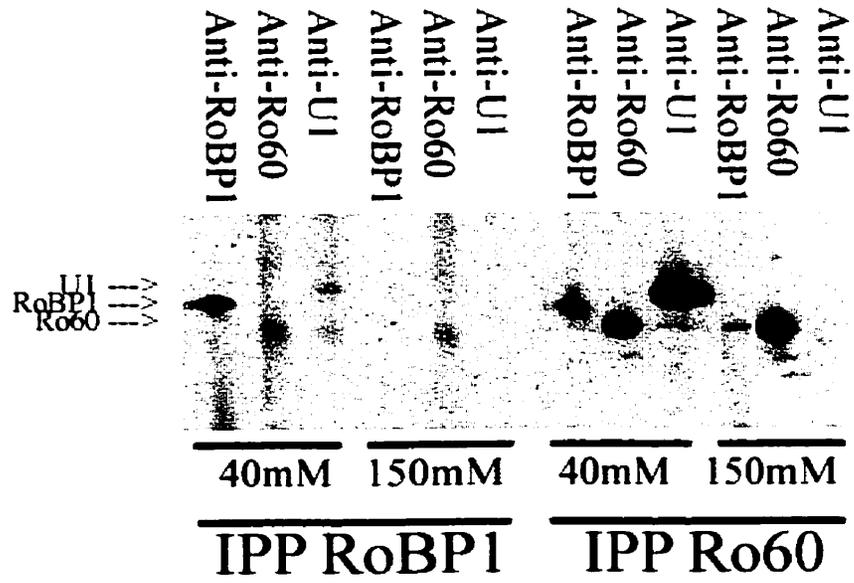
L'échec de reproduire l'expérience de co-immunoprécipitation de RoBP1 avec Ro60 nous a incité à vérifier la possibilité de l'influence de la concentration de sel. Nous avons donc comparé deux IPP simultanément (Figure 26A), l'une en présence de 40mM NaCl dans le tampon Net-2, et l'autre en présence de 150 mM NaCl (condition normale d'IPP). À 40mM de sel, nous observons une légère co-IPP de Ro60 avec RoBP1 (IPP RoBP1), tandis la co-IPP réciproque (IPP Ro60) donne un signal beaucoup plus fort. Tandis qu'à 150mM de sel, il n'y a pas de co-IPP. Curieusement, dans l'IPP de Ro60, nous observons une co-IPP de U1, ce qui n'est pas sensé avoir lieu théoriquement car une association entre Ro60 et U1 n'est pas citée dans la littérature. Nous avons recommencé cette expérience mais en faisant des IPP supplémentaires avec Jo1 et U1 (Figure 26B). Les protéines Jo1 cytoplasmique (tRNA^{his} synthétase) et U1 nucléaire (facteur de transcription) sont deux cibles d'autoanticorps chez les personnes atteintes de maladies du tissu conjonctif (von Muhlen et Tan, 1995). À 40mM de sel, nous observons des co-IPP avec Jo1 et Ro60, et ce avec tous les sérums employés dans l'immunobuvardage. Et à 80 mM de sel, il n'y a pas de co-IPP. Ces expériences ont révélé une sensibilité des anticorps anti-RoBP1 de lapin à la concentration de sel. Cependant, dans les conditions de faible concentration en NaCl, nous observions des co-IPP non spécifiques (surtout pour l'IPP Jo1), ce qui met en doute la pertinence des co-IPP à 40 mM de sel. Bien que la reproduction de la co-IPP RoBP1/Ro60 soit difficile, nos expériences indiquent que les conditions d'interaction sont très sensibles et doivent par conséquent être optimisées.

Figure 26. Co-IPP de Ro60 avec RoBP1 dans un extrait de cellules HeLa, en présence de différentes concentrations de NaCl.

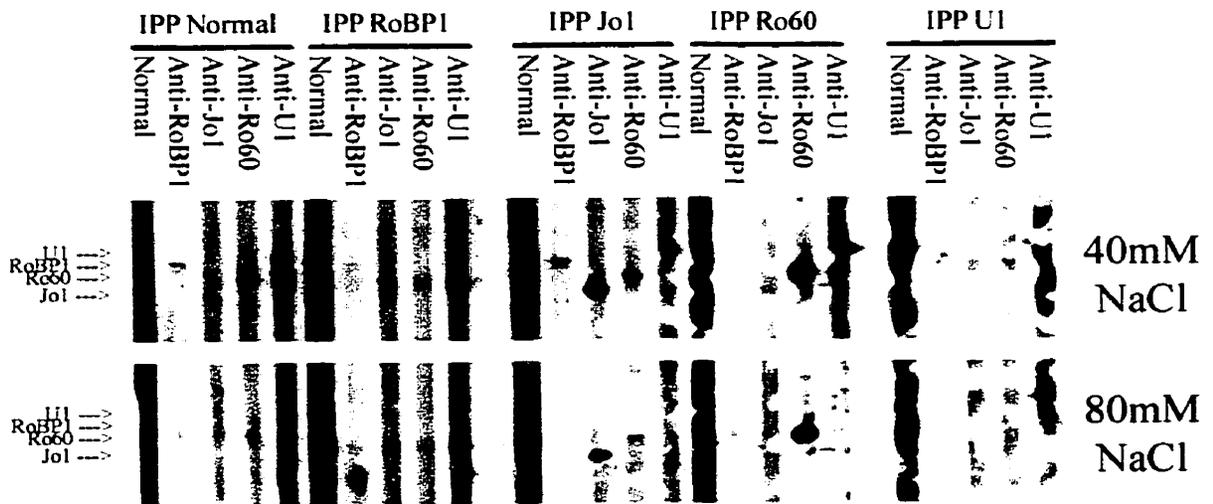
Des extraits de cellules HeLa sont incubés avec des anticorps réticulés sur des billes de sépharose/protéine A, soit des sérums humains anti-Ro60, anti-Jo1 ou anti-U1, et un sérum de lapin anti-RoBP1. Les immunoprécipités sont migrés par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et blottés avec les mêmes anticorps utilisés sur les billes. **A)** IPP de RoBP1 et Ro60; **B)** IPP de RoBP1, Jo1, Ro60 et U1 (contrôle négatif : IPP avec un sérum normal).

N.B. Le sérum normal dans l'immunobuvardage donne un signal très fort car il a été utilisé à une faible dilution.

A)



B)



4.5 Études d'immunofluorescence indirecte

Nous avons ensuite effectué des expériences d'immunofluorescence afin d'appuyer nos résultats en immunobuvardage, IPP et co-IPP. Nous avons utilisé deux méthodes de fixation des cellules, soit à l'éthanol et à la paraformaldéhyde. La fixation à l'éthanol est connue pour causer des agrégats de protéines dans la cellule, contrairement aux aldéhydes (en l'occurrence la paraformaldéhyde). De plus, la cyto centrifugation aplatit les cellules et s'est avérée inappropriée pour conserver les cellules intactes, surtout si la microscopie confocale est utilisée. Ainsi, nous avons opté pour la fixation à la paraformaldéhyde tout en utilisant les cellules en suspension afin de réduire considérablement le bruit de fond et éviter de briser les cellules.

Quant à la microscopie confocale à balayage de laser, cette dernière évalue les mesures de structures biologiques tridimensionnelles avec peu de distortion et avec un grand contraste spatial (Schild, 1996) en comparaison à la microscopie à épifluorescence. Nous avons expérimenté cette microscopie afin de vérifier la colocalisation de RoBP1 avec Ro60.

