

UNIVERSITE DE SHERBROOKE

**Caractérisation et immunogénicité de l'autoantigène Ro et
signification clinique des autoanticorps anti-Ro**

par

Gilles Boire M.D.

Département de Sciences Cliniques

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences (M.Sc.)

Juillet 1990.



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Canadian Theses Service Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada
K1A 0N4

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

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

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

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

ISBN 0-315-76183-0

Canada

TABLE DES MATIERES

	PAGES
Table des matières.....	I
Liste des illustrations.....	VII
Liste des abréviations.....	XIII
Résumé.....	XV
Note concernant le matériel publié.....	XXI
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Système immunitaire.....	4
1.1.1 Définitions.....	5
1.1.1.1 Antigène.....	5
1.1.1.2 Epitope.....	5
1.1.1.3 Anticorps.....	6
1.1.1.4 Tolérance.....	6
1.1.2 Caractéristiques de la réponse immune.....	7
1.1.3 Présentation de l'antigène.....	8
1.1.3.1 Complexe majeur d'histo- compatibilité (CMH).....	8
1.1.3.2 Association avec les molécules CMH de classe I.....	10

1.1.3.3	Association avec les molécules CMH de classe II.....	10
1.1.4	Reconnaissance antigénique.....	11
1.1.4.1	Lymphocytes T.....	11
1.1.4.2	Lymphocytes B.....	12
1.1.4.3	Production des anticorps: interaction entre lymphocytes T et B.....	12
1.2	Tolérance et autoimmunité.....	14
1.3	Autoanticorps et collagénoses.....	17
1.4	Maladies autoimmunes et autoanticorps anti-Ro.....	20
1.5	Anti-Ro et polyarthrite rhumatoïde.....	23
1.6	Hétérogénéité des anticorps anti-Ro.....	24
1.7	Rôle pathogénique des autoanticorps.....	26
1.8	Rôle pathogénique des anticorps anti-Ro.....	27
1.9	L'autoantigène Ro.....	28
1.9.1	Composantes ARN et protéiques.....	28
1.9.2	Les ribonucléoprotéines Ro.....	31
1.9.3	Localisation intracellulaire de l'antigène Ro.....	31
1.9.4	Expression à l'antigène Ro à la surface des cellules.....	33
1.10	Techniques de détection des autoanticorps.....	34
2.	MATERIEL ET METHODES.....	37
2.1	Sera.....	38
2.2	Etude pilote.....	39

2.3	Etude de cohorte de la population rhumatoïde.....	40
2.3.1	Sélection des patients.....	40
2.3.2	Inclusion des patients.....	42
2.3.3	Manifestations cibles.....	43
2.3.4	Taille de l'échantillon.....	45
2.3.5	Collecte des données.....	46
2.3.6	Evaluation des traitements antirhumatismaux.....	46
2.3.7	Détection des anticorps antinucléaires.....	49
2.3.8	Traitement statistique.....	50
2.4	Cellules en culture.....	51
2.5	Préparation d'extraits cellulaires radiomarqués.....	51
2.6	Technique d'immunoprécipitation.....	52
2.7	Séparation des ARNs en deux dimensions.....	55
2.8	Digestion par la ribonucléase A pancréatique (RNase A).....	56
2.9	Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	56
2.10	Electrotransfert.....	58
2.11	Immunobuvardage.....	59
2.12	Purification biochimique des ribonucléo- protéines Ro.....	60
2.13	Purification d'anticorps par affinité.....	62

3. RESULTATS.....	64
3.1 Caractérisation des autoanticorps reconnaissant la ribonucléoprotéine Ro ^{hY5}	65
3.1.1 La ribonucléoprotéine Ro contenant l'ARN hY5 (Ro ^{hY5}) est immuno- précipitée de façon spécifique.....	65
3.1.2 Purification biochimique des ribonucléoprotéines Ro.....	74
3.1.3 Utilisation des ribonucléoprotéines Ro partiellement purifiées pour inhiber l'immunoprécipitation de la ribonucléoprotéine Ro ^{hY5}	77
3.1.4 Certains sera anti-Ro de référence contiennent des anticorps anti-Ro ^{hY5}	81
3.1.5 L'épitope autoantigénique spécifique aux ribonucléoprotéines Ro ^{hY5} dépend à la fois de la présence de la composante protéinique et de l'ARN hY5.....	86
3.1.6 Le déterminant antigénique présent sur les ribonucléoprotéines Ro ^{hY5} n'est présent que sur les ribonucléo- protéines Ro humaines.....	89

3.2	Caractérisation des ribonucléoprotéines Ro.....	92
3.2.1	Les ARNs Ro se dissocient de la protéine Ro de 60 kD en tampon de force ionique élevée.....	92
3.2.2	Trois populations de ribonucléo- protéines Ro peuvent être purifiées biochimiquement à partir d'extraits de cellules HeLa.....	95
3.2.3	Caractérisation des ribonucléoprotéines Ro purifiées.....	108
3.3	Signification clinique des anticorps anti-Ro.....	114
3.3.1	Etude pilote.....	114
3.3.2	Etude transversale dans la population rhumatoïde.....	121
3.3.2.1	Echantillon.....	121
3.3.2.2	Prévalence des anticorps anti-Ro.....	125
3.3.2.3	Prévalence des manifestations cibles.....	131
3.3.2.4	Traitements antirhumatismaux.....	135
4.	DISCUSSION.....	139
4.1	Des autoanticorps anti-Ro reconnaissent spécifiquement une ribonucléoprotéine Ro humaine à l'état natif.....	140

4.2	Caractérisation des ribonucléoprotéines Ro.....	148
4.3	Hétérogénéité des ribonucléoprotéines Ro et des autoanticorps anti-Ro.....	152
4.4	Signification clinique des anticorps anti-Ro: étude pilote.....	154
4.5	Signification clinique des anti-Ro dans la polyarthrite rhumatoïde.....	158
4.6	Conclusion.....	166
	REMERCIEMENTS.....	168
	REFERENCES.....	170
	ANNEXE A.....	195
	ANNEXE B.....	196

LISTE DES ILLUSTRATIONS

PAGES

- Figure 1: Des sera humains immunoprécipitent,
à partir d'un extrait de cellules
HeLa, un ARN comigrant avec l'ARN
Ro hY5 en gel de polyacrylamide.....66
- Figure 2: Fractionnement en deux dimensions
en gel de polyacrylamide des ARNs
immunoprécipités d'extraits de
cellules HeLa marquées *in vivo* à
l'aide de [³²P]orthophosphate.....69
- Figure 3: Détermination quantitative de
l'ARN hY5 par rapport aux ARNs
Ro totaux.....72
- Figure 4: Séparation biochimique des ribo-
nucléoprotéines Ro^{hY5} et Ro^{hY1-hY4}.....75

- Figure 5: Inhibition de l'immunoprécipitation des ARNs Ro radiomarqués au [^{32}P] par des fractions cellulaires non marquées enrichies soit en ribonucléoprotéines $\text{Ro}^{\text{hy}5}$ soit en ribonucléoprotéines $\text{Ro}^{\text{hy}1-\text{hy}4}$79
- Figure 6: Inhibition de l'immunoprécipitation des ARNs Ro radiomarqués au [^{32}P] par des fractions cellulaires non marquées enrichies en ribonucléoprotéines $\text{Ro}^{\text{hy}1-\text{hy}4}$82
- Tableau 1: Détection des anticorps anti- $\text{Ro}^{\text{hy}5}$ dans les sera anti-Ro.....84
- Figure 7: Immunoprécipitation d'extraits de cellules HeLa marquées *in vivo* à l'aide de [^{35}S]méthionine.....87
- Figure 8: Immunoprécipitation des ribonucléoprotéines Ro marquées au [^{32}P] à partir de plusieurs lignées cellulaires de mammifères.....90

- Figure 9: Immunoprécipitation des ribonucléoprotéines Ro à partir d'extraits de cellules HeLa maintenus dans des concentrations croissantes de NaCl.....93
- Figure 10: Purification des ribonucléoprotéines Ro sur résine échangeuse d'anion DEAE-cellulose.....97
- Figure 11: Ultracentrifugation des ribonucléoprotéines Ro à travers un gradient de sucrose.....100
- Figure 12: Chromatographie de perméation moléculaire à haute pression (HPLC) des fractions de gradient de sucrose correspondant aux pics des ribonucléoprotéines Ro.....104
- Figure 13: Purification finale des ribonucléoprotéines Ro^{hY5}.....107
- Figure 14: Immunobuvardage des protéines présentes dans les fractions contenant les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} purifiées par HPLC.....109

Figure 15:	Immunoprécipitation des ribo- nucléoprotéines Ro ^{hY5} purifiées.....	113
Tableau 2:	Etude pilote. Antinucléaires et diagnostics chez 30 patients producteurs d'anti-Ro.....	115
Tableau 3:	Etude pilote. Comparaison des patients rhumatoïdes anti-Ro positifs et anti-Ro négatifs: données cliniques.....	119
Tableau 4:	Etude pilote. Comparaison des patients rhumatoïdes anti-Ro positifs et anti-Ro négatifs: données sérologiques.....	122
Tableau 5:	Etude pilote. Comparaison des patients rhumatoïdes anti-Ro positifs et anti-Ro négatifs: traitements antirhumatismaux.....	123

Tableau 6: Etude de cohorte sur la
signification clinique des anti-Ro
dans la polyarthrite rhumatoïde.
Caractéristiques des patients
inclus et non-inclus.....126

Tableau 7: Etude de cohorte sur la
signification clinique des anti-Ro
dans la polyarthrite rhumatoïde.
Prévalence des anticorps
antinucléaires.....128

Tableau 8: Etude de cohorte sur la
signification clinique des anti-Ro
dans la polyarthrite rhumatoïde.
Caractéristiques cliniques
en fonction de l'anti-Ro.....129

Tableau 9: Etude de cohorte sur la
signification clinique des anti-Ro
dans la polyarthrite rhumatoïde.
Caractéristiques sérologiques en
fonction de l'anti-Ro.....130

Tableau 10: Etude de cohorte sur la signification clinique des anti-Ro dans la polyarthrite rhumatoïde. Prévalence des manifestations cibles en fonction de l'anti-Ro.....	133
--	-----

Tableau 11: Etude de cohorte sur la signification clinique des anti-Ro dans la polyarthrite rhumatoïde. Traitements antirhumatismaux.....	138
--	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
nADN:	Acide désoxyribonucléique double-brin (natif)
ARA:	American Rheumatism Association (maintenant American College of Rheumatology)
ARN:	Acide ribonucléique
tARN:	Acide ribonucléique de transfert
Bloc AV:	Bloc de conduction cardiaque atrio-ventriculaire
BSA:	Albumine sérique bovine
CDC:	Center for Diseases Control (Atlanta, GA)
CHUS:	Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
DE52:	Diéthylaminoéthyle cellulose
DTT:	Dithiothréitol
ELISA:	Test immunoenzymatique (Enzyme linked immuno- sorbent assay)
HLA:	Antigène leucocytaire humain (correspond au CMH humain)
HPLC:	Chromatographie liquide à haute pression
IB:	Immunobuvardage
N-IB:	Immunobuvardage en conditions non-dénaturantes (natives)
SDS-IB:	Immunobuvardage en conditions dénaturantes
ID:	Double immunodiffusion en gel d'agarose

IgG:	Immunoglobuline G
IPP:	Immunoprécipitation d'extraits cellulaires
kD:	KiloDalton
LECS:	Lupus érythémateux cutané subaigu
LED:	Lupus érythémateux disséminé
MCTD:	Mixed Connective Tissue Disease (Connectivite mixte)
PAGE:	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS:	Tampon phosphate salin
PCA:	Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique (50:50:1)
PMSF:	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PR:	Polyarthrite rhumatoïde
RNAse A:	Ribonucléase A pancréatique
RNP:	Ribonucléoprotéine
SDS:	Dodécylsulfate de sodium
SS:	Syndrome de Sjögren
TBS:	Tampon Tris-Cl salin
Th:	Lymphocyte T auxiliaire
Ts:	Lymphocyte T supprimeur
UI:	Unité Internationale
UMR:	Unité des Maladies Rhumatismales
µCi:	Microcurie
µg:	Microgramme
µL:	Microlitre

R E S U M E

Caractérisation et immunogénicité de l'autoantigène Ro et signification clinique des autoanticorps anti-Ro. Gilles Boire, Département de Sciences cliniques, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke.

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.).

La production d'anticorps dirigés contre l'autoantigène Ro, un ensemble de ribonucléoprotéines formées par l'association d'un polypeptide antigénique de 60 kiloDalton (kD) et de 4 ARNs de petit poids moléculaire (hY1, hY3, hY4, et hY5), représente l'une des manifestations sérologiques les plus fréquentes chez les patients atteints de collagénoses telles que le Lupus Erythémateux Disséminé (LED) et le syndrome de Sjögren (SS). Nous avons tenté au cours de ce travail d'aider à définir les conditions menant à la formation de ces anticorps et à raffiner leurs corrélations cliniques.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une hétérogénéité immunologique des anticorps anti-Ro qui correspond à une hétérogénéité biochimique des ribonucléoprotéines Ro. En particulier, nous avons démontré qu'une proportion significative des autoanticorps anti-Ro sont dirigés contre des déterminants antigéniques présents uniquement sur la ribonucléoprotéine contenant l'ARN hY5

(Ro^{hY5}) intacte. Ce déterminant antigénique n'est présent ni sur les composantes protéiniques (Ro ou La) et ARN (hY5) isolées, ni sur les autres ribonucléoprotéines Ro, qu'elles soient d'origine humaine ou animale. Cette population d'anti-Ro représente donc de véritables AUTOanticorps qui, de plus, reconnaissent spécifiquement des déterminants conformationnels. Dans un travail antérieur complété par Sylvie Lapointe, nous avons démontré que la majorité des sera anti-Ro contiennent des anticorps dirigés contre des déterminants conformationnels sur l'antigène Ro de 60 kD. Afin de tenir compte de ces nouvelles données, nous proposons que les stimuli conduisant à la production de certains autoanticorps impliquent une immunisation directe par un autoantigène intact.

Afin de préciser les éléments structurels ou fonctionnels qui favorisent l'immunogénicité des ribonucléoprotéines Ro^{hY5}, nous avons développé une technique de purification biochimique qui nous a permis d'obtenir et de caractériser ces ribonucléoprotéines intactes. Nous avons ainsi démontré que les ribonucléoprotéines Ro présentent un poids moléculaire apparent beaucoup plus élevé que la somme de leurs constituantes individuelles, suggérant une dimérisation de ces constituantes ou une association avec des protéines non encore caractérisées. De plus, nous avons démontré que la ribonucléoprotéine Ro^{hY5} est associée de façon stable avec la protéine La. Cette dernière observation pourrait expliquer la fréquente production concomitante des anticorps anti-Ro,

anti-Ro^{hY5}, et anti-La, et constitue un nouvel argument en faveur de l'immunogénicité de la ribonucléoprotéine Ro^{hY5} intacte.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu définir plus précisément la signification clinique de la production d'autoanticorps anti-Ro. Dans une étude pilote, nous avons observé qu'en comparaison avec un groupe de patients rhumatoïdes non producteurs d'anti-Ro appariés pour l'âge, les rhumatoïdes producteurs d'anti-Ro présentaient des caractéristiques démographiques et articulaires semblables mais présentaient une fréquence plus élevée de manifestations extra-articulaires.

Pour donner suite à ces données préliminaires, nous avons établi une étude de cohorte portant sur toute la population de patients atteints de PR soignés à l'Unité des Maladies Rhumatismales (UMR) du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). A l'aide des résultats de notre étude pilote, nous avons défini 5 manifestations cibles pré-établies: 1) développement de LED/PR, 2) manifestations vasculitiques, 3) abaissement simultané des composants C3 et C4 du complément, 4) leucopénie persistante (moins de $4.0 \times 10^9/L$) non reliée à la prise d'une médication myélotoxique, et 5) mise au monde d'un enfant atteint de lupus néonatal avec ou sans bloc atrioventriculaire cardiaque congénital (bloc AV). Nous avons ainsi établi qu'un échantillon de 292 patients (intervalle de 180 à 600 selon les hypothèses) permettrait de détecter, avec une puissance

de 80%, une différence significative à 5% entre les patients rhumatoïdes producteurs et non-producteurs d'anti-Ro.

Entre Novembre 1985 et Mai 1987, trois cent trois patients rhumatoïdes consécutifs ont été évalués, desquels 278 (91.7%) ont été inclus. Les patients inclus représentent un reflet non biaisé de la population rhumatoïde suivie par l'UMR, et présentent des caractéristiques cliniques comparables à celles d'autres populations Nord-Américaines de rhumatoïdes. Neuf patients (3.2%) produisaient des anticorps anti-Ro détectables par double immunodiffusion en gel d'agarose (ID). Ces 9 patients rhumatoïdes producteurs d'anti-Ro avaient des caractéristiques démographiques et articulaires semblables au groupe contrôle; ils présentaient toutefois plus fréquemment des manifestations de SS. Globalement, les patients producteurs d'anti-Ro avaient un risque relatif (RR) de 7.87 ($p \leq 0.001$) de présenter l'une ou l'autre des manifestations cibles, notamment un abaissement simultané de C3 et de C4 (RR 2.30), une leucopénie en cours d'évolution (RR 6.64) et du purpura non thrombocytopénique de type vasculite leucocytoclasique (RR 44.83). Seuls des patients producteurs d'anti-Ro ont donné naissance à un enfant atteint de bloc AV (1 patiente) et développé un syndrome de chevauchement LED\PR caractérisé par le développement d'un lupus érythémateux cutané subaigu (LECS) (1 patient). De façon intéressante, les patients producteurs d'anti-Ro avaient aussi un risque plus élevé de présenter une photosensibilité marquée (RR 19.93) et d'être traités

avec des doses élevées de corticostéroïdes et/ou avec des immunosuppresseurs (RR 2.37). Compte tenu de l'hétérogénéité biochimique et immunologique que nous avons démontrée dans le système Ro/anti-Ro, nos résultats obtenus par la technique relativement peu sensible de l'ID pourraient être raffinés par l'utilisation de techniques de détection plus sophistiquées.

Notre travail ouvre de larges possibilités de recherche fondamentale pour définir les caractéristiques structurelles et fonctionnelles qui déterminent l'immunogénicité de l'autoantigène Ro. De même, il devient possible de définir la sensibilité et la spécificité de nouvelles techniques pour la détection des anti-Ro ainsi que d'établir leur utilité clinique éventuelle. C'est dans cette voie que nous sommes maintenant engagés.

NOTE CONCERNANT LES PUBLICATIONS ANTERIEURES

Une partie importante des résultats rapportés dans ce mémoire a déjà fait l'objet de publications. Nous détaillons dans la présente liste les illustrations (Figures et Tableaux) faisant partie de ces publications. Ces illustrations ont toutefois été traduites et adaptées avant d'être intégrées au Mémoire.

Figures 1 à 8 et Tableau 1

Boire G. & Craft J. (1989) Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. Analysis with sera specific for the Ro^{hY5} particle. J. Clin. Invest. 84; 270-279.

Figures 9 à 15

Boire G. & Craft J. (1990) Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. J. Clin. Invest. 85; 1182-1190.

Tableaux 2 à 5

Boire G. & Ménard H.A. (1988) Clinical significance of anti-Ro(SSA) antibody in rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 15; 391-394.

INTRODUCTION

Mon intérêt pour le système antigène\anticorps Ro\anti-Ro a débuté en cours de formation clinique de rhumatologie à l'Université de Sherbrooke (1983-1985). J'avais alors étudié la signification clinique des autoanticorps détectés dans le laboratoire d'Immuno-rhumatologie du Dr Henri-A. Ménard. Nous avons observé, d'une part, qu'une proportion relativement élevée (33%) de nos patients producteurs d'anti-Ro souffraient de polyarthrite rhumatoïde (PR), et d'autre part que ces derniers souffraient fréquemment de manifestations extra-articulaires sévères. J'ai voulu donner suite à cette étude pilote en établissant une étude de cohorte de notre population de rhumatoïdes, cette fois avec un nombre plus adéquat de patients et un meilleur contrôle des biais.

Entre temps, j'avais porté mon attention sur les aspects plus fondamentaux de la réponse autoimmune anti-Ro. J'ai d'abord amorcé une étude des sous-populations d'anticorps anti-Ro, mettant en évidence des anticorps reconnaissant de façon spécifique des déterminants conformationnels sur la protéine Ro de 60 kilodalton (kD). Cette étude a par la suite été complétée par Sylvie Lapointe qui en a fait le sujet de son mémoire de maîtrise "Des autoanticorps reconnaissent des déterminants conformationnels de la protéine Ro(SS-A)" déposé en Février 1990. A partir de Juillet 1987 et jusqu'en Juin 1989, j'ai poursuivi ma formation post-doctorale à l'Université Yale de New Haven, Connecticut, en étudiant l'autoantigène Ro intact et la

réponse autoimmune dirigée contre lui. J'ai pu ainsi démontrer une hétérogénéité au sein des ribonucléoprotéines Ro ainsi que des autoanticorps qui les reconnaissent. Ces travaux n'ont pour l'instant pas porté sur les corrélations cliniques de ces nouvelles populations d'anticorps. L'évaluation de l'apport que ces acquis technologiques apporteront à la clinique reste donc à définir.

Ce long cheminement explique l'aspect "bicéphale" de mon mémoire. Dans un premier temps, j'y ai rapporté les résultats de mes recherches en biochimie et en immunologie fondamentales. Dans un deuxième temps j'y ai présenté les résultats d'études évaluant la signification clinique des anticorps anti-Ro dans une population de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Ces deux approches représentent toutefois des éléments complémentaires. La définition plus exacte des sous-populations d'anticorps anti-Ro pourrait en effet permettre l'identification de meilleurs marqueurs sérologiques. De plus, en filigrane de ce travail, se trouve la recherche d'une réponse à deux questions importantes. Tout d'abord, quels sont les facteurs qui conduisent certains malades à perdre sélectivement leur tolérance envers une composante mineure de la cellule humaine? Ensuite, quelle est la relation entre la production de ces autoanticorps et les processus pathogéniques qui conduisent à la maladie? Bien que nous n'apportions de réponse définitive à aucune de ces questions, nous espérons que

notre contribution aura permis d'avancer, même de façon minime, dans la bonne direction.

1.1 Système immunitaire

Le système immunitaire a la responsabilité de reconnaître et de détruire une multitude d'agresseurs tant exogènes qu'endogènes. Le développement d'une réponse spécifique à un agresseur aussi bien que la distinction du soi et du non-soi sont la responsabilité de cellules spécialisées, les lymphocytes T et B (Nossal, 1983). Ces cellules reconnaissent les antigènes à l'aide de récepteurs présents à leur surface, chaque cellule portant un seul type de récepteur (Nossal et Lederberg, 1958; Hozumi et Tonegawa, 1976; Yanagi et al., 1984; Hedrick et al., 1984). Quoique les récepteurs sur les différentes populations de lymphocytes partagent des éléments structurels similaires, les lymphocytes B et les lymphocytes T reconnaissent les antigènes de façon radicalement différente (voir plus bas). Avant d'aborder le problème des dysfonctions conduisant au développement de réactions autoimmunes, il convient d'établir d'abord les grandes lignes du fonctionnement de la réponse immune "normale". Il convient aussi de rappeler le rôle essentiel joué par les récepteurs de surface des lymphocytes B, et en particulier leur prédilection pour des déterminants conformationnels, dans la sélection des clones

qui se différencieront en plasmocytes et en cellules-mémoire (Nossal, 1987; Germain, 1986; Lanzavecchia, 1985).

1.1.1 Définitions

1.1.1.1 Antigène

Un antigène est toute substance contre laquelle l'organisme peut développer une réponse immunitaire. Bien que les antigènes soient généralement des protéines, l'organisme peut reconnaître comme antigénique pratiquement n'importe quelle molécule complexe. Certaines molécules simples, par exemple certains métaux, peuvent devenir antigéniques par suite de leur combinaison avec des protéines propres à l'hôte qui sont ainsi modifiées. De telles molécules simples qui ne sont pas antigéniques en elles-mêmes mais qui peuvent le devenir par suite de leur interaction avec des protéines complexes sont appelées haptènes.

1.1.1.2 Epitope

La région d'un antigène qui interagit avec un anticorps ou avec un récepteur à la surface d'un lymphocyte est définie comme un épitope (Benjamin et al, 1984). Un épitope n'est pas une propriété intrinsèque d'une structure particulière, mais est définie par référence au site de son interaction avec le récepteur. Un épitope peut être consti-

tué de structures continues (linéaires) ou discontinues (conformationnelles).

1.1.1.3 Anticorps

Les anticorps appartiennent à une famille de glycoprotéines qui partagent des caractéristiques structurales et fonctionnelles (Harlow et Lane, 1988). Ils sont définis par leur capacité d'interagir de façon spécifique avec un épitope présent sur un antigène donné. L'interaction antigène-anticorps est noncovalente et réversible. La force de l'interaction entre un épitope et un anticorps est définie par la constante d'affinité. Cette affinité varie de 10^5 mol^{-1} à plus de 10^{12} mol^{-1} . Des sera polyclonaux contiennent des mélanges d'anticorps de différentes affinités. Des techniques de détection comme l'immunobuvardage ou les tests immunoenzymatiques en phase solide (e.g. ELISA) sont capables de détecter des anticorps de plus faible affinité, alors que l'immunoprécipitation requiert habituellement des anticorps de plus forte affinité.

1.1.1.4 Tolérance

La tolérance immunitaire représente un état de non-réactivité spécifique du système immunitaire face à un antigène, requérant dans son développement un contact préalable avec lui (Theofilopoulos, 1987).

1.1.2 Caractéristiques de la réponse immune.

Pour donner lieu à une réponse immune, trois conditions doivent être remplies (Nossal, 1989). Premièrement, les substances antigéniques doivent être reconnues par des récepteurs spécifiques présents sur la surface de cellules lymphocytaires. La probabilité de cette reconnaissance est grandement augmentée par un mécanisme de recombinaison somatique des gènes codant pour les récepteurs membranaires. Les mécanismes impliqués dans le développement de cette diversité ont été le sujet de diverses revues (Tonegawa, 1983; Hedrick, 1984). Chaque lymphocyte porte à sa surface un seul type de récepteur provenant d'une seule recombinaison de gènes (Nossal et Lederberg, 1958; Hozumi et Tonegawa, 1976).

Deuxièmement, à l'exception de certains antigènes appelés T-indépendants, le développement d'une réponse immune implique une collaboration entre les lymphocytes T et les lymphocytes B (Kurt-Jones et al., 1988) et\ou entre les lymphocytes T et des cellules capables de présenter l'antigène, principalement les macrophages et les lymphocytes B (Nossal et al., 1968).

Troisièmement, un antigène doit induire les lymphocytes spécifiques pour cet antigène à quitter l'état de repos cellulaire appelé G_0 et à entreprendre une série de mitoses. Ce mécanisme de sélection clonale donne naissance à une po-

pulation de cellules effectrices de la réponse immune. Ces cellules peuvent être des cellules T cytotoxiques, des cellules T auxiliaires (Th), des cellules T suppressives (Ts), ou des plasmocytes producteurs d'anticorps, mais toutes sont spécifiques pour l'antigène ayant causé l'activation de la cellule initiale. Le processus de sélection clonale n'est pas déclenché par la simple interaction de l'antigène avec l'un de ses récepteurs. Il implique plutôt l'interrelation de multiples récepteurs présents sur des cellules différentes, l'action de cytokines qui sont des facteurs de différenciation et de croissance, et probablement d'autres signaux dépendant de certains contacts intercellulaires (Zubler et al., 1987; Sanders et al., 1986). La complexité des signaux nécessaires à la mise en marche de l'activation clonale représente une composante majeure de l'immunorégulation (Nossal, 1983).

1.1.3 Présentation de l'antigène

1.1.3.1 Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) appartiennent à deux groupes de glycoprotéines: les molécules de Classe I et les molécules de Classe II. Leur structure générale rappelle celle des immunoglobulines; ces dernières sont probablement dérivées des molécules du CMH au cours de l'évolution. L'ensemble

des molécules de ce type (incluant entre autres les récepteurs à la surface des lymphocytes T) est maintenant regroupé sous le vocable de "superfamille des immunoglobulines". Les molécules de Classe I sont présentes à la surface de toutes les cellules nucléées, alors que les molécules de Classe II ne sont présentes que sur les cellules présentant les antigènes, telles que les macrophages et les lymphocytes B (Shimonkevitz et al., 1983). La plupart des antigènes intacts ne semblent pas pouvoir s'associer aux molécules du CMH (Unanue, 1984; Sette et al., 1989), bien que cela semble occasionnellement le cas (Sette et al., 1989). Pour pouvoir s'y associer, les antigènes protéiniques doivent être soit dénaturés soit dégradés sous forme d'oligopeptides. Puisque seuls quelques oligopeptides dérivant d'un antigène donné sont capables d'interagir avec une molécule CMH donnée, la plus grande partie d'une protéine antigénique reste invisible aux cellules T (Melms et al., 1989). Il existe donc la possibilité, rare dans les espèces non consanguines, qu'aucun oligopeptide dérivé d'un antigène donné ne puisse interagir avec les molécules CMH présentes sur les cellules présentatrices d'antigène de l'individu. Ceci conduirait à un état de "tolérance" résultant de l'incapacité de reconnaître l'antigène, état qui diffère de la tolérance acquise durant l'ontogénie du système immunitaire et responsable de la distinction du soi et du non-soi.