Comme témoins cellulaires cytoplasmique et nucléaire, des sérums de patients ayant des anti-Jo1 (anti-tRNA^{his} synthétase) et des anti-U1 RNP sont utilisés pour l'IF. Ainsi, à la Figure 27 et à la Figure 28 nous constatons les localisations cytoplasmique et nucléaire respectives de ces autoantigènes, chez les cellules HeLa, et ce par rapport au colorant

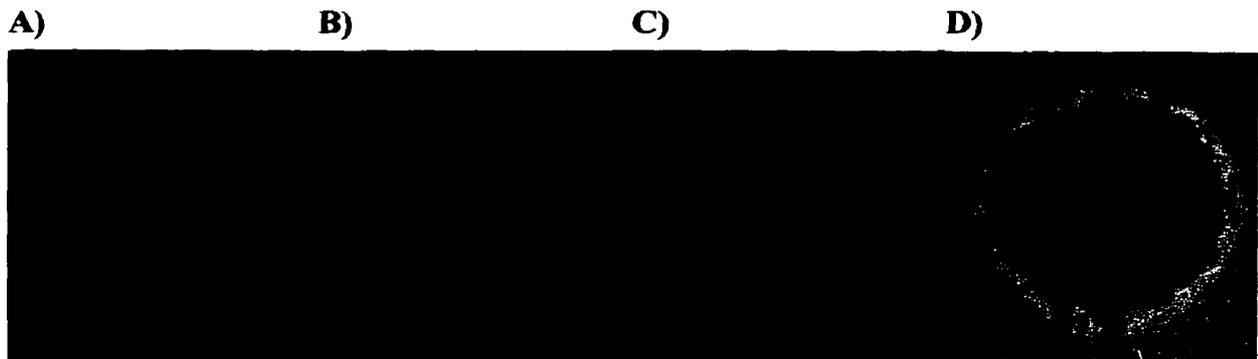


Figure 27. Immunofluorescence indirecte du contrôle cytoplasmique Jo1 (fixation à la PF)

Des cellules HeLa sont fixées en solution avec du paraformaldéhyde et perméabilisées au Triton© X-100. Deux incubations sont effectuées : anticorps anti-Jo1 suivi d'une incubation avec des IgG de chèvre anti-humain conjuguées au TRITC. Quelques gouttes sont montées sur des lames et l'analyse de la fluorescence est faite sous microscopie à épifluorescence en utilisant un filtre à bande passante (grossissement 1000X avec huile à immersion). Les échantillons sont excités à 586 nm puis l'émission est mesurée à >590 nm pour le TRITC. Les noyaux sont marqués avec le colorant H-33258. **A)** Marquage H-33258; **B)** Marquage anti-Jo1/TRITC; **C)** Marquage H-33258 superposé numériquement avec marquage anti-Jo1/TRITC; **D)** Contraste de phase.

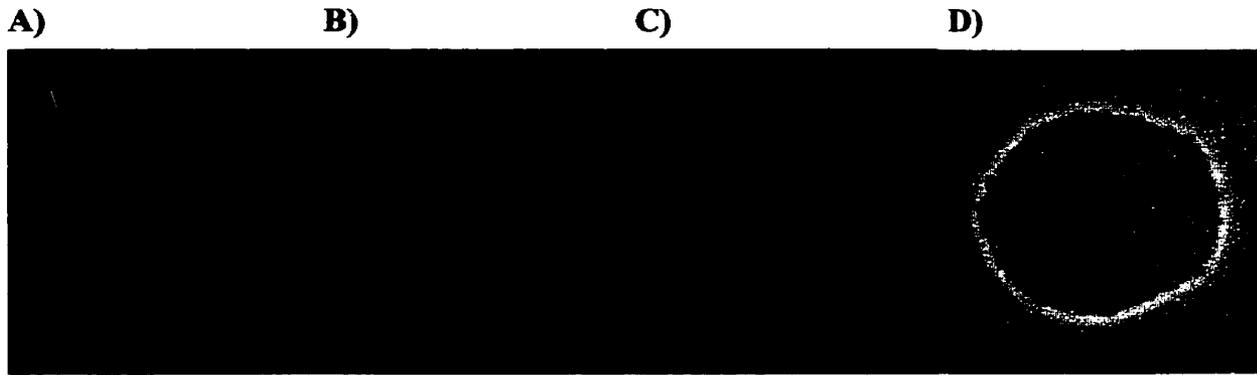


Figure 28. Immunofluorescence indirecte du contrôle nucléaire U1 (fixation à la PF)

Des cellules HeLa sont fixées en solution avec du paraformaldéhyde et perméabilisées au Triton® X-100. Deux incubations sont effectuées : anticorps anti-U1 humain suivi d'une incubation avec des IgG de chèvre anti-humain conjuguées au TRITC. Quelques gouttes sont montées sur des lames et l'analyse de la fluorescence est faite sous microscopie à épifluorescence en utilisant un filtre à bande passante (grossissement 1000X avec huile à immersion). Les échantillons sont excités à 586 nm puis l'émission est mesurée à >590 nm pour le TRITC. Les noyaux sont marqués avec le colorant H-33258. **A)** Marquage H-33258; **B)** Marquage anti-U1/TRITC (rouge); **C)** Marquage H-33258 superposé numériquement avec marquage anti-U1/TRITC; **D)** Contraste de phase.

nucléaire Hoechst-33258 (H33258) qui marque l'ADN. Quant au Ro60, nous observons sa distribution ubiquiste dans la cellule (Figure 29), ce qui est en accord avec la littérature (Wahren *et al.*, 1996). Enfin, les cellules marquées avec des anti-RoBP1 indiquent une localisation ubiquiste, mais à prédominance légèrement nucléaire (Figure 30). En comparant la fluorescence de RoBP1/FITC selon la méthode de fixation (éthanol vs PF), nous constatons une disparité, soit une distribution nucléaire avec la fixation à l'éthanol (Figure 31) en comparaison à une distribution ubiquiste avec la fixation à la PF (Figure 30) mais à prédominance nucléaire. Des expériences témoin ont été faites, soit un sérum préimmun de lapin couplé à l'anticorps secondaire/FITC et un sérum humain normal couplé à l'anticorps secondaire/TRITC. Visuellement, sous le microscope à fluorescence, nous observons une faible fluorescence avec le sérum normal. Cependant, la saisie numérique de ces contrôles négatifs nécessite 20-40 fois plus de temps d'exposition relativement aux fractions de seconde pour les expériences avec les anticorps et leur antigènes correspondants (i.e. anti-RoBP1/FITC, anti-Ro60/TRITC, etc.). Ainsi, nous considérons que ce bruit de fond est négligeable et sans effet marquant sur nos expositions.

Il y a donc une corrélation entre les résultats obtenus en immunofluorescence et ceux obtenus en immunobuvardage et en IPP. Nous observons une localisation exclusivement nucléaire (fixation à l'éthanol) et une localisation ubiquiste (fixation à la PF) de RoBP1, ce qui confirme les résultats obtenus avec l'IPP et l'immunobuvardage respectivement.

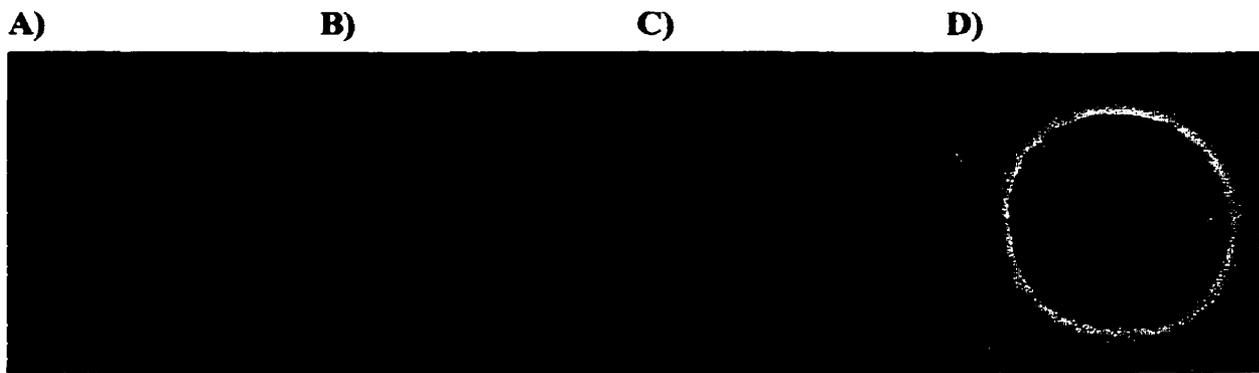


Figure 29. Immunofluorescence indirecte de Ro60 (fixation à la PF)

Des cellules HeLa sont fixées en solution avec du paraformaldéhyde et perméabilisées au Triton® X-100. Deux incubations sont effectuées : anticorps anti-Ro60 humain suivi d'une incubation avec des IgG de chèvre anti-humain conjuguées au TRITC. Quelques gouttes sont montées sur des lames et l'analyse de la fluorescence est faite sous microscopie à épifluorescence en utilisant un filtre à bande passante (grossissement 1000X avec huile à immersion). Les échantillons sont excités à 586 nm puis l'émission est mesurée à >590 nm pour le TRITC. Les noyaux sont marqués avec le colorant H-33258. **A)** Marquage H-33258; **B)** Marquage anti-U1/TRITC; **C)** Marquage H-33258 superposé numériquement avec marquage anti-Ro60/TRITC; **D)** Contraste de phase.

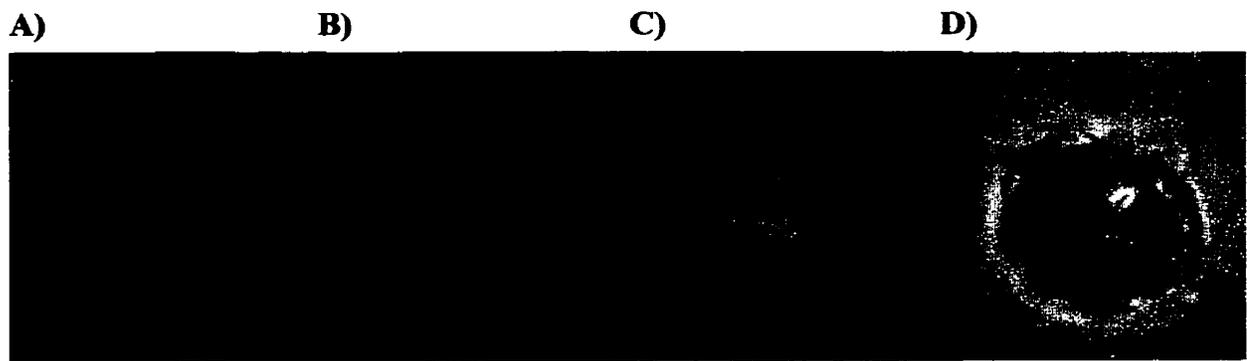
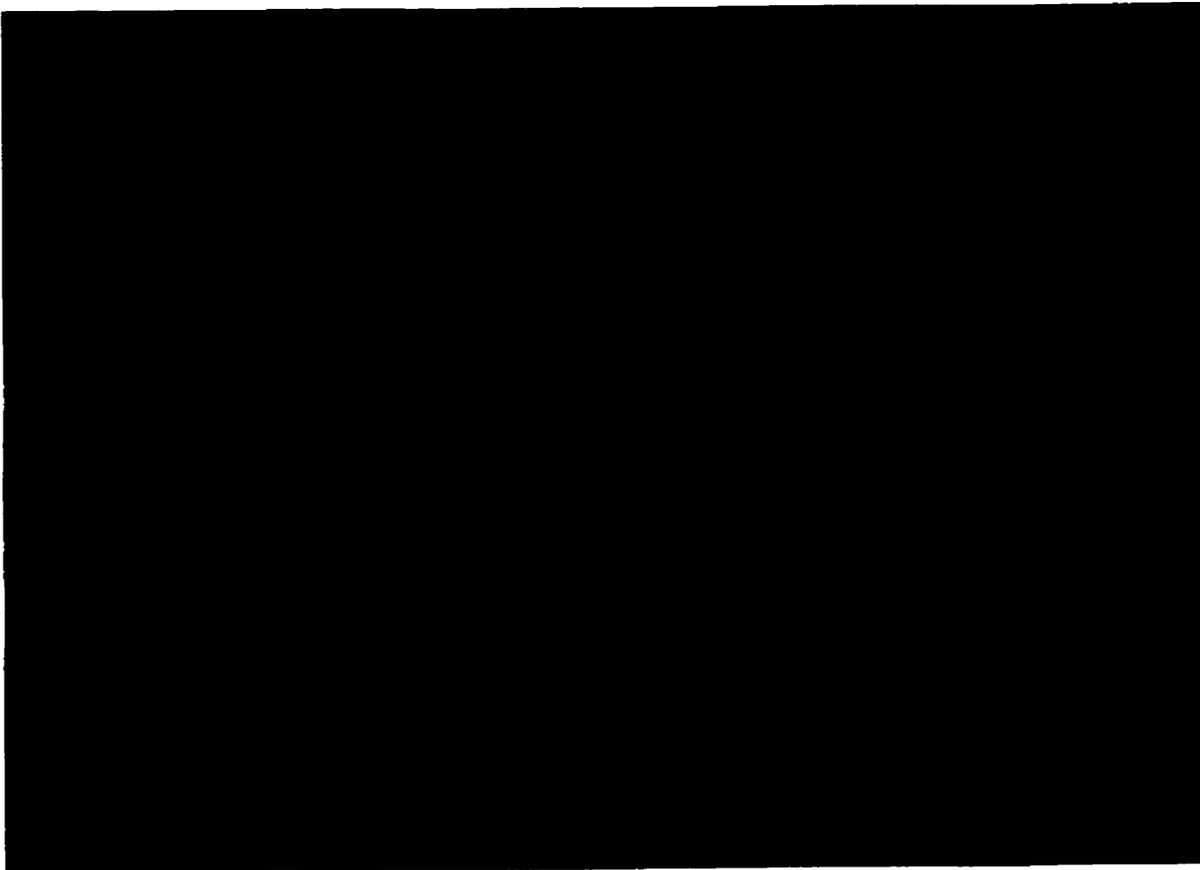


Figure 30. Immunofluorescence indirecte de RoBP1 (fixation à la PF)

Des cellules HeLa sont fixées en solution avec du paraformaldéhyde et perméabilisées au Triton® X-100. Deux incubations sont effectuées : anticorps anti-RoBP1 de lapin suivi d'une incubation avec des IgG de chèvre anti-lapin conjuguées au FITC. Quelques gouttes sont montées sur des lames et l'analyse de la fluorescence est faite sous microscopie à épifluorescence en utilisant un filtre à bande passante (grossissement 1000X avec huile à immersion). Les échantillons sont excités à 488 nm puis l'émission est mesurée à 525-550 nm pour le FITC. Les noyaux sont marqués avec le colorant H-33258. **A)** Marquage H-33258; **B)** Marquage anti-RoBP1/FITC; **C)** Marquage H-33258 superposé numériquement avec marquage anti-RoBP1/FITC; **D)** Contraste de phase.