1.1.3.2 Association avec les molécules CMH de classe I

Les molécules CMH de classe I sont constituées d'une chaîne lourde repliée en trois domaines globulaires associée à une molécule de β_2 -microglobuline. Il semble que par un mécanisme qui n'est pas encore tout à fait élucidé, les antigènes intracellulaires (qu'ils soient autologues ou hétérologues, e.g. une protéine virale) sont dégradés dans un compartiment cellulaire non lysosomal et produisent des oligopeptides qui sont capables de s'associer avec les molécules de classe I (Parham, 1989). Le complexe CMH-oligopeptide migre alors vers la surface cellulaire où il devient accessible aux cellules T. L'association avec un oligopeptide semble être nécessaire pour permettre la migration de la molécule CMH à la surface cellulaire (Townsend et al., 1989).

1.1.3.3 Association avec les molécules CMH de classe II

Les molécules CMH de classe II sont des hétérodimères constitués d'une chaîne α et d'une chaîne β . Les antigènes extracellulaires sont phagocytés par la cellule et dégradés dans le compartiment lysosomal. L'interaction des oligopeptides qui en dérivent avec les molécules CMH semble là aussi se produire intracellulaire-

ment avant la migration de la molécule CMH à la surface de la cellule, quoique la présence de molécules CMH disponibles pour interagir avec un oligopeptide extracellulaire soit bien établie (Babbitt et al., 1985; Benacerraf, 1988). Les protéines autologues semblent pouvoir être digérées intracellulairement de façon constante et semblent également être présentées d'une façon similaire à celle de protéines étrangères à l'organisme (Lorenz et Allen, 1988).

1.1.4 Reconnaissance antigénique

1.1.4.1 Lymphocytes T

Les récepteurs des cellules T ne reconnaissent les antigènes que lorsqu'ils sont présentés à la surface d'autres cellules en association avec une molécule du CMH (Unanue, 1984). L'attachement à une cellule présentatrice par l'intermédiaire d'une molécule CMH porteuse d'un oligopeptide que le lymphocyte T reconnaît rend cette cellule susceptible à l'action de médiateurs solubles tels que les interleukines 1 et 2 (IL-1 et IL-2). En réponse à la stimulation par ces interleukines, les lymphocytes T prolifèrent et se différencient. L'ensemble de ce système de régulation permet une amplification rapide de lymphocytes Th en réponse à une stimulation antigénique tout en conservant une spécificité très élevée.

1.1.4.2 Lymphocytes B

L'ADN génomique contient un nombre élevé de gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des anticorps. Avant même leur exposition à tout antigène extérieur, de nombreuses cellules B formant un vaste répertoire préimmun sont produites par un processus qui implique des recombinaisons et des mutations aléatoires de ces gènes chez les précurseurs des lymphocytes B (Tonegawa, 1983). Des cellules B différenciées produisent des anticorps IgM et IgD qui se localisent à leur surface et n'expriment qu'une seule spécificité par cellule. Les anticorps sécrétés par suite de l'activation du lymphocyte B auront la même spécificité que les anticorps présents à la surface de la cellule, mais pourront appartenir à l'une ou l'autre des 5 classes d'immunoglobulines (i.e. IgM, IgG, IgA, IgD, ou IgE) par suite d'un processus de changement d'isotype ("class-switching"; French et al., 1989).

1.1.4.3 Production des anticorps: interaction entre lymphocytes T et B.

Les lymphocytes B semblent être capables de digérer un antigène de façon similaire aux autres cellules présentatrices d'antigènes. Le lymphocyte B présente toutefois un avantage considérable puisque son interaction avec l'antigène est spécifique. En effet, seuls les antigènes

capables de se complexer aux anticorps de surface seront internalisés dans les lymphocytes B (Chestnut et Grey, 1981; Rock et al., 1984). Le complexe formé par un oligopeptide dérivé de l'antigène et des molécules CMH de Classe II sur les lymphocytes B est identique au complexe formé à la surface d'autres cellules présentatrices. Il semble donc que les mêmes lymphocytes Th déjà stimulés après leur interaction avec une autre cellule présentatrice puissent maintenant s'attacher au lymphocyte B et déclencher le mécanisme de sélection clonale conduisant à la formation de plasmocytes producteurs d'anticorps et de cellules B mémoire capables de reconnaître l'antigène lors d'une exposition subséquente et d'y répondre de façon plus rapide (Nossal, 1968).

Pour résumer, la régulation de la production des anticorps repose en grande partie sur la nécessité d'une interaction entre les lymphocytes B et les lymphocytes Th (Nossal, 1968). Pour qu'il induise la formation d'anticorps, un antigène doit d'abord avoir un épitope qui peut s'attacher à un anticorps à la surface d'un lymphocyte B et ensuite, lors de sa dégradation intracellulaire, donner naissance à au moins un fragment qui peut s'attacher à une molécule CMH de Classe II et donner ainsi naissance à un complexe reconnaissable par le récepteur d'un lymphocyte Th. Puisque l'attachement sur la molécule CMH de classe II se fait par l'intermédiaire de produits de dégradation de l'antigène, le site responsable de cette interaction peut ne

pas être exposé sur l'antigène intact (Harlow et Lane, 1988). Toutefois, seuls les épitopes qui sont présents à la surface de l'antigène intact peuvent s'attacher aux lymphocytes B et induire la production d'anticorps. Il en résulte que les anticorps produits en réponse à une immunisation avec des antigènes natifs reconnaissent fréquemment des déterminants antigéniques natifs ou conformationnels puisque ce sont là les déterminants accessibles aux lymphocytes B (Benjamin et al., 1984). Pour la même raison, les anticorps produits en réponse à une immunisation avec des antigènes dénaturés reconnaissent habituellement des séquences continues d'acides aminés. Cette notion est particulièrement importante compte tenu que l'essentiel de notre travail porte sur la reconnaissance d'un antigène natif par les autoanticorps anti-Ro.

1.2 Tolérance et autoimmunité

Les mécanismes qui peuvent empêcher des clones de lymphocytes spécifiques contre le soi de réagir contre des molécules autologues ont été résumés par Nossal (Nossal, 1983). Premièrement, les clones spécifiques pour des molécules autologues peuvent être éliminés pendant la formation de l'organisme (ontogénie). Deuxièmement, des lymphocytes T suppresseurs (Ts) peuvent supprimer les clones de lymphocytes autoréactifs, soit en reconnaissant directement un antigène donné, soit en reconnaissant des récepteurs spé-

cifiques pour l'antigène présents sur les cellules autoréactives. Troisièmement, un réseau d'anticorps anti-idiotypes peut prévenir la prolifération des clones autoréactifs. Quatrièmement, la dégradation d'antigènes autologues pourrait donner naissance à des oligopeptides non immunogéniques qui pourraient inhiber de façon compétitive l'interaction des oligopeptides immunogéniques dérivés des antigènes autologues avec les récepteurs des lymphocytes T. Cinquièmement, les antigènes autologues pourraient être contenus dans des structures auxquelles les lymphocytes n'ont normalement pas accès, par exemple l'intérieur de l'oeil ou des cordons spermatiques. Sixièmement, les gènes codant pour les régions variables des immunoglobulines autoréactives peuvent avoir été éliminés au cours de l'évolution de l'espèce (phylogenèse) ou au cours de la formation de l'individu (ontogenèse) (modèle de Jemmerson et Margoliash). Chacun de ces mécanismes repose sur des preuves expérimentales, et il est probable que tous contribuent, à des degrés divers, à l'établissement de la tolérance.

L'élimination des clones autoréactifs semble être beaucoup plus efficace dans le cas des lymphocytes T que dans celui des lymphocytes B. En effet, des clones de lymphocytes B reconnaissant l'ADN dénaturé ou ayant une activité facteur rhumatoïde (FR) peuvent être isolés à partir d'individus tant malades que normaux (Ohosone et al., 1986; Cairns et al., 1986; Bell et al., 1987). Les anticorps alors produits sont habituellement de classe IgM, de faible

affinité, et polyspécifiques. Cette constatation suggère que les lymphocytes B qui présentent une faible affinité pour des antigènes autologues ne sont pas complètement éliminés du répertoire immunitaire. La maturation de ces clones autoréactifs semble toutefois normalement bloquée par un mécanisme de suppression active. Des autoanticorps naturels tels que les FRs et les anticorps anti-ADN pourraient même avoir des fonctions de régulation de la réponse à un stimulus antigénique, et pourraient faciliter l'élimination des complexes immuns et des autoantigènes libérés dans le serum après la lyse cellulaire (Carroll et al, 1985; Levinson et Martin, 1988).

Jemmerson et Margoliash (Benjamin et al., 1984; Jemmerson et Margoliash, 1979) ont observé que lors de l'utilisation d'un antigène dérivé d'une espèce apparentée pour immuniser un animal (e.g. cytochrome c de la souris chez le rat), les autoanticorps élicités reconnaissent préférentiellement les régions de l'antigène qui diffèrent de l'autoantigène. Ils ont donc suggéré que les autoanticorps induits par immunisation ont tendance à reconnaître des épitopes qui sont instables au cours de l'évolution. Ce modèle suggère qu'aux mécanismes d'élimination ou de "tolérisation" des clones de lymphocytes autoréactifs survenant au cours du développement de l'individu s'ajouterait un mécanisme de délétion phylogénique par lequel les gènes codant pour les régions variables des immunoglobulines correspondant à des anticorps autoréactifs seraient préféren-

tiellement éliminés. Toutefois, une fois que la tolérance pour un autoantigène est brisée et que le système immunitaire a commencé à y répondre, des mutations somatiques survenant dans les clones autoréactifs conduiraient à une diversification de la réponse immune à cet antigène. Le répertoire des autoanticorps s'étendrait donc progressivement pour reconnaître d'autres portions de l'autoantigène qui présentent les propriétés requises (Benjamin, 1984).

1.3 Autoanticorps et collagénoses

Les collagénoses sont des maladies d'étiologie inconnue caractérisés par des signes de dérèglement immunitaire. Ces maladies ont été regroupées en grands syndromes cliniques à l'aide de critères diagnostiques établis par consensus (Schumacher, 1988). La plus fréquente des collagénoses est la polyarthrite rhumatoïde (PR), qui touche de 0.3 à 1.5% de la population âgée de plus de 18 ans (Hochberg, 1988). Viennent ensuite le Lupus érythémateux disséminé (LED) et le syndrome de Sjögren primaire (SS) qui affectent chacun entre 0.05 et 0.10% de la population. Enfin, la sclérodermie et les myopathies inflammatoires auraient chacune une prévalence d'environ 0.01%. L'un des éléments permettant de regrouper ces syndromes aux manifestations cliniques variées est la présence, dans le serum de la majorité des patients, d'anticorps (ou autoanticorps) dirigés contre des composantes intracellulaires (Hardin et Mimori, 1985; Tan,

1989). Le serum de sujets normaux ne contient habituellement pas de niveaux détectables de ces autoanticorps.

Au total, les autoantigènes reconnus par les patients atteints de collagénoses sont très nombreux et se retrouvent tant dans le cytoplasme que dans le noyau et les nucléoles. Plusieurs observations suggèrent que la production des autoanticorps n'obéit pas au hasard (Hardin et Mimori, 1985; Tan, 1989). Premièrement, des milliers d'autoantigènes potentiels sont présents dans une cellule de mammifère, mais seul un nombre restreint (de 10 à 20 environ) semblent être reconnus avec une fréquence mesurable. Deuxièmement, les autoanticorps qui reconnaissent un antigène donné ont tendance à ne se retrouver que chez des patients souffrant d'une maladie donnée. Par exemple, seuls les patients atteints de LED produisent des anticorps dirigés contre l'ADN double brin (nADN) ou contre une ribonucléoprotéine appelée Sm (Notman et al., 1975). De même, les anticorps anti-Scl 70 (dirigés contre l'enzyme topoisomérase I de l'ADN) et les anticorps reconnaissant l'enzyme tARN^{his} synthétase ne sont respectivement retrouvés que chez les patients atteints de sclérodermie et de polymyosite. D'autres autoanticorps présentent des associations cliniques moins strictes mais représentent néanmoins une aide diagnostique, e.g. anti-RNP et connectivite mixte (MCTD) [Sharp et al, 1972], anti-centromère et sclérodermie de forme limitée (CREST) [Fritzler et al, 1980], et anti-SS-A (Ro) et anti-SS-B (La)

et syndrome de Sjögren (SS) primaire et anti-SS-C/RAP et polyarthrite rhumatoïde avec SS secondaire [Alspaugh et al, 1976]. Troisièmement, un patient donné ne produit habituellement des autoanticorps que contre un nombre restreint d'autoantigènes (de 1 à 5 environ). Quatrièmement, certains autoanticorps de spécificité donnée (e.g. anti-Sm et anti-U1 RNP) ne semblent pas être produits de façon indépendante mais reconnaissent des antigènes qui sont retrouvés *in vivo* en association à l'intérieur de complexes macromoléculaires (Reeves et al., 1985; Eisenberg, 1985; Wolin et al, 1983; Reeves et Stoege, 1989).

Ces observations suggèrent que les autoantigènes eux-même pourraient jouer un rôle direct dans la production des autoanticorps. Une part importante de la recherche moderne en immunologie clinique a donc étudié les caractéristiques et les propriétés des autoantigènes pouvant être responsables de leur immunogénicité. Il est d'ailleurs possible que la compréhension des mécanismes conduisant à la production des autoanticorps pourrait éventuellement permettre la compréhension des mécanismes pathogéniques sous-jacents aux collagénoses. Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier la réponse autoimmune dirigée contre l'autoantigène Ro, en partie à cause de sa prévalence relativement élevée, et en partie à cause de ses associations cliniques étroites et importantes. La contribution de certaines de ses propriétés à l'immunogénicité de l'antigène Ro paraît d'autant plus probable que celui-ci n'est qu'une composante mineure de la

cellule, représentant moins de 0.05% des protéines solubles (Yamagata et al., 1984).