Figure 31. Immunofluorescence indirecte de RoBP1 (fixation à l'éthanol)

Des cellules HeLa sont déposées sur des lames par cyto centrifugation et fixées à l'éthanol. Une incubation avec l'anticorps anti-RoBP1 polyclonal de lapin est suivie d'une incubation avec des IgG de chèvre anti-lapin conjuguées au FITC. L'analyse de la fluorescence est faite sous microscope à épifluorescence en utilisant un filtre à bande passante (grossissement 1000X avec huile à immersion). Les échantillons sont excités à 488 nm et l'émission est mesurée à 525-550 nm pour le FITC.



4.5.1 Études de co-immunofluorescence indirecte

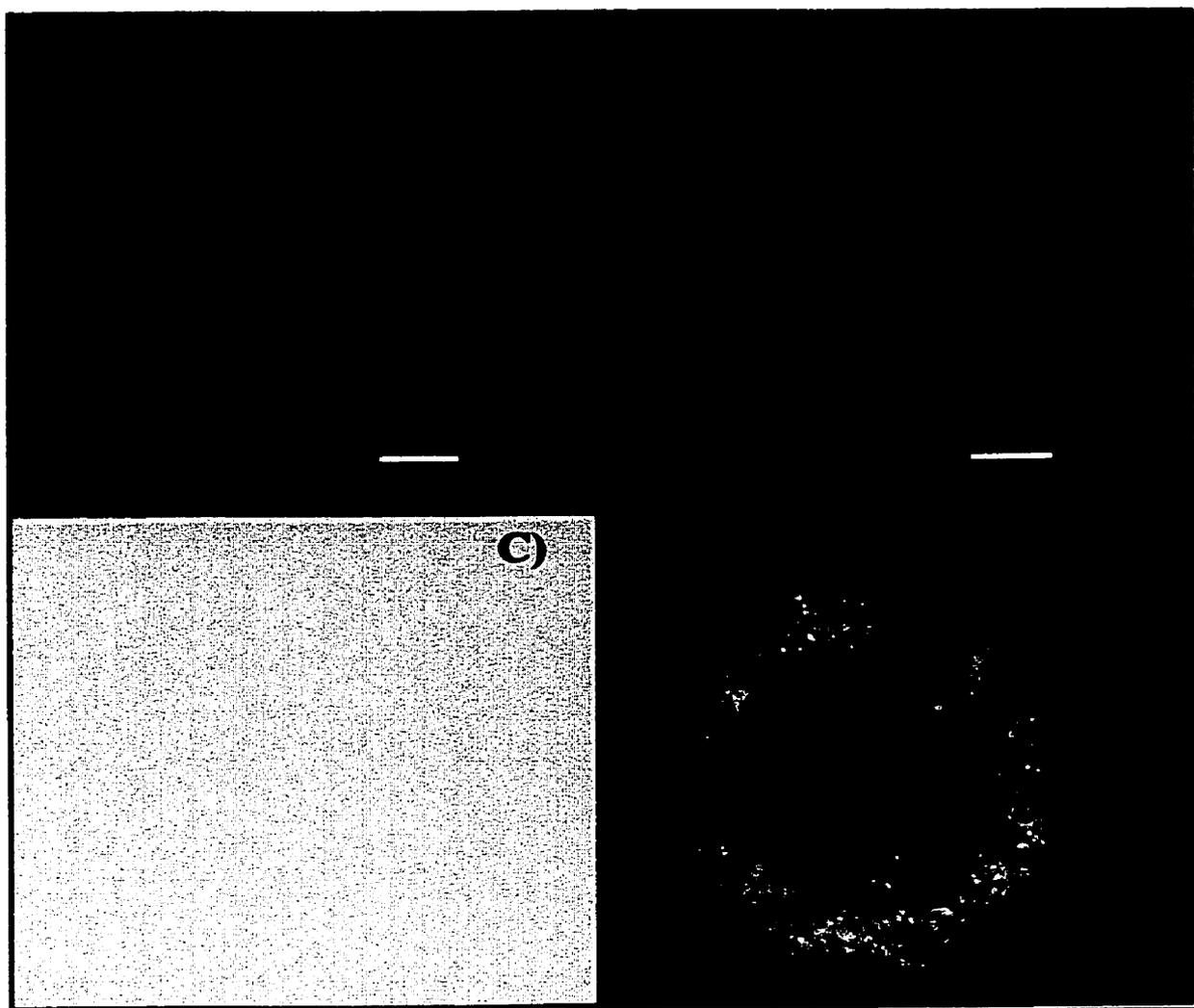
La co-immunofluorescence de RoBP1 avec Ro60 chez les cellules HeLa est analysée par microscopie confocale. Nous obtenons une co-localisation de RoBP1 et Ro60 dans toute la cellule (Figure 32), cependant nous ne pouvons pas distinguer le noyau étant donné certaines limitations imposées par les fluorochromes utilisés et par le microscope confocal. Le microscope confocal utilisé ne possède pas la longueur d'onde adéquate pour exciter le colorant nucléaire H-33258. L'iodure de BOBO-1 (fluorochrome liant l'ADN) nous a été suggéré, cependant le manque de temps et le coût exorbitant de ce produit nous ont empêché de l'utiliser. Il faut garder à l'esprit que ce résultat nous indique une co-localisation et non une interaction, ce qui est une confirmation partielle de la co-IPP et de l'interaction en levure déjà mises en évidence.

Figure 32. Immunofluorescence confocale de RoBP1 et Ro60 (fixation à la PF)

Des cellules HeLa sont fixées en solution avec du paraformaldéhyde et perméabilisées au Triton® X-100. Quatre incubations sont effectuées : anticorps anti-RoBP1 polyclonal de lapin suivie d'une incubation avec des IgG de chèvre anti-lapin conjuguées au FITC, et anticorps anti-Ro60 humain suivie d'une incubation avec des IgG de chèvre anti-humain conjuguées au TRITC . Quelques gouttes sont montées sur des lames et l'analyse de la fluorescence est faite sous microscopie confocale (grossissement 1000X avec huile à immersion). Les échantillons sont excités à 488nm et 586nm puis l'émission est mesurée à 525-550nm et >590nm pour le FITC et le TRITC respectivement. **A)** Marquage anti-RoBP1/FITC; **B)** Marquage anti-Ro60/TRITC; **C)** Marquage anti-RoBP1/FITC superposé numériquement avec marquage anti-Ro60/TRITC.

A)

B)



5. DISCUSSION

Les maladies autoimmunes du tissu conjonctif occasionnent beaucoup de souffrance aux patients atteints. Les causes de ces maladies qui peuvent être mortelles dans certains cas sont inconnues. Les mécanismes fondamentaux caractérisant les autoantigènes et leurs partenaires cellulaires/fonctionnels impliqués demeurent cependant inconnus.