1.4 Maladies autoimmunes et autoanticorps anti-Ro

Les anticorps anti-Ro sont retrouvés chez environ 30% des patients avec LED et chez 50 à 80% des patients atteints de SS primaire (Tan, 1989; Harley et al, 1986; Reichlin, 1986). De plus, ces autoanticorps sont fortement associés au lupus néonatal accompagné ou non de bloc cardiaque atrioventriculaire congénital (bloc AV) (Scott et al, 1983; Watson et al., 1984). Ils sont en effet détectables chez presque 100% des mères qui donnent naissance à ces enfants. Les anti-Ro maternels sont transportés à travers le placenta et sont détectables de façon transitoire dans le serum des enfants atteints. Les troubles de conduction cardiaque semblent résulter d'un dommage irréversible survenu *in utero*. Par contre, les manifestations cutanées du lupus néonatal sont habituellement transitoires et suivent de façon grossièrement parallèle les niveaux sériques d'anti-Ro maternels. Toutefois, seule une minorité des mères productrices d'anti-Ro donneront naissance à des enfants atteints de lupus néonatal. De même, une mère ayant donné naissance à un enfant atteint de bloc AV ne donnera naissance que dans environ 25% des cas à un enfant atteint de lupus néonatal (avec ou sans bloc AV) lors de grossesses subséquentes (Watson et al., 1984). Une grande proportion

des producteurs d'anti-Ro sont porteurs des antigènes d'histocompatibilité HLA DR2 et DR3 (Harley et al., 1986; Arnett et al., 1989). Les mères productrices d'anti-Ro dont les enfants sont atteints de lupus néonatal ont une fréquence élevée de HLA DR3, cependant que les mères productrices d'anti-Ro dont les enfants sont normaux ont une fréquence élevée de HLA DR2. Les enfants atteints, toutefois, ne démontrent aucune association avec les antigènes HLA (Watson et al., 1984). Il semble donc que la production des anti-Ro soit modulée par les antigènes HLA, mais que la susceptibilité à l'expression du lupus néonatal soit modulée par d'autres gènes ou par des éléments non génétiques.

Les anti-Ro représentent aussi l'anomalie sérologique la plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de lupus erythémateux cutané subaigu (LECS) (Sontheimer et al., 1982) et de syndromes d'allure lupique associés à des déficiences en composantes de la voie classique du complément (Meyer et al., 1985). Ils sont en effet retrouvés chez plus des deux tiers de ces patients lorsque la technique relativement peu sensible d'immunodiffusion en gel d'agarose (ID) est utilisée. De plus, la présence d'anticorps anti-Ro caractérise le groupe de patients avec SS (primaire et secondaire) le plus à risque de développer des manifestations extra-glandulaires de type vasculitique ou de type atteinte du système nerveux central (Alexander et al., 1983). Les anticorps anti-Ro se retrouvent également chez une forte proportion de patients avec collagénoses "non

classifiées" (Scopelitis et al., 1985) et à l'occasion dans la sclérodermie ou la cirrhose biliaire primitive. Les anti-Ro sont rares chez l'individu normal, quoiqu'à l'aide d'une technique ELISA très sensible de faibles titres d'anti-Ro ont pu être détectés chez 5 à 10% des individus considérés normaux (Gaither et al., 1987).

La présence des anti-Ro dans le serum de patients avec des manifestations cliniques très différentes semble entrer en contradiction avec l'étroite corrélation entre ces anticorps et certaines manifestations cliniques. L'existence de différences qualitatives entre les anti-Ro produits par différents patients a été suggérée (Reichlin, 1986), certains anticorps pouvant être pathogéniques et d'autres pas.

La majorité des patients atteints de LED et de SS et producteurs d'anti-Ro montrent des signes d'hyperactivité immune (Alexander et al., 1983; Bell et al., 1984), tels que de l'hypergammaglobulinémie ou des complexes immuns circulants élevés, et produisent un FR de façon fréquente et à titres élevés. Cette observation pourrait être reliée à la démonstration récente qu'une fraction des anti-Ro reconnaissent la portion Fc de l'IgG (Mamula et al., 1987). Par ailleurs, les anticorps anti-La (dirigés contre un polypeptide de 48 kD qui est associé de façon transitoire à tous les ARNs transcrits par l'ARN polymérase III) (Gottlieb et Steitz, 1989) sont rarement produits sans la production concomitante d'anti-Ro en quantités suffisantes pour être détectables par technique Elisa (Harley et al., 1986;

Reichlin, 1986; Hamilton et al, 1988; Arnett et al, 1989), cependant que les anticorps anti-Ro sont fréquemment retrouvés seuls, non accompagnés par d'autres autoanticorps (Hardin et Mimori, 1985; Reichlin, 1986; Tan, 1989).

1.5 Anti-Ro et polyarthrite rhumatoïde

La prévalence des anticorps anti-Ro dans la PR reste mal définie. Lorsque détectés par les techniques d'ID ou de contre-immunoelectrophorèse, ils ne sont retrouvés que chez 1 à 3% des patients. Une prévalence de 10 à 15% chez les rhumatoïdes suivis dans un centre universitaire du Nord de la Grèce a toutefois été rapportée (Moutsopoulos et al., 1985). Il n'est toutefois pas clair si cette prévalence élevée provient de différences génétiques de cette population (Skopouli et al., 1988) ou plus simplement d'un biais de l'échantillon testé.

La faible prévalence des anti-Ro parmi les patients atteints de PR a conduit à négliger l'étude de ce groupe de patients. Toutefois, un calcul simple permet de démontrer qu'il s'agit d'une erreur. Les patients atteints de PR sont en effet 10 à 30 fois plus nombreux que les patients atteints de LED ou de SS. Une prévalence d'anti-Ro de l'ordre de 3 à 5% chez les PR en ferait l'un des groupes quantitativement les plus importants parmi les patients producteurs de ces anticorps. Jusqu'à présent, seule l'étude grecque de Moutsopoulos a suggéré que les patients avec PR producteurs

d'anti-Ro présenteraient plus fréquemment des manifestations occultes de SS et démontreraient surtout une incidence plus élevée d'effets secondaires lors d'un traitement à la D-pénicillamine. A notre connaissance, aucune étude systématique de cette population de malades n'a été rapportée. Toutefois, suite à la publication d'un résumé où nous rapportions 2 patientes souffrant de PR et productrices d'anti-Ro ayant développé un LECS (Boire et Ménard, 1986), cette association a été confirmée chez 3 autres patients (Cohen et al., 1986). Nous avons pu démontrer que nos 2 patientes initiales, tout comme un troisième identifié par la suite (Boire et Ménard, 1988), avaient d'abord développé un tableau de PR et des anticorps anti-Ro avant de développer leur tableau de LECS puis de LED. De plus, les anti-Ro présents chez ces patients présentaient un comportement immunochimique différent des anti-Ro usuels (Boire et Ménard, 1989). Il semble donc que la production d'anti-Ro particuliers pourrait caractériser les patients rhumatoïdes susceptibles de développer un LECS et/ou un LED.

1.6 Hétérogénéité des anticorps anti-Ro

L'existence de différentes catégories d'anticorps reconnaissant l'antigène Ro a d'abord été mise en évidence par l'observation que les anticorps présents dans des sera donnant une ligne d'identité en ID pouvaient être dirigés contre un polypeptide de 60 kD ou contre un polypeptide de 52

kD lorsque testés en immunobuvardage (IB) (Ben-Chetrit et al., 1988). Par la suite, un troisième polypeptide de 54 kD reconnu par les anticorps contenus dans des sera anti-Ro a été identifié (Rader et al., 1989). Tout récemment, un polypeptide de 48 kD mais migrant de façon aberrante en gel de polyacrylamide comme une protéine de 60 kD, appelé cal-réguline, lui aussi reconnu par des sera anti-Ro, a été cloné et caractérisé (McCauliffe et al., 1990). Tous ces polypeptides semblent capables de former un complexe avec les ARNs Ro puisque des anticorps reconnaissant chacun de ces polypeptides immunoprécipitaient les ribonucléoprotéines Ro à partir d'extraits de cellules humaines en culture.

Un deuxième niveau d'hétérogénéité fut suggéré par l'observation que l'antigène Ro non dénaturé était reconnu par des dilutions de sera cent fois plus grandes que l'antigène dénaturé (Rosario et al., 1988). Récemment, nous avons observé que la plupart des sera anti-Ro contiennent des anticorps qui sont dirigés contre des déterminants présents sur l'antigène Ro natif mais absents en immunobuvardage utilisant l'antigène Ro dénaturé par traitement au SDS (Boire et al., 1988; Lapointe, 1990). Certains sera semblaient d'ailleurs ne contenir que des anticorps reconnaissant l'antigène Ro natif.

Troisièmement, dans des expériences d'inhibition en ELISA, le groupe de Reichlin a démontré que les polypeptides Ro et La humains sont plus efficaces pour détecter les autoanticorps humains que ne le sont les polypeptides corres-

pondants provenant d'animaux (Rader et al., 1989). Ceci suggère que les anticorps anti-Ro et anti-La seraient de véritables autoanticorps et seraient dirigés de façon préférentielle contre des déterminants spécifiquement humains. Cette dernière observation vient confirmer nos propres observations.

1.7 Rôle pathogénique des autoanticorps

Il est improbable que des anticorps puissent entrer dans une cellule vivante et perturber des fonctions intracellulaires essentielles, quoiqu'un tel mécanisme aie été suggéré dans le cas des anticorps anti-RNP (Alarcon-Segovia et al., 1979). Plus récemment, il a été suggéré que certains autoantigènes pourraient être exprimés à la surface cellulaire sous certaines conditions, et ainsi être reconnus par les anticorps circulants (LeFeber et al., 1984; Norris et al., 1984; Furukawa et al., 1988). Il est également possible que les autoanticorps puissent jouer un rôle indirect en formant des complexes immuns soit dans le serum (amenant l'activation du complément lors de leur déposition dans les tissus) ou directement dans les tissus. Ceci représente le mécanisme suggéré pour la contribution des anticorps anti-ADN à la pathogénèse de la néphrite lupique (Koffler et al., 1974).

1.8 Rôle pathogénique des anticorps anti-Ro

Différents éléments suggèrent que les anticorps anti-Ro pourraient être directement pathogéniques. Tout d'abord, la présence d'anti-Ro est constante dans le serum des mères d'enfants atteints de lupus néonatal; aucun autre autoanticorps, à l'exception des anti-La, n'est habituellement détectable dans ces sera (Watson et al., 1984). De même, les manifestations cutanées et hématologiques du lupus néonatal sont surtout marquées à la naissance ou juste après, et disparaissent habituellement vers 3 à 6 mois, suivant la courbe de la clairance des IgG maternelles. Deuxièmement, une fraction des enfants avec lupus néonatal souffre aussi d'un bloc AV congénital. On a observé des dépôts d'immunoglobulines maternelles dans le tissu cardiaque d'enfants décédés des suites de l'atteinte cardiaque du lupus néonatal (Deng et al., 1987). Comme les anticorps anti-Ro ne semblent pas être cardiotoxiques chez l'adulte, il est possible que l'expression de l'antigène Ro soit différente dans le coeur foetal, ou encore que le coeur en croissance soit plus susceptible aux dommages causés par une atteinte immunologique. Troisièmement, les anticorps anti-Ro se retrouvent chez plus des deux tiers des patients souffrant de LECS, une maladie exacerbée par l'exposition à la lumière (Sontheimer et al., 1982). Or les anticorps anti-Ro sont capables de se fixer à la surface de kératinocytes exposés à des radiations ultraviolettes (LeFeber et al.,

1984) ou incubés dans un milieu contenant de l'estradiol (Furukawa et al., 1988). Cette observation suggère que sous certaines conditions l'antigène Ro pourrait être exprimé à la surface des cellules, le rendant ainsi accessible aux cellules du système immunitaire. De même, quand des souris immunodéficientes ayant reçu des greffes de peau humaine ont été immunisées passivement avec des anticorps anti-Ro purifiés, ceux-ci ne se sont pas fixés sur la peau normale d'origine humaine ou murine. Par contre, lorsque les mêmes souris greffées sont d'abord exposées à des radiations ultraviolettes, les anticorps anti-Ro s'attachent à la peau humaine mais pas à la peau de souris. Le pattern de déposition de ces anticorps reproduirait d'ailleurs celui des immunoglobulines observé dans des spécimens de peau de patients souffrant de LECS (Lee et al., 1989). Bien que fort suggestives, aucune de ces observations ne représente toutefois une preuve d'un rôle pathogénique direct des anti-Ro dans ces manifestations cliniques.

1.9 L'autoantigène Ro

1.9.1 Composantes ARN et protéiques

Les ribonucléoprotéines Ro sont formées d'un polypeptide de 60 kD associé à de petits ARNs de 83 à 112 nucléotides appartenant à la famille des Y ARNs (Wolin et Steitz, 1984). Récemment on a rapporté l'existence d'un

polypeptide de 52 kD (Ben-Chetrit et al., 1988), puis celle d'un polypeptide de 54 kD présent seulement dans les globules rouges (Rader et al., 1989), qui seraient aussi capables de s'associer aux ARNs Ro. Tout récemment, un polypeptide de 48 kD mais migrant de façon aberrante en gel de polyacrylamide comme une protéine de 60 kD lui aussi reconnu par des sera anti-Ro, a été cloné et caractérisé (Lieu et al., 1988; McCauliffe et al., 1990). De façon surprenante, la séquence de ce polypeptide correspondrait à une protéine impliquée dans la régulation du calcium intracellulaire appelée calréguline. Le polypeptide La de 48 kD est également associé avec une fraction des ribonucléoprotéines Ro (Hendrick et al., 1981), probablement par l'intermédiaire de l'extrémité 3' des ARNs, riche en Uridine, de la même façon qu'il s'attache aux autres ARNs produits de transcription de l'ARN polymérase de type III (Stefano, 1984; Gottlieb et al., 1989; Hendrick et al., 1981). Le nombre d'ARNs Ro varie d'une espèce à l'autre: les cellules nucléées humaines en contiennent quatre, appelées hY1-hY5 (hY2 est une forme légèrement tronquée de hY1); les globules rouges humains en contiendraient deux, dont l'un migre avec hY4 et l'autre migre entre hY1 et hY2 en gel d'urée-polyacrylamide; les cellules de souris en contiennent deux, appelées mY1 et mY2; les cellules de rat en contiennent trois (rY1a, rY1b, et rY2); et les cellules bovines en contiennent quatre (bY1-bY4) (Wolin et Steitz, 1983; Reddy et al., 1983; Rader et al., 1989; Mamula et al., 1989). Le polypeptide de 60 kD

s'attache aux ARNs Ro à une région spécifique constituée par l'appariement de leurs extrémités 3' et 5' (Wolin et al., 1983). Les sites d'attachement des polypeptides de 52 et de 54 kD et de la calréguline restent inconnus. Le polypeptide de 60 kD a récemment été cloné et séquencé (Deutscher et al., 1988; Ben-Chetrit et al., 1989). Une séquence similaire à une séquence consensus présente sur plusieurs autres protéines s'attachant à l'ARN y a ainsi été identifiée, constituant un site potentiel pour l'interaction avec les ARNs ou d'autres polypeptides. Une séquence analogue à un "doigt de zinc" a aussi été identifiée sur le polypeptide Ro de 60 kD. Les "doigts de zinc" ont jusqu'à présent été identifiés surtout chez des protéines qui interagissent avec des acides nucléiques (Schleif, 1988). Leur rôle semble être d'induire un changement conformationnel dans la protéine permettant une interaction plus précise avec son substrat.

Bien que les composantes individuelles des ribonucléoprotéines Ro semblent maintenant mieux connues, aucune activité n'a pu leur être attribuée. De même, la fonction des ribonucléoprotéines intactes reste inconnue. Il semble que cette fonction soit essentielle puisque les ARNs Ro sont les seuls produits de transcription de l'ARN polymérase III dont la production persiste dans des cellules soumises à des conditions difficiles (Hendrick et al., 1981).

1.9.2 Les ribonucléoprotéines Ro

Le poids moléculaire apparent en tamisage moléculaire des ribonucléoprotéines Ro isolées de tissus étant de 100 à 150 kD, il a été suggéré qu'un seul ARN (20 à 32 kD) s'y trouve associé à une seule protéine de 60 kD (Yamagata et al., 1984; Scopelitis et al., 1980). Les conditions de purification de ces ribonucléoprotéines étaient telles, dans ces travaux déjà anciens, que la composante protéique et l'ARN pouvaient avoir été dégradés ou dissociés. De plus, peu de données existent sur le comportement en solution de ribonucléoprotéines intactes (Monteilhet et Aggerbeck, 1986). Il est possible qu'un complexe d'acide nucléique et de protéines ne se comporte pas exactement comme une protéine globulaire. Le poids moléculaire des ribonucléoprotéines Ro, et donc la stoichiométrie de leurs composantes, reste donc une estimation sujette à caution.

1.9.3 Localisation intracellulaire de l'autoantigène Ro

Bien que l'autoantigène Ro aie été intensivement étudié, sa localisation intracellulaire reste à préciser. En utilisant des techniques d'immunofluorescence indirecte ou de fractionnement cellulaire, plusieurs études ont en effet rapporté une localisation cytoplasmique (Clark et al, 1969; Hendrick et al, 1981; Wolin et Steitz, 1983), d'autres une localisation nucléaire (Alspaugh et al, 1976; Harmon et

al, 1984; Gaither et al, 1987), et d'autres enfin en ont retrouvé dans les deux fractions mais en proportion inverse (Kato et al, 1982 [surtout cytoplasmique]; Ben-Chetrit et al, 1988 [surtout nucléaire]. Harmon et al ont aussi démontré que la méthode de fixation des cellules utilisées dans la méthode d'immunofluorescence indirecte pouvait modifier les résultats, suggérant que Ro pouvait facilement passer d'un compartiment cellulaire à l'autre.

Jusqu'à récemment, l'explication de ces résultats contradictoires n'était pas évidente. La réponse réside probablement en partie dans l'hétérogénéité des anticorps anti-Ro discutée à la section 1.6. Les études d'immunolocalisation de l'autoantigène Ro ont été faites alors qu'on ignorait que des séras anti-Ro pouvaient contenir des anticorps reconnaissant l'une ou l'autre d'au moins 3 protéines distinctes (60 kD, 52 kD, et 43 kD calréguline), certaines ayant vraisemblablement une localisation surtout nucléaire (60 kD et 52 kD) et d'autres cytoplasmique (e.g. calréguline qui semble confinée au réticulum endoplasmique). Il est donc vraisemblable que ces divergences puissent découler de l'utilisation de séras aux spécificités distinctes. De même il est possible que l'antigène Ro soit impliqué dans une fonction de transport ou de régulation des mouvements de certaines protéines entre le noyau et le cytoplasme, ou encore, que différentes ribonucléoprotéines Ro aient des fonctions différentes (O'Brien et Harley, 1990).

1.9.4 Expression de l'antigène Ro à la surface des cellules

Comme nous l'avons mentionné précédemment, des anticorps anti-Ro s'attachent à la surface de kératinocytes exposés à des radiations UV (LeFeber et al., 1984). Cet attachement est dépendant de la survie de la cellule, puisque les cellules mortes ne fixent pas les anticorps et que l'attachement des anticorps à la surface cellulaire est inhibé par incubation en présence de cycloheximide. De même, l'estradiol augmente l'attachement d'anticorps anti-Ro sur des kératinocytes en culture (Furukawa et al., 1988). Cette action est spécifique puisque d'autres hormones n'ont aucun effet. Des cellules Hep-2 infectées par des adénovirus auraient également montré une translocation des antigènes Ro et La d'abord dans le cytoplasme puis à la surface des cellules (Tesar et Armstrong, 1986). De façon intéressante, aucune de ces cellules n'exprimait des molécules CMH de classe II; la translocation de l'antigène n'était donc pas le résultat d'une présentation antigénique classique. La structure moléculaire des antigènes Ro et La exprimés à la surface des cellules n'a pas été étudiée, de sorte qu'il n'est pas clair s'ils s'y retrouvent sous forme dégradée, dénaturée, ou intacte.

1.10 Techniques de détection des autoanticorps

Classiquement, les anticorps anti-Ro sont détectés par la technique de double immunodiffusion en gel d'agarose (ID). Quoique très spécifique dans des systèmes antigène\anticorps simples, cette technique présente des limitations importantes. D'une part, l'antigène n'est reconnu que par sa capacité de former un précipité lorsqu'exposé à un anticorps spécifique. Nous n'obtenons ainsi aucune information sur les caractéristiques physicochimiques de l'antigène (poids moléculaire, etc.). De plus cette technique ne permet pas de détecter les anticorps non précipitants; elle est aussi peu sensible.

Il y a quelques années, des techniques immunoenzymatiques de type ELISA ont été développées (Yamagata et al., 1984). Utilisant des antigènes purifiés par immunoaffinité, ces techniques sont beaucoup plus rapides et sensibles que l'ID, tout en permettant une quantification plus précise des titres d'anticorps. Les techniques ELISA souffrent toutefois de quatre limitations potentielles: 1) l'antigène purifié peut être contaminé par des traces d'autres autoantigènes, diminuant ainsi la spécificité; 2) un antigène purifié par immunoaffinité est partiellement dénaturé par les conditions de dissociation des complexes antigène\anticorps, rendant impossible la détection d'anticorps dirigés contre des déterminants conformationnels; 3) l'attachement d'un antigène à une surface conduit à

des changements de conformation, aggravant encore le problème de dénaturation de l'antigène (Hollander et Katchalski-Katzir, 1986); et 4) des anticorps de faible affinité, et donc potentiellement polyspécifiques ou sans importance clinique peuvent être détectés (Barlow et al., 1986; Jemmerson, 1987; Harlow et Lane, 1988; Jemmerson et Blankenfeld, 1988).

La technique d'immunobuvardage (IB) a été développée en parallèle aux techniques ELISA (Lieu et al., 1984; Elkon et Culhane, 1984; Deng et al., 1985). Cette technique permet l'identification de l'antigène par son poids moléculaire apparent lors d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Elle permet aussi l'utilisation d'un extrait antigénique complexe, rendant plus facile le travail de purification de l'antigène. Toutefois, l'utilisation d'un détergent ionique de type SDS et celle d'un agent réducteur dans la technique d'IB classique neutralisent les interactions électrostatiques et les ponts disulfure responsables des structures secondaire et tertiaire des protéines. L'IB en conditions dénaturantes ne permet donc de détecter que des anticorps dirigés contre des épitopes constitués d'oligopeptides linéaires et ignore totalement (ou presque) les anticorps dirigés contre des déterminants conformationnels.

Une quatrième technique, celle de l'immunoprécipitation d'extraits de cellules en culture permet d'allier sensibilité et spécificité, et permet la détection des antigènes sous leur forme native (Hendrick et al., 1981; Craft et al.,

1988; Forman et al., 1985). Cette technique permet également la détection préférentielle d'anticorps de plus haute affinité (Harlow et Lane, 1988), donc potentiellement plus significatifs. Toutefois cette technique est laborieuse et n'est pas utilisée pour la détection routinière des autoanticorps. Elle représente cependant une technique de référence à laquelle les résultats obtenus par d'autres techniques peuvent être comparés.

Nous avons récemment mis au point une technique de détection des anti-Ro et des anti-La par immunobuvardage d'extraits tissulaires séparés par électrophorèse en conditions non-dénaturantes (N-IB) (Boire et al., 1987; Lapointe, 1990). Cette technique permet la détection d'anticorps dirigés contre des déterminants conformationnels. Bien que nos résultats soient encore préliminaires, il semble que la sensibilité et la spécificité de cette technique soient comparables à celles de l'immunoprécipitation d'extraits cellulaires (Boire et al., 1990). Cette technique a aussi permis la détection d'anticorps anti-Ro dans un nombre appréciable de sera qui restent négatifs en immunodiffusion et en immunobuvardage classique. L'apport de ce développement technologique pour la détection des anti-Ro reste encore à évaluer.

MATERIEL ET METHODES

2.1 Sera

Nous avons utilisé des sera humains obtenus de donneurs sains ainsi que de patients d'origine Canadienne-Française et Américaine souffrant de diverses collagénoses. Les critères diagnostiques utilisés pour la polyarthrite rhumatoïde (PR), le LED et la sclérodermie étaient ceux de l'American Rheumatism Association (ARA) (Schumacher, 1988). Les changements radiologiques ont été notés selon les stades radiologiques de l'ARA (Steinbrocker et al., 1949). Nous avons défini le Syndrome de Sjögren (SS) comme l'association de deux critères cliniques (xérostomie et xérophtalmie) ou d'au moins un critère clinique plus la démonstration objective d'une atteinte soit oculaire (test de Schirmer anormal ou test au rose bengale positif) soit salivaire (présence d'au moins un amas de plus de 50 lymphocytes sur une biopsie de glandes salivaires mineures [Greenspan et al, 1974] ou sialoscintigraphie démontrant une atteinte diffuse de toutes les glandes salivaires majeures). Le SS était dit primaire si le patient ne remplissait les critères d'aucune autre collagénose, et secondaire dans le cas contraire. Le diagnostic de connectivite mixte (MCTD) était posé lorsque le patient présentait des éléments de LED, de sclérodermie et de polymyosite, habituellement accompagnés de titres élevés d'anticorps anti-RNP (Sharp et al., 1972). Les patients qui ne remplissaient les critères pour aucun des diagnostics précédents ont été déclarés souffrir d'une

"connectivite non définie" (UCTD). Enfin, le diagnostic de syndrome de Felty nécessitait la présence de la triade complète de PR, de splénomégalie, et de neutropénie.

Les sera anti-Ro contrôle immunoprécipitaient les 4 ARNs associés à l'antigène Ro à partir d'extraits de cellules HeLa marquées *in vivo* avec [³²P]orthophosphate (Hendrick et al., 1981). Les sera identifiés anti-Ro^{hY5} n'immunoprécipitaient que l'ARN Ro hY5 à partir d'extraits semblables (Boire et Craft, 1989). Les sera anti-Ro en double immunodiffusion en gel d'agarose (ID) formaient une ligne de précipitine fusionnant avec la ligne de précipitine formée par un serum anti-Ro de référence (CDC, Atlanta, GA). Les sera anti-Ro en immunobuvardage de protéines dénaturées au SDS (SDS-IB) reconnaissaient une bande co-migrant exactement avec la bande de 60 kD reconnue par le même serum anti-Ro de référence (Wolin et Steitz, 1984; Lieu et al., 1984; Deng et al., 1985).

2.2 Etude pilote

Entre Septembre 1983 et Décembre 1984, 495 sera consécutifs provenant de 334 patients furent reçus pour caractérisation d'anticorps antinucléaires au laboratoire d'Immuno-rhumatologie du Dr Henri-A. Ménard.

Les dossiers de tous les patients dont le serum contenait un anticorps anti-Ro détectable par ID et qui étaient suivis par un membre de l'Unité des Maladies Rhumatismales

(UMR) ont été revus de façon rétrospective. Parmi ces patients, un sous-groupe constitué de 12 individus souffrant de PR a été étudié de façon plus complète. Un groupe de patients souffrant de PR et apparié pour l'âge mais ne possédant pas d'anticorps anti-Ro a été constitué de façon aléatoire à partir de la population de patients suivis par les membres de l'UMR. Les deux groupes de patients rhumatoïdes ont été comparés en utilisant des tests t bilatéraux (obéissant à une loi de Student) pour les variables continues et des tests du chi carré (X^2) pour les variables discrètes. Compte tenu de la petite taille de l'échantillon et de l'aspect exploratoire de l'étude, aucune correction n'a été apportée pour tenir compte des comparaisons multiples auxquelles nous avons procédées.

2.3 Etude de cohorte de la population rhumatoïde

2.3.1 Sélection des patients

Les résultats obtenus lors de l'analyse de notre étude pilote nous avaient suggéré que la présence d'anticorps anti-Ro pouvait représenter un marqueur de sévérité de la maladie rhumatoïde. Comme toute étude de cas-témoins rétrospective, cette étude ne pouvait guère que suggérer des associations. Pour les confirmer, il nous fallait étudier une population non sélectionnée.

Nous avons donc opté pour une étude de cohorte d'un échantillon aussi représentatif que possible de la population des patients souffrant de PR. Pour ce faire, nous avons inclus dans notre étude tous les patients consécutifs examinés par un membre de l'UMR du CHUS qui remplissaient les critères de l'ARA permettant un diagnostic de PR. Nous nous sommes limités aux patients examinés et diagnostiqués par un membre de l'UMR et non à tous les patients avec PR examinés au CHUS pour deux raisons. Tout d'abord, puisque seuls trois médecins étaient impliqués (Drs André Lussier, Henri-A. Ménard, et Daniel Myhal), il serait plus facile de s'assurer de l'inclusion de tous les patients avec un diagnostic de PR. Pour ce faire, le diagnostic de chaque patient examiné était consigné sur des listes qui étaient remises au secrétariat de rhumatologie. Les patients identifiés rhumatoïdes sur ces listes, mais qui n'avaient pas été inclus dans l'étude, avaient alors leur dossier revu. Si les renseignements contenus au dossier suggéraient le diagnostic de PR, tout était mis en oeuvre pour admettre ce patient lors de sa prochaine visite. De cette façon, nous espérons rejoindre la quasi-totalité de l'échantillon visé. Deuxièmement, en limitant la responsabilité du diagnostic à des rhumatologues chevronnés, nous minimisons les erreurs et nous augmentons nos chances de disposer de renseignements pertinents plus complets et plus détaillés. Nous introduisons toutefois un biais de sélection, puisque seuls les patients suffisamment atteints pour faire l'objet d'une

référence à un rhumatologue risquaient ainsi d'être échantillonnés. Toutefois, la situation particulière de l'UMR du CHUS, qui constitue à la fois un centre de référence tertiaire et une unité de soins secondaire (puisque'il n'y a qu'une autre rhumatologue dans toute la région administrative 05), pouvait nous assurer que l'échantillon étudié serait probablement représentatif des patients examinés par la majorité des groupes de rhumatologues Nord-Américains.