5.1 Macrohistone mH2A

Nous avons séquencé (presque complètement) et caractérisé l'immunogénicité d'un des clones (i.e. Clone3) isolés auparavant dans nos laboratoires lors d'un criblage de sérums pour l'autoantigène Sa. Le séquençage a été partiel; il restait environ 50-100pb à séquencer, mais le manque de temps et les résultats obtenus nous ont poussé à abandonner cette tâche. Le Clone3 correspond à la macrohistone mH2A, une nouvelle forme histonique conservée chez plusieurs espèces. La protéine complète est insoluble dans un système procaryote, cependant nous avons délété le domaine histonique H2A, ce qui a rendu la protéine soluble. En effet, la partie non-histone a été surexprimée en bactérie et cristallisée (Vijay-Kumar *et al.*, 1995). Nous avons tenté de démontrer une réactivité de quelques sérums de patients atteints de maladies du tissu conjonctif contre la recombinante par immunobuvardage. Malheureusement, un seul sérum la reconnaissait faiblement, ce qui suggère que la macrohistone n'est probablement pas une cible autoantigénique majeure dans les maladies autoimmunes. Nous n'avons pas étudié la partie non-histone car il n'y a qu'un seul sérum reconnaissant la forme linéaire de la

protéine complète. Il est ainsi plausible d'expliquer ces résultats par le fait que les histones sont fréquemment reconnus par les autoanticorps (Bustos *et al.*, 1994) et vu la séquence histone commune entre l'histone H2A et la macrohistone mH2A. La macrohistone n'était pas caractérisée (seulement identifiée) lorsque nous avons débuté l'étude du Clone3. Ainsi, la littérature n'était pas aussi élaborée que ce qu'elle est présentement. L'absence de reconnaissance fréquente et la publication des séquences de macro-histones humaines nous ont poussé à terminer le projet de caractérisation du Clone3. Néanmoins, le criblage n'était pas très élaboré et des essais supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer la négativité de nos résultats. D'autre part, il a été suggéré un rôle possible de la macrohistone dans l'inactivation du chromosome X chez les femelles de mammifères (Costanzi et Pehrson, 1998). Par conséquent, nous pourrions spéculer sur l'implication de ce phénomène dans la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde, sachant que cette maladie affecte plus de femmes que d'hommes; toutefois il faudrait démontrer en premier lieu une meilleure réactivité des sérums de patients souffrant de PR. L'étude du Clone3 mérite donc une révision, surtout que la macrohistone attire de plus en plus l'attention des chercheurs.

5.2 RoBP1

Notre laboratoire a identifié RoBP1, une protéine capable d'interagir avec le complexe RNP Ro60^{hY5} chez la levure. Par conséquent, nous avons essayé de caractériser cette interaction dans un système humain en travaillant sur des cellules HeLa.

La production de la protéine recombinante chez *E. coli* est assez ardue. Pour des raisons qui restent à préciser, la production de RoBP1 dans un système eucaryote n'a pas fonctionné. En même temps, une protéine PUF60 (*PolyU Factor 60*) a été identifiée (Page-McCaw *et al.*, 1999) dans le cadre d'études sur les facteurs d'épissage; elle correspond exactement à RoBP1. Les échanges avec le Dr McCaw nous ont aidé sur quelques points, notamment sur la méthode de surexpression chez les bactéries en plus d'obtenir des renseignements sur quelques propriétés de la protéine. Ainsi, il semblerait que PUF60 (en l'occurrence RoBP1) forme un dimère qui résiste à la dénaturation, même après chauffage en conditions réductrices et dénaturantes. Donc, la protéine demeurerait non détectée à cause de sa dimérisation (nous nous attendions à un monomère) et sa faible quantité. Nous avons opté pour l'étude de la protéine recombinante PUF60 dont le domaine de dimérisation en C-terminal a été tronqué (protéine 6xHis-A161) par le groupe du Dr McCaw.

Soulignons que cette dimérisation résistante à la dénaturation est un phénomène rencontré dans quelques cas de surexpression chez les bactéries. Nous avons essayé plusieurs souches bactériennes pour l'expression du clone 2.1, notamment *E.coli* K12 PR745. Cette dernière a permis une expression d'un monomère à 65 kDa de RoBP1, cependant rien n'a été retenu sur la colonne de nickel lors de la purification. Nous ignorons si cette observation est valable étant donné l'échec de la purification des fractions solubles et insolubles. Il est possible que la protéine ait perdu la séquence 6xHis ou bien cette dernière soit inaccessible dû au repliement natif de la protéine. Il faudrait

tenter l'expérience avec un vecteur ayant la séquence 6xHis en C-terminal; peut-être que cela aurait un effet favorable sur la purification.

Nous avons observé que RoBP1 et A161 sont insolubles, probablement dû à un niveau élevé de surexpression (pour A161) pouvant causer la formation de corps d'inclusion, des repliements différents chez la bactérie ou des régions hydrophobes. En outre, RoBP1 possède un indice d'hydropathie moyenne de -0.161 (caractère légèrement hydrophile) ainsi que deux régions légèrement hydrophiles, une région neutre et une région hydrophobe (Figure 15). Peut-être que cela joue un certain rôle dans sa solubilité. Heureusement, la purification est possible mais cela requiert des conditions dénaturantes (i.e. 8 M urée). Une comparaison de l'expression et de la purification de RoBP1 et A161 recombinantes (Figure 14 et Figure 16) montre un meilleur rendement avec le monomère A161 qu'avec les dimères A152 et RoBP1, tant pour l'expression que pour la purification protéique. Cela nous a poussé à opter pour A152 monomérique pour la poursuite de nos travaux.

Malgré l'insolubilité des protéines recombinantes, il est possible de les préparer et les purifier en conditions dénaturantes et ensuite les renaturer/solubiliser par dialyse contre un gradient décroissant d'urée. Nous avons suivi cette approche pour obtenir la protéine soluble A161 (sans urée car cette dernière affecte la réaction de réticulation chimique citée plus bas) utile pour immunopurifier des anticorps de lapin anti-A161. En fixant chimiquement 6xHis-A161 renaturée (soluble) sur une membrane et en l'incubant avec les IgG totales, nous avons obtenu des IgG anti-A161 purifiés, cependant l'expérience

n'est pas très rentable car la multitude de manipulations (dialyse/renaturation, isolement d'IgG) engendre beaucoup de pertes d'anticorps et de protéines. De plus, les IgG immunopurifiées ne pouvaient pas immunoprécipiter RoBP1 dans un extrait protéique de cellules HeLa, contrairement au sérum total. Cependant, cette approche est à explorer en profondeur afin d'optimiser le rendement.

La protéine recombinante 6xHis-A161, étant produite et purifiée, nous a permis d'entreprendre un criblage de sérums de patients atteints de maladies du tissu conjonctif. Plusieurs sérums réagissent contre la protéine recombinante 6xHis-A161 d'une manière relativement faible à forte. Toutefois, il faut signaler que cette réactivité est faible comparée à la réactivité contre les autoanticorps communs (anti-Ro52, anti-Ro60, anti-La). Curieusement, les sérums réagissant fortement avec la protéine recombinante ne réagissent pas avec RoBP1 dans un extrait de cellules HeLa total et ne peuvent pas l'immunoprécipiter. Cela est peut-être causé par la quantité faible de RoBP1 dans l'extrait de cellules comparée à la recombinante qui est quantifiable (par DO_{280nm}) et utilisée concentrée en immunobuvardage. De plus, il est possible que ces anticorps soient en faible quantité dans le sérum, ce qui nécessite une faible dilution du sérum et une grande quantité d'antigène (cas de la protéine recombinante 6xHis-A161) afin d'obtenir un signal. Ainsi, l'immunobuvardage nous indique que A161 (i.e. RoBP1) est potentiellement une cible d'autoanticorps de sérums de LED et de SjS.

Les résultats de localisation cellulaire par immunobuvardage ont montré une présence équivalente de RoBP1 entre le cytoplasme et le noyau, tandis que par IPP, RoBP1 est

présente exclusivement dans le noyau. Là, les anticorps générés chez le lapin sont mis en cause. Les anticorps anti-RoBP1 de lapin peuvent contenir deux sous-populations : celles qui reconnaissent la protéine dénaturée et celles reconnaissant RoBP1 native. Ainsi, possiblement que la structure tridimensionnelle de RoBP1 cytoplasmique est différente de celle nucléaire. Cette différence peut résulter d'un repliement différent dû au processus de maturation post-traductionnelle et/ou aux interactions avec d'autres entités cytoplasmiques/nucléaires.

Les analyses de co-IPP n'ont pas pu mettre en évidence l'interaction de RoBP1 avec la RNP Ro60^{hY5} par co-IPP; les résultats sont positifs pour quelques essais et non-reproductibles pour la plupart des expériences. Nous avons même vérifié un effet possible de la concentration de sel sur l'IPP, mais à une faible concentration de NaCl il y a des interactions non spécifiques avec les sérums. Il devient ainsi difficile d'évaluer l'effet du sel sur l'interaction anticorps/antigène dans notre cas. Nous croyons que l'insuccès d'immunoprécipiter est un problème intrinsèque aux anticorps générés chez le lapin. En fait, nous voulions obtenir un sérum de lapin qui aurait pu immunoprécipiter RoBP1, mais malheureusement les résultats d'IPP que nous avons eu ne sont pas toujours satisfaisants. Patrick McCaw a de même essayé d'immuniser deux lapins et trois poulets avec des peptides de PUF60 mais aucun de ces animaux n'a pu générer un sérum immunoprécipitant. Par contre, les analyses d'immunoblot sur la recombinante et sur des extraits de cellules HeLa nous révèlent l'excellente qualité des sérums à reconnaître des antigènes dénaturés. Justement, nous avons immunisé nos lapins avec la protéine dénaturée.

Quelques méthodes peuvent être employées afin de produire une forme native de la protéine chez l'animal par une immunisation avec l'ADN. Les mécanismes d'action de ce type d'immunisation ne sont pas complètement compris. Aussi, le succès avec ce procédé est difficile à obtenir car plusieurs paramètres sont à considérer et méritent d'être mis au point. Nous avons tenté une immunisation avec le vecteur pcDNA3.1/V5-His-TOPO par voie intramusculaire, mais nous n'avons pas eu de succès. Cette voie d'administration de l'ADN n'est pas la plus efficace. L'expérience de nos collègues (groupe du Dr. Brian Talbot, Université de Sherbrooke) nous indique que la voie intradermique est la meilleure. Également, la trousse de purification de l'ADN utilisée n'était pas celle qui permet l'enlèvement des endotoxines (*Endotoxin Free*). Ces substances activent non spécifiquement le système immunitaire et engendrent une certaine « ignorance envers » l'ADN alors qu'une réponse immunitaire est déclenchée contre les endotoxines. L'effet est moins marquant pour la voie intramusculaire, cependant il est très important de se débarrasser des endotoxines pour la voie intradermique car les cellules de Langerhans (qui sont des APC) sont directement affectées : après une stimulation par les endotoxines, elles migrent vers les ganglions lymphatiques. Ainsi, l'ADN qu'on injecte n'est pas exprimé, ce qui réduit beaucoup l'efficacité de l'immunisation. En outre, il est possible d'utiliser un vecteur possédant une séquence signal permettant la sécrétion de l'antigène une fois que l'ADN est injecté (e.g. pSecTag [Invitrogen]). Cette méthodologie expose le système immunitaire à l'antigène de façon soutenue et plus efficacement que s'il était séquestré dans la cellule, favorisant une meilleure réponse humorale. Enfin, il est possible d'accentuer la réponse immunitaire en coimmunisant avec un plasmide encodant l'IL-4,

interleukine stimulatrice de la différenciation des Th2 qui sont de meilleurs activateurs des cellules B (Janeway et Travers P., 1997), ou un plasmide encodant le GM-CSF (activateur des macrophages).

Nous avons entrepris des études de microscopie de fluorescence (MF) et de microscopie confocale de fluorescence (MCF) afin d'appuyer nos résultats d'immunobuvardage et d'IPP. Nous avons constaté quelques différences selon la méthode de fixation des cellules. Nous avons opté pour la fixation à la PF étant donné les avantages remarquables par rapport à la fixation à l'éthanol; les aldéhydes ont un effet moindre sur la taille cellulaire et n'affectent pas la morphologie (granularité) en comparaison à d'autres fixatifs, comme les alcools (Rousselle *et al.*, 1998).

La fixation à l'éthanol nous montre une localisation exclusivement nucléaire de RoBP1 alors que la fixation à la PF montre une distribution cellulaire plus uniforme, quoiqu'une prédominance nucléaire est perceptible. La divergence entre ces deux comportements est probablement due à un facteur intrinsèque à la méthode de fixation. L'éthanol entraîne des agrégats protéiques et des changements morphologiques; il est donc possible que cela affecte la structure de RoBP1 cytoplasmique, empêchant ainsi la reconnaissance par les anticorps. D'autre part, plusieurs groupes (Keech *et al.*, 1994; Wahren *et al.*, 1996) ont montré des localisations différentes de Ro60 en immunofluorescence. Employé seul, cet outil n'est pas entièrement fiable, cependant il est utile quand on l'utilise en parallèle avec d'autres types d'expériences, comme nous l'avons fait.

Le double marquage des cellules HeLa avec des anticorps anti-RoBP1 et anti-Ro60 couplés à des anti-anticorps conjugués à des fluorochromes a révélé une colocalisation cellulaire partielle. Ces résultats ne montrent pas une interaction directe entre RoBP1 et Ro60, mais indiquent une présence de ces protéines au même endroit dans la cellule.

Pour résumer, les travaux du Dr Bouffard ont démontré une interaction entre RoBP1 et une RNP Ro60-hY5 recombinante dans un système triple-hybride. Une autre possibilité est que cette interaction soit influencée par le système de levure, des facteurs intrinsèques, un repliement différent, etc. D'autre part, la reconnaissance par des sérums de patients (immunobuvardage) suggère un potentiel peptidique d'antigénicité (épitopes linéaires) étant donné que les patients positifs en immunobuvardage ne semblent pas la reconnaître en IPP. Finalement, l'immunoprécipitation en association avec Ro60 est possible, ce qui suggère une interaction potentielle de RoBP1 avec la RNP Ro *in vivo*, du moins d'une façon transitoire.

Les études avec RoBP1 se poursuivent. Un criblage sur une grande échelle mérite d'être fait en vue d'avoir des résultats statistiquement acceptables. D'une autre part, une recherche d'un homologue fonctionnel de RoBP1 en levure est en cours. Le système de levure est un modèle simplifié et facile à travailler. Nous espérons ainsi mettre en évidence la fonction de RoBP1 en levure pour ensuite la transposer à l'humain. De plus, les expériences d'inactivation du gène de Ro60 chez la souris (S. Wolin, résultats non publiés) et le nématode (Labbe *et al.*, 1999) ont été effectuées et des phénotypes aberrants dans le développement ont été observés chez la souris. Hormis la petite taille et la

viabilité des souris, nous ne possédons aucune information additionnelle sur les phénotypes observés car les résultats ne sont pas encore publiés. Ainsi, on démontre l'importance de Ro60 dans le développement des organismes supérieurs. Et, si RoBP1 est effectivement un facteur ayant un rôle dans le mécanisme d'action de Ro60, une invalidation du gène de RoBP1 serait un outil crucial pour déterminer la relation avec les phénotypes de l'invalidation du gène de Ro60 et pour explorer son rôle pathogénique dans les maladies autoimmunes.