2.3.2 Inclusion des patients

La période d'inclusion s'est étendue du 1^{er} Novembre 1985 au 30 Mai 1987. Lors de leur identification, tous les patients étaient informés de l'existence d'une étude portant sur la sérologie des patients atteints de PR et leur participation était sollicitée. La feuille de consentement signée par les patients est jointe en annexe A.

Lors de l'inclusion, chaque patient subissait un examen clinique complet, et des informations standardisées étaient recueillies pour définir leurs caractéristiques cliniques (e.g. durée de la maladie, manifestations extra-articulaires, etc.). Le stade radiologique de leur atteinte articulaire était alors établi par des radiographies des mains et des pieds. Des prélèvements sanguins et urinaires étaient aussi effectués. Ces prélèvements comprenaient entre autres une formule sanguine complète, un dosage des gam-

maglobulines (N:0.5-1.6 g\dl) et des composantes du complément C3 (N:94-214 mg\dl) et C4 (N:16-50 mg\dl) mesurés par néphélogométrie par comparaison avec des réactifs contrôles. De plus le titre de facteur rhumatoïde IgM, exprimé en Unités Internationales (UI), était déterminé par agglutination de billes de latex utilisant des sera de référence obtenus du Center for Diseases Control (Atlanta, GA). Un titre égal ou supérieur à 31 UI était considéré positif. La présence de facteur antinucléaire (FAN) était aussi déterminée par immunofluorescence indirecte sur des coupes de foie de rat. Un titre supérieur à 1:80 était considéré positif. Enfin, un prélèvement additionnel ("kit sérologique") était effectué pour permettre la détection des anticorps antinucléaires. Le "kit sérologique" comporte une épreuve d'immunofluorescence indirecte sur cellules Hep-2 en culture, le dosage des anticorps anti-ADN bicaténaire par épreuve de Farr, l'identification des anticorps antinucléaires par double immunodiffusion en gel d'agarose, et le dosage des cryoglobulines sériques. Les sera provenant de ce dernier prélèvement ont été codés puis congelés, pour être analysés de façon groupée.

2.3.3 Manifestations cibles

A partir des résultats de notre étude pilote, nous avons défini comme manifestations cibles l'apparition de l'une ou l'autre des manifestations extra-articulaires sui-

vantes: 1) la présence de manifestations vasculitiques, 2) une leucopénie persistante (moins de $4.0 \times 10^9/L$) non explicable par une toxicité médicamenteuse, 3) un abaissement simultané des composantes C3 (inférieure à 94 mg/dl) et C4 (inférieure à 16 mg/dl) du complément, 4) l'apparition d'un syndrome de chevauchement PR\LED, et 5) la mise au monde d'un enfant souffrant de lupus néonatal avec ou sans bloc AV congénital. La fréquence de ces manifestations n'est pas bien définie. Moins de 1% des malades souffrant de PR présenteraient une leucopénie (Goldberg et Pinals, 1980). Les autres manifestations sélectionnées sont de faible prévalence: l'artérite toucherait moins de 1% des malades (Decker et Plotz, 1985), et les autres ne peuvent être quantifiées. Au total, les 5 manifestations toucheraient donc moins de 5% de la population rhumatoïde générale.

Nous avons retrouvé dans notre étude pilote initiale une prévalence combinée de ces manifestations de 30 à 40% chez les patients rhumatoïdes porteurs d'anti-Ro. Une pareille différence nous apparaissait cliniquement significative. Compte tenu que la fréquence des anticorps anti-Ro est elle-même très basse (3 à 5%), nous ne pouvions espérer obtenir un échantillon très important de patients rhumatoïdes anti-Ro positifs. Nous avons donc établi que la présence de l'une ou l'autre des 5 manifestations cibles mentionnées permettrait de classer le patient atteint dans le groupe des patients avec atteinte sévère.

2.3.4 Taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon visé avait été établie comme suit. Nous avons établi une valeur acceptable de l'erreur de type I (α) de 0.05 et de l'erreur de type II (β) de 0.20 (i.e. une puissance de 80%). La prévalence des patients producteurs d'anti-Ro avait été estimée à 0.04 (intervalle de 0.03 à 0.05). La prévalence des manifestations cibles dans la population rhumatoïde générale et dans la population rhumatoïde avec anti-Ro avait été estimée à 0.04 (intervalle de 0.03 à 0.05) et 0.35 (intervalle de 0.30 à 0.40), respectivement. En utilisant une formule définie pour la comparaison de deux groupes de taille inégale (Fleiss et al., 1980) nous avons obtenu un échantillon cible de 292 patients (intervalle de 180 à 600).

$$n = \{Z_{\alpha}\sqrt{[(s+1)P_s(1-P_s)]} + Z_{\beta}\sqrt{[sP_E(1-P_E) + P_C(1-P_C)]}\}^2 / (s\delta^2)$$

où n = nombre de patients avec anti-Ro

et sn = nombre de patients sans anti-Ro où $n \setminus (s+1)n = 0.04$

P_E = prévalence des manifestations cibles chez les patients producteurs d'anti-Ro (0.35)

P_C = prévalence des manifestations cibles chez les patients non-producteurs d'anti-Ro (0.04)

$$P_s = (P_E + sP_C) / (s+1)$$

et δ = différence cliniquement significative entre les deux groupes (ici $0.35 - 0.04 = 0.31$).

2.3.5 Collecte des données

Les dossiers de tous les patients admis ont été relevés soit par moi-même, soit par une étudiante d'été (Nathalie Cauchon), et ce dans l'ignorance des résultats des tests de détection des autoanticorps antinucléaires. Les patients ne remplissant pas les critères de PR de l'ARA ont été exclus (4 malades: 3 patientes souffrant de polyarthrite chronique juvénile, et une patiente souffrant de MCTD). Le dossier de tous les patients remplissant les critères d'inclusion a été révisé. Les renseignements recueillis comprenaient les caractéristiques démographiques et cliniques des patients (e.g. numéro de dossier, sexe, date de naissance, durée de maladie, grade fonctionnel...), les manifestations extra-articulaires éventuelles (e.g. splénomégalie, vasculite, Sjögren...), les conditions associées (e.g. néoplasie, enfant né avec bloc AV congénital, dysthyroïdie, etc.), et les manifestations sérologiques et radiologiques de leur maladie. Un exemple du feuillet sommaire des données recueillies pour chaque patient est joint en Annexe B.

2.3.6 Evaluation des traitements anti-rhumatismaux

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie très hétérogène. L'un des objectifs majeurs quant à son

traitement est d'identifier qui aura besoin d'un traitement anti-rhumatismal agressif et qui sera susceptible d'y répondre ou d'en développer des effets secondaires importants. Notre étude pilote avait suggéré que la présence d'anti-Ro identifiait un sous-groupe nécessitant un traitement plus agressif. Il est clair que l'utilisation d'un régime thérapeutique plus agressif peut refléter une maladie plus sévère (articulaire ou extra-articulaire), ou une moins bonne réponse aux agents usuels. Afin de préciser cette observation, nous avons relevé les traitements anti-rhumatismaux auxquels nos patients ont été soumis.

L'évaluation à partir du dossier des malades de l'efficacité ou de la toxicité d'un traitement anti-rhumatismal est difficile, surtout dans le contexte d'une étude rétrospective. Dans certains cas, les traitements ont pu être administrés de nombreuses années avant l'évaluation initiale du malade par un membre de l'UMR. De plus les pratiques concernant ces agents se sont considérablement modifiées au fil du temps. Par exemple, il était pratique courante, il y a moins de 10 ans, de cesser les sels d'or parentéraux après qu'une dose de charge de 1 g aie été administrée, que l'on aie ou non obtenu des résultats favorables. Actuellement, les recommandations sont, en cas de réponse adéquate, de continuer l'administration de sels d'or à doses plus faibles afin de maintenir la rémission partielle ou totale obtenue. Les recommandations concernant d'autres agents anti-rhumatismaux ont également évolué: les

doses d'antimalariques optimales ont été mieux définies, les combinaisons d'agents sont devenues plus courantes, et de nouveaux antirhumatismaux sont devenus disponibles, par exemple la salazopyrine et le méthotrexate. Notre étude transversale a été conduite à une époque charnière où plusieurs de ces changements étaient en cours.

Pour tenir compte de toutes ces variations, nous avons établi un ensemble de règles. Premièrement, un traitement antirhumatismal ne serait comptabilisé que s'il avait été administré à des doses et pour une durée adéquate (arbitrairement établie à 3 mois) à moins que son arrêt soit justifié par une réaction toxique. Deuxièmement, nous n'avons considéré que le premier traitement adéquat (tel que défini ci-haut) avec un agent antirhumatismal donné. Ainsi, nous n'avons pas comptabilisé un deuxième ou un troisième traitement aux sels d'or. Troisièmement, nous avons défini l'efficacité (et l'inefficacité) à la fois par l'évaluation du médecin consignée au dossier (lorsque disponible) et par l'administration continue du médicament une fois passée la période d'évaluation habituelle du médicament (arbitrairement fixée à 6 mois pour tous les antirhumatismaux). Quatrièmement, nous avons défini une toxicité médicamenteuse comme une condition justifiant l'arrêt définitif ou la réduction prolongée des doses ou l'arrêt temporaire et la reprise à doses plus faibles d'un agent antirhumatismal. Cinquièmement, nous avons regroupé en une seule entité les traitements aux sels d'or, qu'ils soient

sous forme parentérale (Aurothiomalate de sodium, Myochrysine) ou entérale (Auranofin, Ridaura). Sixièmement, nous avons considéré qu'un traitement à l'aide de corticostéroïdes était à doses élevées s'il équivalait à une dose supérieure à 5 mg de prednisone pour une durée supérieure à un mois; seuls ces traitements ont été comptabilisés. Septièmement, nous avons regroupé dans une seule rubrique "immunosuppresseurs", tous les traitements avec les agents suivants: méthotrexate, cyclophosphamide, azathioprine, levamisole et chlorambucil.

2.3.7 Détection des anticorps antinucléaires

Les sera prélevés furent analysés de la façon suivante. La présence de FAN a été déterminée par immunofluorescence indirecte sur des cellules Hep-2 cultivées en monocouches (Kallestad, Austin, TX) (Mimori et al., 1986). Un titre supérieur à 1:80 était considéré positif. Le pattern d'immunofluorescence était défini comme celui visible à la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Les anticorps anti-nADN étaient mesurés par la technique de Farr, utilisant l'ADN du phage lambda marqué *in vitro* avec [³H] par la méthode de transcription utilisant une cassure monocaténaire ("nick translation"; Raptis et Ménard, 1980). La limite supérieure de la normale pour ce test était de 1500 ng d'ADN précipité par ml de serum.

Un dosage des cryoglobulines d'apparition tardive, qui reflètent la quantité de complexes immuns circulants (Robinson et al., 1979), était exprimé en équivalents d'immunoglobuline humaine agrégée à la chaleur. Une valeur inférieure à 40 µg/ml était considérée normale.

Les anticorps anti-Ro, anti-RNP, anti-Sm, anti-La, anti-Pm-Scl, anti-Jo-1, et anti-Scl 70 étaient détectés par la technique de double immunodiffusion en gel d'agarose (ID) (Boire et Ménard, 1988). Les anti-Ro étaient détectés en utilisant un extrait de rate humaine (et à l'occasion un polypeptide Ro de 60 kD purifié par immunoaffinité à partir de rate bovine). Tous les autres autoanticorps étaient détectés en utilisant un extrait salin de thymus de lapin.

2.3.8 Traitement statistique

Les caractéristiques démographiques, cliniques et paracliniques furent évaluées par un test *t* bilatéral dans le cas des données quantitatives et par un test du chi carré dans le cas des données qualitatives. Compte tenu du faible nombre de patients producteurs d'anti-Ro, et de leur subdivision en patients avec ou sans atteinte sévère tel que définie plus haut, ces tests se retrouvaient à la limite de leurs conditions d'applicabilité lors de la comparaison des patients producteurs d'anti-Ro avec ceux qui n'en produisent pas. Nous avons donc décidé d'utiliser un test d'indépendance des deux populations, le test d'indépendance

de G utilisant la correction de Williams (Scherrer, 1984). Nous avons également calculé les risques relatifs de la présence de manifestations extra-articulaires cibles en présence ou en absence d'anti-Ro.

2.4 Cellules en culture

Des cellules d'ascite de souris de type Ehrlich, des cellules de lapin de type SIRC, et des cellules de boeuf de type MDBK furent obtenues de l'American Type Culture Collection (Rockville, MD). Ces trois lignées cellulaires ainsi que des cellules humaines de type HeLa furent cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ dans un milieu RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) enrichi avec 10% de serum de veau foetal décomplémenté à la chaleur (56°C, 30 minutes) et 60 µg de pénicilline G sodique par ml et 100 µg de streptomycine par ml (Boire et Craft, 1989).

2.5 Préparation d'extraits cellulaires radiomarqués

Pour analyser les ARNs, des cellules HeLa furent radiomarquées pendant 14 heures avec [³²P]orthophosphate (10 µCi/ml; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) (Craft et al., 1988). Pour l'analyse des protéines, des cellules HeLa furent radiomarquées pendant 14 heures avec de la [³⁵S]méthionine (10 µCi/ml de cellules; Amersham Corp.).

Les cellules furent récoltées par centrifugation, lavées dans du tampon TBS (10 mM Tris-Cl [7.5], 150 mM NaCl), et brisées par sonication à 5 reprises pour des périodes de 30 secondes chacune dans un tampon NET-2 (50 mM Tris-Cl [7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40). La suspension a été clarifiée par centrifugation à 13,000g pendant 20 minutes et les surnageants furent immédiatement utilisés comme source d'antigène. Les autres lignées cellulaires (cellules d'ascite de souris, cellules SIRC de lapin, et cellules MDBK de boeuf) furent cultivées jusqu'à ce que les cellules soient presque confluentes dans des flacons à culture de 75 cm² (Corning Glass Works, Corning, NY); les cellules furent alors détachées par digestion tryptique, lavées dans un tampon TBS, divisées en deux flacons identiques dans un milieu minimal ne contenant pas de phosphate, et radiomarquées avec [³²P]-orthophosphate (300 µCi par flacon) pendant 14 heures. Les cellules ont alors été détachées mécaniquement, lavées dans du tampon TBS, puis brisées par sonication et traitées comme pour les cellules HeLa.