REMERCIEMENTS

Je remercie le bon Dieu pour m'avoir donné la patience et la force de persévérer durant ma maîtrise. Je tiens à remercier le Dr Gilles Boire pour m'avoir donné la chance de travailler au sein de son laboratoire. L'expérience dans son laboratoire a été très enrichissante sur les plan scientifique, technique et personnel. Je remercie mon mentor Pascal Bouffard pour son accueil, sa disponibilité et ses discussions valorisantes. Pascal, tu as été un excellent guide. Francis Brière, merci pour ton amitié, tes discussions techniques et ton aide dans mes débuts au laboratoire. Enfin, un grand merci à Maryse Gendron qui m'a appris beaucoup de choses et avec qui j'ai partagé beaucoup de moments d'humour et de sérieux. Je remercie également Carol Richard pour son aide technique en immunofluorescence. Enfin, j'adresse des remerciements à tout le personnel du Service de rhumatologie, surtout notre secrétaire Marthe Filion pour son travail extraordinaire et exemplaire, les collègues et les patrons.

BIBLIOGRAPHIE

- Ando,K., Guidotti,L.G., Cerny,A., Ishikawa,T., Chisari,F.V. (1994). CTL access to tissue antigen is restricted in vivo. *Journal of Immunology* 153, 482-488.
- Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.D., Seidman,J.G., Smith,J.A., Struhl,K. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.
- Boire,G., Gendron,M., Monast,N., Bastin,B., Menard,H.A. (1995). Purification of antigenically intact Ro ribonucleoproteins; biochemical and immunological evidence that the 52-kD protein is not a Ro protein. *Clinical & Experimental Immunology* 100, 489-498.
- Bouffard,P., Barbar,E., Brière,F., Boire,G. (2000). Interaction cloning and characterization of RoBPI, a novel protein binding to human Ro ribonucleoproteins. *Rna* 6, 1-13.
- Bouffard,P., Brière,F., Wellinger,R.J., Boire,G. (1999). Identification of ribonucleoprotein (RNP)-specific protein interactions using a yeast RNP interaction trap assay (RITA). *Biotechniques* 27, 790-796.
- Bradd,S.J., Dunn,M.J. (1993). Analysis of membrane proteins by western blotting and enhanced chemiluminescence. *Methods in Molecular Biology* 19, 211-218.
- Brucato,A., Buyon,J.P., Horsfall,A.C., Lee,L.A., Reichlin,M. (1999). Fourth international workshop on neonatal lupus syndromes and the Ro/SSA-La/SSB System. *Clinical & Experimental Rheumatology* 17, 130-136.
- Burnet,F.M. (1957). *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Vanderbilt University Press, Nashville.
- Bustos,A., Boimorto,R., Subiza,J.L., Pereira,L.F., Marco,M., Figueredo,M.A., de la Concha,E.G. (1994). Inhibition of histone/anti-histone reactivity by histone-binding serum components; differential effect on anti-H1 versus anti-H2B antibodies. *Clinical & Experimental Immunology* 95, 408-414.

- Buyon, J.P., Slade, S.G., Chan, E.K., Tan, E.M., Winchester, R. (1990). Effective separation of the 52 kDa SSA/Ro polypeptide from the 48 kDa SSB/La polypeptide by altering conditions of polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Immunological Methods* 129, 207-210.
- Costanzi, C., Pehrson, J.R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393, 599-601.
- Després, N., Boire, G., Lopez-Longo, F.J., Menard, H.A. (1994). The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 21, 1027-1033.
- Dighiero, G. (1997). Natural autoantibodies, tolerance, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 815, 182-192.
- Farris, A.D., Puvion-Dutilleul, F., Puvion, E., Harley, J.B., Lee, L.A. (1997). The ultrastructural localization of 60-kDa Ro protein and human cytoplasmic RNAs: association with novel electron-dense bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3040-3045.
- French, D.L., Laskov, R., Scharff, M.D. (1989). The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. *Science* 244, 1152-1157.
- Fritzier, M.J., Tan, E.M. (1978). Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation* 62, 560-567.
- Griffith, T.S., Ferguson, T.A. (1997). The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege [published erratum appears in *Immunology Today* (1997) 18, 361]. *Immunology Today* 18, 240-244.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. CSH Publications, New York, USA, chap.5.
- Hayday, A., Geng, L. (1997). Gamma delta cells regulate autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 9, 884-889.

- Hendrick,J.P., Wolin,S.L., Rinke,J., Lerner,M.R., Steitz,J.A. (1981). Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Molecular & Cellular Biology* 1, 1138-1149.
- Incaprera,M., Rindi,L., Bazzichi,A., Garzelli,C. (1998). Potential role of the Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus autoimmunity. *Clinical & Experimental Rheumatology* 16, 289-294.
- Itoh,N., Yonehara,S., Ishii,A., Yonehara,M., Mizushima,S., Sameshima,M., Hase, Seto,Y., Nagata,S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.
- Janeway,C.A.J., Bottomly,K. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76, 275-285.
- Janeway,C.A.J., Travers P. (1997). Immunobiology : The Immune System in Health and Disease. 3^{ème} Édition, Hunt,E., Montier,G., Richardson,H. Garland Publishing Inc, New York, USA, chap. 4 et 12.
- Keech,C.L., McCluskey,J., Gordon,T.P. (1994). Transfection and overexpression of the human 60-kDa Ro/SS-A autoantigen in HEP-2 cells. *Clinical Immunology & Immunopathology* 73, 146-151.
- Keene,J.D. (1996). RNA recognition by autoantigens and autoantibodies. *Molecular Biology Reports* 23, 173-181.
- Kelekar,A., Saitta,M.R., Keene,J.D. (1994). Molecular composition of Ro small ribonucleoprotein complexes in human cells. Intracellular localization of the 60- and 52-kD proteins. *Journal of Clinical Investigation* 93, 1637-1644.
- Klatt,P., Schmidt,K., Lehner,D., Glatter,O., Bachinger,H.P., Mayer,B. (1995). Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO Journal* 14, 3687-3695.

- Kotzin,B.L. (1996). Systemic lupus erythematosus. *Cell* 85, 303-306.
- Kyte,J., Doolittle,R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157, 105-132.
- La Cava,A., Nelson,J.L., Ollier,W.E., MacGregor,A., Keystone,E.C., Thorne,J.C., Scavulli,J.F., Berry,C.C., Carson,D.A., Albani,S. (1997). Genetic bias in immune responses to a cassette shared by different microorganisms in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 100, 658-663.
- Labbe,J.C., Hekimi,S., Rokeach,L.A. (1999). The levels of the RoRNP-associated Y RNA are dependent upon the presence of ROP-1, the *Caenorhabditis elegans* Ro60 protein. *Genetics* 151, 143-150.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafaille,J.J. (1998). The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 9, 139-151.
- Lee,Y., Hong,M., Kim,J.W., Hong,Y.M., Choe,Y.K., Chang,S.Y., Lee,K.S., Choe,I.S. (1998). Isolation of cDNA clones encoding human histone macroH2A1 subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1399, 73-77.
- Lin-Marq,N., Clarkson,S.G. (1998). Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein. *EMBO Journal* 17, 2033-2041.
- Mamula,M.J. (1998). Epitope spreading: the role of self peptides and autoantigen processing by B lymphocytes. *Immunological Reviews* 164, 231-239.
- Mao,M., Fu,G., Wu,J.S., Zhang,Q.H., Zhou,J., Kan,L.X., Huang,Q.H., He,K.L., Gu,B.W., Han,Z.G., Shen,Y., Gu,J., Yu,Y.P., Xu,S.H., Wang,Y.X., Chen,S.J., Chen,Z. (1998). Identification of genes expressed in human CD34(+) hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8175-8180.

- McCluskey,J., Farris,A.D., Keech,C.L., Purcell,A.W., Rischmueller,M., Kinoshita, G, Reynolds,P., Gordon,T.P. (1998). Determinant spreading: lessons from animal models and human disease. *Immunological Reviews* 164, 209-229.
- McKnight,S.L., Landschulz,W.H., Johnson,P.F. (1988). Prediction of a dimerization surface common to a new class of sequence-specific DNA binding proteins. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 141, 186-188.
- Miettinen,H.M., Edwards,S.N., Jalkanen,M. (1994). Analysis of transport and targeting of syndecan-1: effect of cytoplasmic tail deletions. *Molecular Biology of the Cell* 5, 1325-1339.
- Murakami,M., Tsubata,T., Okamoto,M., Shimizu,A., Kumagai,S., Imura,H., Honjo (1992). Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice. *Nature* 357, 77-80.
- Noelle,R.J., Mackey,M., Foy,T., Buhlmann,J., Burns,C. (1997). CD40 and its ligand in autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 815, 384-391.
- O'Brien,C.A., Margelot,K., Wolin,S.L. (1993). Xenopus Ro ribonucleoproteins: members of an evolutionarily conserved class of cytoplasmic ribonucleoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7250-7254.
- O'Brien,C.A., Wolin,S.L. (1994). A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes & Development* 8, 2891-2903.
- Page-McCaw,P.S., Amonlirdviman,K., Sharp,P.A. (1999). PUF60 : a novel U2AF65-related splicing activity. *Rna* 5, 1548-1560.
- Peek,R., Pruijn,G.J., Van der Kemp,A.J., van Venrooij,W.J. (1993). Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *Journal of Cell Science* 106, 929-935.
- Pehrson,J.R., Costanzi,C., Dharia,C. (1997). Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *Journal of Cellular Biochemistry* 65, 107-113.

- Pehrson, J.R., Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1398-1400.
- Pehrson, J.R., Fuji, R.N. (1998). Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Research* 26, 2837-2842.
- Pellizzoni, L., Lotti, F., Rutjes, S.A., Pierandrei-Amaldi, P. (1998). Involvement of the *Xenopus laevis* Ro60 autoantigen in the alternative interaction of La and CNBP proteins with the 5'UTR of L4 ribosomal protein mRNA. *Journal of Molecular Biology* 281, 593-608.
- Porter, R.R. (1973). Structural studies of immunoglobulins. *Science* 180, 713-716.
- Pruijn, G.J., Simons, F.H., van Venrooij, W.J. (1997). Intracellular localization and nucleocytoplasmic transport of Ro RNP components. *European Journal of Cell Biology* 74, 123-132.
- Pruijn, G.J., Slobbe, R.L., van Venrooij, W.J. (1991). Analysis of protein-RNA interactions within Ro ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Research* 19, 5173-5180.
- Ragheb, S., Lisak, R.P. (1998). Immune regulation and myasthenia gravis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 841, 210-224.
- Ramos-Deleon, M., Herrera-Esparza, R. (1998). Tyrosine kinase participates in phosphorylation of the Ro60 ribonucleoprotein. *Revue Du Rhumatisme, English Edition* 65, 89-93.
- Reeves, W.H., Dong, X., Wang, J., Hamilton, K. (1997). Initiation of autoimmunity to self-proteins complexed with viral antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences* 815, 139-154.
- Rousselle, C., Robert-Nicoud, M., Ronot, X. (1998). Flow cytometric analysis of DNA content of living and fixed cells: a comparative study using various fixatives. *Histochemical Journal* 30, 773-781.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2^{ème} Edition, Nolan, C., CSH Publications, USA, chap.1.

- Sanger,F., Nicklen,S., Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Schild,D. (1996). Laser scanning microscopy and calcium imaging. *Cell Calcium* 19, 281-296.
- Schild,H., Mavaddat,N., Litzenger,C., Ehrich,E.W., Davis,M.M., Bluestone,J.A., Matis,L., Draper,R.K., Chien,Y.H. (1994). The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* 76, 29-37.
- Scofield,R.H., Farris,A.D., Horsfall,A.C., Harley,J.B. (1999). Fine specificity of the autoimmune response to the Ro/SSA and La/SSB ribonucleoproteins. *Arthritis & Rheumatism* 42, 199-209.
- SenGupta,D.J., Zhang,B., Kraemer,B., Pochart,P., Fields,S., Wickens,M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8496-8501.
- Shlomchik,M.J., Marshak-Rothstein,A., Wolfowicz,C.B., Rothstein,T.L., Weigert, MG (1987). The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* 328, 805-811.
- Shoenfeld,Y., George,J. (1997). Induction of autoimmunity. A role for the idiotypic network. *Annals of the New York Academy of Sciences* 815, 342-349.
- Simons,F.H., Rutjes,S.A., van Venrooij,W.J., Pruijn,G.J. (1996). The interactions with Ro60 and La differentially affect nuclear export of hY1 RNA. *RNA* 2, 264-273.
- Slobbe,R.L., Pruijn,G.J., Damen,W.G., van der Kemp,J.W., van, Venrooij,W.J. (1991). Detection and occurrence of the 60- and 52-kD Ro (SS-A) antigens and of autoantibodies against these proteins [published erratum appears in *Clinical & Experimental Immunology* (1992) 87, 336]. *Clinical & Experimental Immunology* 86, 99-105.
- Southern,E. (1979). Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods in Enzymology* 68, 152-176.

- Spitzer,R.E., Stitzel,A.E., Tsokos,G.C. (1992). Study of the idiotypic response to autoantibody to the alternative pathway C3/C5 convertase in normal individuals, patients with membranoproliferative glomerulonephritis, and experimental animals. *Clinical Immunology & Immunopathology* 62, 291-294.
- Suda,T., Nagata,S. (1997). Why do defects in the Fas-Fas ligand system cause autoimmunity?. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 100, S97-101.
- Suda,T., Takahashi,T., Golstein,P., Nagata,S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
- Tan,E.M. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Advances in Immunology* 44, 93-151.
- Theofilopoulos,A.N. (1995). The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunology Today* 16, 90-98.
- Tonegawa,S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Towbin,H., Staehelin,T., Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Van den Eertwegh,A.J., Noelle,R.J., Roy,M., Shepherd,D.M., Aruffo,A., Ledbetter, JA, Boersma,W.J., Claassen,E. (1993). In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions. *Journal of Experimental Medicine* 178, 1555-1565.
- Vijay-Kumar,S., Chandra,N., Dharia,C., Pehrson,J.R. (1995). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of nonhistone region of macroH2A.1. *Proteins* 22, 290-292.
- Von Muhlen,C.A., Tan,E.M. (1995). Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Seminars in Arthritis & Rheumatism* 24, 323-358.

- Wahren,M., Mellqvist,E., Vene,S., Ringertz,N.R., Pettersson,I. (1996). Nuclear colocalization of the Ro 60 kDa autoantigen and a subset of U snRNP domains. *European Journal of Cell Biology* 70, 189-197.
- Wang,D., Buyon,J.P., Zhu,W., Chan,E.K.L. (1999). Defining a novel 75-kDa phosphoprotein associated with SS-A/Ro and identification of distinct human autoantibodies. *Journal of Clinical Investigation* 104, 1265-1275.
- Wolin,S.L., Steitz,J.A. (1984). The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 1996-2000.