2.6 Technique d'immunoprécipitation

L'immunoprécipitation des extraits cellulaires radiomarqués a été faite telle que décrite (Lerner et Steitz, 1979) avec quelques modifications. En bref, 10 µl de serum d'un patient furent incubés pendant 2 heures à 4°C avec 2 mg de billes de sepharose recouvertes de protéine A (Pharmacia

Inc., Piscataway, NJ) dans 500 μ l de tampon d'immunoprécipitation (IPP: 10 mM Tris-Cl [7.5], 500 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40). Les billes maintenant recouvertes d'IgG furent lavées à six reprises dans du tampon IPP et resuspendues dans 400 μ l de tampon NET-2. Pour l'analyse des ARNs, les billes furent combinées à 100 μ l d'extraits cellulaires radiomarqués *in vivo* avec [³²P]-orthophosphate correspondant à 2 x 10⁶ cellules, et incubées à 4°C pendant 1 heure. Les billes furent alors lavées à six reprises dans du tampon NET-2, puis resuspendues dans un mélange de 300 μ l de tampon NET-2, 15 μ l de 20% SDS, 30 μ l de 3 M d'acétate de sodium, et 1-2 μ l de 10 mg/ml de glycogène d'huître. Les ARNs retenus sur les billes furent extraits avec 300 μ l de phénol-chloroforme (PCA; 50 volumes de phénol liquide saturé en eau, 50 volumes de chloroforme, 1 volume d'alcool isoamylique, et 0.1% de 8-hydroxyquinoline). Les acides nucléiques présents dans la phase aqueuse furent précipités par l'addition d'éthanol à une concentration finale de 70% suivie d'une incubation à -20°C pendant 2-14 heures. Les acides nucléiques précipités furent lavés avec 500 μ l d'éthanol 70% glacé, puis séchés sous vide et redissous dans 20 μ l de 7 M urée contenant 0.025% de bromophénol bleu et 0.025% de xylènecyanol FF. Les ARNS étaient finalement fractionnés dans des gels contenant 10% de polyacrylamide et 7 M d'urée. Après séchage des gels, les acides nucléiques radiomarqués ont été détectés par autoradiographie à -70°C sur un film photographique XRP (Eastman Kodak).

Lors des études de déplétion d'antigène Ro, 100 μ l d'extraits radiomarqués au [32 P] ont été incubés de façon sériée avec des billes recouvertes d'anticorps provenant d'un serum anti-Ro jusqu'à ce qu'aucun ARN Ro ne puisse être immunoprécipité de cet extrait (en général quatre ou cinq incubations suffisaient), puis avec des billes recouvertes avec un serum anti-Ro^{hY5}. Afin de confirmer que l'antigène Ro avait été sélectivement enlevé de cet extrait, nous avons par la suite incubé l'extrait avec un serum anti-U1 RNP. Les acides nucléiques présents dans les immunoprécipités ont été extraits et détectés comme décrit ci-haut.

Lors de certaines expériences, nous avons utilisé des extraits de cellules non radiomarquées. Nous avons alors utilisé 6×10^6 cellules par échantillon, et les ARNs immunoprécipités ont été détectés par coloration à l'argent des gels de polyacrylamide (Forman et al., 1985).

Pour les expériences nécessitant des acides nucléiques non combinés à des protéines, des extraits cellulaires radiomarqués *in vivo* avec [32 P]-orthophosphate ont d'abord été extraits au PCA. Les acides nucléiques ont été précipités dans l'éthanol, lavés dans l'éthanol 70%, et resuspendus dans un tampon NET-2. Dans certaines autres expériences, les extraits cellulaires radiomarqués ont été digérés par la protéinase K (360 μ g/ml; Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) à 4°C pendant 90 minutes; la protéinase K a ensuite été neutralisée par l'addition de 4.0 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF; Sigma Chemicals Co.,

St-Louis, MO) (Rosa et al., 1983). Les extraits d'acides nucléiques déprotéïnés furent alors immunoprécipités en parallèle avec des extraits radiomarqués non traités, selon la procédure décrite ci-haut.

Pour les études de protéines, des billes recouvertes d'anticorps furent combinées avec 400 μ l d'extraits radiomarqués avec [³⁵S]méthionine (8 x 10⁶ cellules) et incubées pendant une heure à 4°C. Les billes furent lavées à six reprises avec du tampon NET-2 puis resuspendues dans un tampon d'électrophorèse (2% SDS, 10% glycérol, 62.5 mM Tris-Cl [6.8], 0.005% bromophénol bleu), puis chauffées à 90°C pendant 5 minutes. Les protéines dissoutes dans le tampon furent alors séparées dans un gel de 10% polyacrylamide (acrylamide:bis; 30:1.13) contenant du SDS. Le gel fut alors incubé dans 0.5 M de salicylate de sodium pendant 30 minutes puis séché. Les protéines furent détectées par autoradiographie à -70°C pendant 1-8 jours.

2.7 Séparation des ARNs en deux dimensions

La technique de séparation des ARNs en deux dimensions était essentiellement celle décrite (Rosa et al., 1983). Nous avons utilisé un gel contenant 10% d'acrylamide, 0.38% de N,N'-bisacrylamide et 7M urée et un tampon TBE (0.09 M Tris borate [8.3], 1 mM EDTA) pour la première dimension, et un gel contenant 18% d'acrylamide et 0.68% de N,N'-bisacrylamide pour la deuxième dimension.

2.8 Digestion par la Ribonucléase A pancréatique (RNase A)

Des billes recouvertes de serum ont été incubées avec des extraits cellulaires radiomarqués au [³²P]orthophosphate. Après lavage avec du tampon NET-2, les billes ont été resuspendues dans 100 µl de tampon NET-2 contenant 5 mM MgCl₂ et 1 mg/ml de ribonucléase pancréatique A (RNase A; Boehringer Mannheim Biochemicals) et incubées à 4°C pendant 14 heures (Mimori et al, 1986). Des échantillons contrôles ont été traités de façon identique, à l'exception de l'addition de ribonucléase.

2.9 Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide furent effectuées verticalement dans des plaques de 1 mm d'épaisseur avec 6 cm de gel séparateur et 1 cm de gel concentrateur dans un appareil Mini-Protean II cell (Bio-Rad, Richmond, CA). Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide 10% (acrylamide:bis; 73:2), sous des conditions réductrices et dénaturantes, furent effectuées selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Dans certaines expériences, le polypeptide Ro de 60 kD purifié par immunoaffinité (4 µg par puits) (Yamagata et al., 1984) fut utilisé; dans la plupart des expériences, 100 µl d'extrait de rate humaine à une concentration de 8 mg/ml furent utilisés pour chaque gel (la méthode

utilisée pour la détermination de la concentration des protéines était la méthode de Bradford). Dans chaque cas, les protéines furent dénaturées par incubation dans l'eau bouillante pendant 5 minutes dans un tampon de dissolution de l'échantillon contenant 2% SDS, 10% glycérol, 62.5 mM Tris-Cl [6.8], et 5% de 2-mercaptoéthanol. L'électrophorèse fut effectuée à 165 Volts pendant 45 minutes, dans le tampon d'électrophorèse contenant 25 mM Tris-192 mM glycine [8.3] et 0.1% SDS, jusqu'à ce que le bromophénol bleu atteigne le bas du gel. Les substances de poids moléculaire de référence utilisées provenaient de Sigma (St-Louis, MO) et incluaient l'albumine sérique bovine (BSA; 66 kD), l'ovalbumine (45 kD), la glycéraldehyde-3-phosphate deshydrogénase (36 kD), et l'anhydrase carbonique (29 kD). A l'occasion, de l'IgG provenant d'un serum humain normal fut purifié par précipitation au sulfate d'ammonium et par chromatographie sur résine échangeuse d'anions (DE52, Whatman), pour être utilisé comme marqueur de poids moléculaire tant en électrophorèse réductrice (chaîne lourde gamma, 52 kD) qu'en électrophorèse non-réductrice (IgG, 150 kD).

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide contenant du SDS dans des conditions non-réductrices furent effectuées de la même manière que pour les électrophorèses dans des conditions réductrices, à l'exception que les échantillons étaient dissous dans un tampon sans 2-mercaptoéthanol. Après électrophorèse les protéines dans les gels de polyacrylamide pouvaient être colorées au bleu de Coomassie R-

250 (coloration dans 0.1% de bleu de Coomassie, 50% méthanol et 10% d'acide acétique; décoloration dans 10% méthanol et 10% acide acétique), ou transférées sur nitrocellulose.

2.10 Electrotransfert

Les gels de polyacrylamide contenant du SDS, contenant ou non un agent réducteur, étaient d'abord équilibrés dans un tampon de transfert contenant 25 mM Tris-192 mM glycine [8.3], 25% méthanol et 0.1% SDS pendant 15 minutes. L'électrotransfert sur une feuille de nitrocellulose se faisait dans un tampon identique, sauf qu'il ne contenait pas de SDS, à 100 Volts pendant 75 minutes (Towbin et al., 1979). Après électrotransfert, l'efficacité du transfert était contrôlée par coloration du gel au bleu de Coomassie. Pour bloquer tous les sites d'attachement des protéines non occupés, les feuilles de nitrocellulose étaient ensuite incubées toute la nuit dans 3% de BSA dans un tampon TBS ou dans 5% de poudre de lait dégraissé dans un tampon TBS contenant 0.1% d'azidure de sodium (NaN_3) (Blotto). Dans certaines expériences, une bande de la feuille de nitrocellulose a été découpée et colorée à l'Amido Black (coloration dans 45% méthanol, 10% acide acétique, 45% eau, 0.1% Amido Black; décoloration dans 90% méthanol, 2% acide acétique, 8% eau) avant l'incubation avec la BSA ou la solution Blotto.

2.11 Immunobuvardage

Les feuilles de nitrocellulose étaient lavées deux fois dans un tampon TBS puis incubées avec des dilutions de sera dans un tampon contenant 10 mM Tris-Cl [7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 et 0.5% BSA pendant une heure à la température de la pièce. Dans la plupart des cas, l'incubation était faite dans un appareil MiniBlotter (Immunetics, Cambridge, MA) qui permet d'utiliser jusqu'à 28 sera différents sur chaque feuille de nitrocellulose de 9 par 6.5 cm. Chaque minichambre contenait 40 µl de serum dilué en contact avec approximativement 25 µg d'extrait de rate humaine ou 1 µg de polypeptide Ro de 60 kD purifié par immunoaffinité. Le dépistage des sera positifs était possible à de faibles dilutions (1:20 à 1:50) sans observer d'interférences non-spécifiques marquées. Les sera positifs étaient dilués en série pour l'obtention de titres semi-quantitatifs. Les feuilles de nitrocellulose étaient ensuite lavées dans un tampon de lavage (10 mM Tris-Cl [7.4], 1 M NaCl, 0.1% Tween-20) et incubées avec une dilution 1:1000 d'immunoglobulines de chèvre marquées à la peroxydase spécifiques pour l'IgG humaine, pendant 1 heure à la température de la pièce. La feuille de nitrocellulose était alors lavée trois fois dans le tampon de lavage. Le développement de la coloration était obtenu avec 30 mg de 4-chloro-1-naphtol et 20 µl de peroxyde d'hydrogène 30% dans 40 ml de Tris-Cl [7.4] et 10 ml de méthanol. Dans certaines expériences, les anticorps

attachés aux feuilles de nitrocellulose ont été détectés par incubation avec de la protéine A radiomarquée à [^{125}I] (1×10^5 cpm/ml; ICN, Irvine, CA) puis par autoradiographie sur film XRP (Eastman Kodak Co, Rochester, NY).

2.12 Purification biochimique des ribonucléoprotéines Ro

Trois litres de cellules HeLa, à une densité de 6 à 10×10^5 cellules/ml, furent récoltées par centrifugation et lavées deux fois dans un tampon TBS glacé. Par la suite toutes les étapes de la purification ont été à 4°C et tous les tampons ont été supplémentés de 1.0 mM dithiothréitol et de 1.0 mM PMSF. La fraction cytoplasmique des cellules était préparée sans détergent. Brièvement, les cellules étaient d'abord incubées sur la glace pendant 10 minutes dans un volume de tampon A (10 mM Tris-Cl [7.5], 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl) correspondant à six fois le volume du culot cellulaire. Les cellules étaient alors recentrifugées et resuspendues dans du tampon A (deux fois le volume du culot initial) pour être brisées par 10 coups d'un homogénéiseur Dounce en verre; on ajoutait 100 unités de RNasin (Promega Biotec, Madison, WI) à la suspension cellulaire avant leur homogénéisation. L'extrait était ensuite clarifié par centrifugation à 13,000 g pendant 20 minutes. La concentration en sel du surnageant était ramenée à 150 mM par l'addition de 0.1 volume de tampon B (0.3 M Tris-Cl [7.5], 1.4 M NaCl, 1.5 mM MgCl_2). L'extrait était alors dé-

posé sur 7.5 ml d'une solution concentrée de sucrose (800 mM sucrose, 10 mM Tris-Cl [7.5], 5 mM MgCl₂) dans des tubes de 30 ml pour être centrifugé à 100,000 g pendant 90 minutes. Le surnageant était alors dilué avec un volume équivalent de TSE (50 mM Tris-Cl [7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) et appliqué sur une colonne contenant 40 ml de résine échangeuse d'anions DE 52 (Whatman) prééquilibrée dans le tampon TSE. La colonne était ensuite lavée abondamment avec du tampon TSE, puis les protéines étaient décrochées par des lavages successifs avec du tampon TSE contenant 175, 190, 210, 250, puis 300 mM NaCl. Après avoir ajouté 40 unités de RNasin, chaque éluat était concentré individuellement par dialyse sous vide (Pro-Di-Con, Bio-Molecular Dynamics, Beaverton, OR) contre du TSE. Les ribonucléoprotéines Ro dans chaque éluat étaient alors identifiées par immunoprécipitation avec des sera anti-Ro.

Les différents éluats obtenus de la colonne de DE52 étaient ensuite concentrés jusqu'à 0.5 ml environ puis appliqués sur 10.5 ml d'un gradient de sucrose 10 à 30% (poids/poids) pour être centrifugés à 35,000 tours-minute dans un rotor SW41 (Beckman) pendant 18 heures. A la fin de la centrifugation, le gradient était récolté en fractions successives de 0.5 ml chacune à partir du fond du tube. Les fractions contenant les pics des ribonucléoprotéines Ro, tel que déterminé par IPP, étaient alors fractionnées par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) à la température de la pièce dans le tampon TSE sur une colonne de tamisage

moléculaire TSK G3000 SW (600 x 7.5 mm; Phenomenex, Rancho Palos Verdes, CA) à la vitesse de 0.5 ml/min (260 psi). Les poids moléculaires de référence utilisés comportaient la thyroglobuline (669 kD), la ferritine (440 kD), la catalase (232 kD), l'aldolase (158 kD), la BSA (67 kD), le chymotrypsinogène A (25 kD), et l'uridine (0.244 kD). Les protéines obtenues de la colonne étaient récoltées en fractions de 250 µl et la présence de ribonucléoprotéines Ro était déterminée par immunoprécipitation.

2.13 Purification d'anticorps par affinité

Des anticorps anti-La ont été purifiés par immunoaffinité à partir d'un serum à haute teneur en anticorps anti-La et à faible titre d'anti-Ro, tel que déterminé par immunobuvardage (Smith et Fischer, 1984). Un extrait total de cellules HeLa fut d'abord séparé par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du SDS, et le polypeptide La fut identifié par immunobuvardage d'une section de la feuille de nitrocellulose. La bande de nitrocellulose portant le polypeptide La a alors été découpée, incubée avec un serum anti-La puis lavée abondamment. Les anticorps anti-La attachés de façon spécifique ont alors été élués avec un tampon glycine-HCl 0.2M [2.5]; le surnageant fut neutralisé avec 1/10 du volume de 2 M Tris-Cl [7.5], et son contenu en anti-La déterminé par immunoprécipitation. Les anticorps élués d'une bande de nitrocellulose contrôle (ne correspon-

dant à aucune bande visible sur l'immunoblot) ne précipitaient aucune ribonucléoprotéine à partir d'un extrait total de cellules HeLa marquées *in vivo* au [³²P]-orthophosphate.

RESULTATS

Pour faciliter la compréhension de nos résultats, nous avons choisi de les grouper en deux sections. Tout d'abord, nous rapporterons les résultats obtenus dans la caractérisation de l'autoantigène Ro et de la réponse immune qu'il suscite. Dans un deuxième temps, nous rapporterons les résultats des études cliniques que nous avons faites, tout d'abord une étude pilote, puis une étude de cohorte dans la population rhumatoïde suivie à l'UMR de l'Université de Sherbrooke.

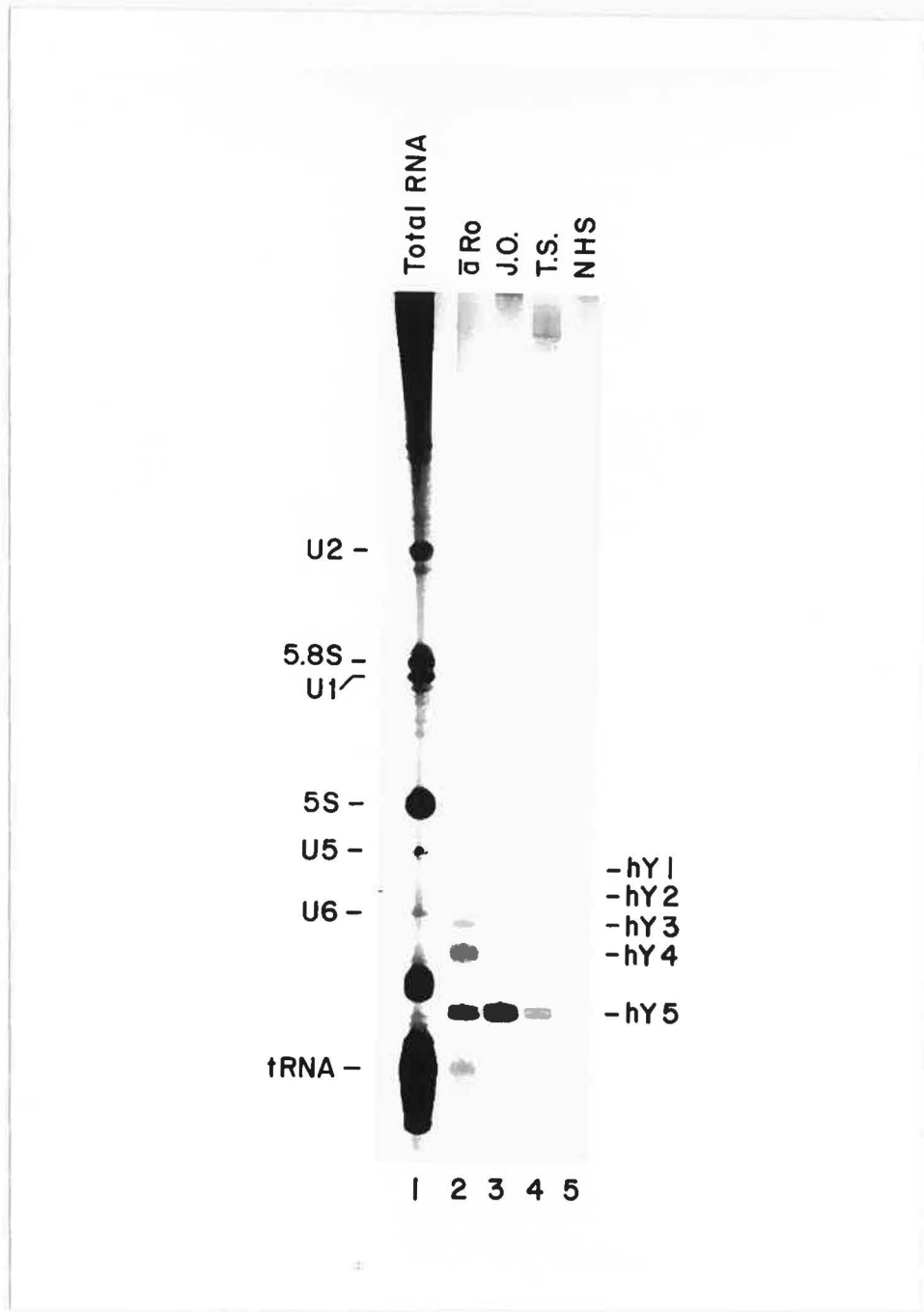
3.1 Caractérisation des autoanticorps reconnaissant la ribonucléoprotéine Ro^{hY5}

3.1.1 La ribonucléoprotéine Ro contenant l'ARN hY5 (Ro^{hY5}) est immunoprécipitée de façon spécifique

Tel que démontré antérieurement par Lerner et al. (1979) et par Hendrick et al (1981), et tel qu'illustré à la Figure 1 (seconde ligne), les anticorps anti-Ro présents dans les sera anti-Ro immunoprécipitent quatre petits ARNs, appelés hY1-hY5, à partir d'un extrait total de cellules HeLa marquées *in vivo* avec [³²P]orthophosphate. Dans ces expériences, les ARNs Ro ne sont pas visibles dans les extraits contenant tous les ARNs cellulaires (Figure 1, première ligne), et ne deviennent identifiables que par immu-

Figure 1: Des sera humains immunoprécipitent spécifiquement, à partir d'un extrait de cellules HeLa, un ARN co-migrant avec l'ARN Ro hY5 en gel de polyacrylamide.

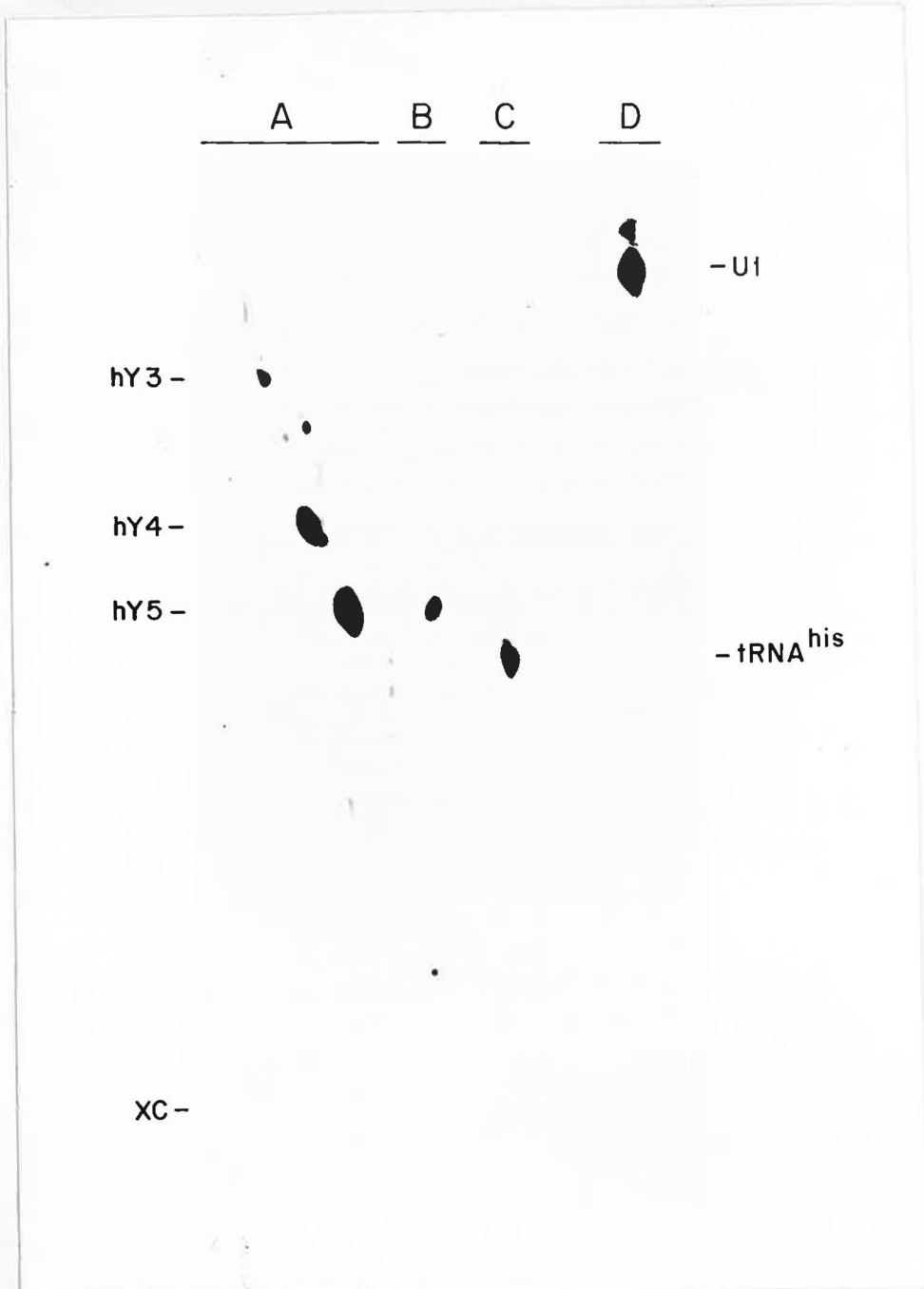
Fractionnement en gel de polyacrylamide des ARNs radiomarqués *in vivo* au [³²P] présents dans un extrait cellulaire total de cellules HeLa (ligne 1), et dans des immunoprécipités formés par un serum anti-Ro de référence (ligne 2), par les deux sera prototypes J.O. et T.S. (lignes 3 et 4), et par un serum provenant d'un individu normal (NHS) (ligne 5). Des quantités identiques de serum (5 µl) et d'extraits cellulaires (2 x 10⁶) ont été utilisées dans chacune des immunoprécipitations.



noprécipitation avec des anticorps anti-Ro. Parmi 32 sera qui contenaient seulement des anticorps anti-Ro tels que définis par la technique d'immunoprécipitation au [³²P] (i.e. ne contenant pas d'anticorps immunoprécipitant d'autres ribonucléoprotéines ou d'autres ARNs à partir d'extraits totaux de cellules HeLa), nous avons identifié deux sera provenant de patients atteints de LED (patients J.O. et T.S.), qui immunoprécipitaient sélectivement un petit ARN comigrant avec l'ARN hY5 dans des gels d'urée-polyacrylamide (Figure 1, lignes 3 et 4). Comme l'ARN hY5, cet ARN apparaît sous la forme d'un doublet serré (Figure 1, lignes 2-4). L'ARN immunoprécipité par les deux sera prototypes présentait également les mêmes caractéristiques de migration que l'ARN hY5 dans des gels de polyacrylamide en deux dimensions (Figure 2; comparez la migration dans la deuxième dimension de l'ARN immunoprécipité par le serum J.O. (ligne B) avec l'ARN hY5 immunoprécipité par un serum anti-Ro de référence (ligne A) et avec l'ARN de transfert tARN^{his} immunoprécipité par un serum anti-Jo-1 (ligne C). De plus lorsque les ribonucléoprotéines immunoprécipitées par les sera J.O. et T.S. ont été digérées par la RNase A, les fragments d'ARN protégés de l'action de l'enzyme étaient identiques aux fragments identifiés comme provenant de l'ARN hY5 lorsque les ribonucléoprotéines immunoprécipitées par un serum anti-Ro de référence ont été digérées de la même façon (donnée non illustrée). De plus, lorsque des préparations de cellules HeLa ont préalablement été déplétées de leurs

Figure 2: Fractionnement en deux dimensions en gel de polyacrylamide des ARNs immunoprécipités d'extraits de cellules HeLa marquées *in vivo* à l'aide de [³²P]orthophosphate.

Les ARNs immunoprécipités ont d'abord été séparés dans un gel 10% polyacrylamide-7 M urée, puis découpés et refractionnés dans une deuxième dimension dans un gel de polyacrylamide 18%. Les ARNs ont été obtenus par immunoprécipitation avec un serum anti-Ro de référence (ligne A), par le serum prototype J.O. (ligne B), par un serum anti-Jo-1 (anti-tARN^{his} synthétase; ligne C). L'ARN U1 provenant de l'extrait total est illustré à la ligne D. L'ARN hY5 provenant de l'immunoprécipité formé par le serum de référence anti-Ro et l'ARN précipité par le serum J.O. migrent de façon identique dans les deux dimensions. XC: xylène cyanol FF.



ribonucléoprotéines Ro par incubation avec des billes de Protéine A-sépharose recouvertes d'anticorps anti-Ro, les sera J.O. et T.S. n'immunoprécipitaient plus d'ARN de ces extraits. La spécificité de la déplétion est confirmée par la démonstration que des sera anti-U1 RNP continuent à immunoprécipiter la ribonucléoprotéine U1 de ces mêmes extraits (données non illustrées). Ces résultats confirmaient que l'ARN immunoprécipité par les deux sera prototypes J.O. et T.S. était bien l'ARN Ro hY5.

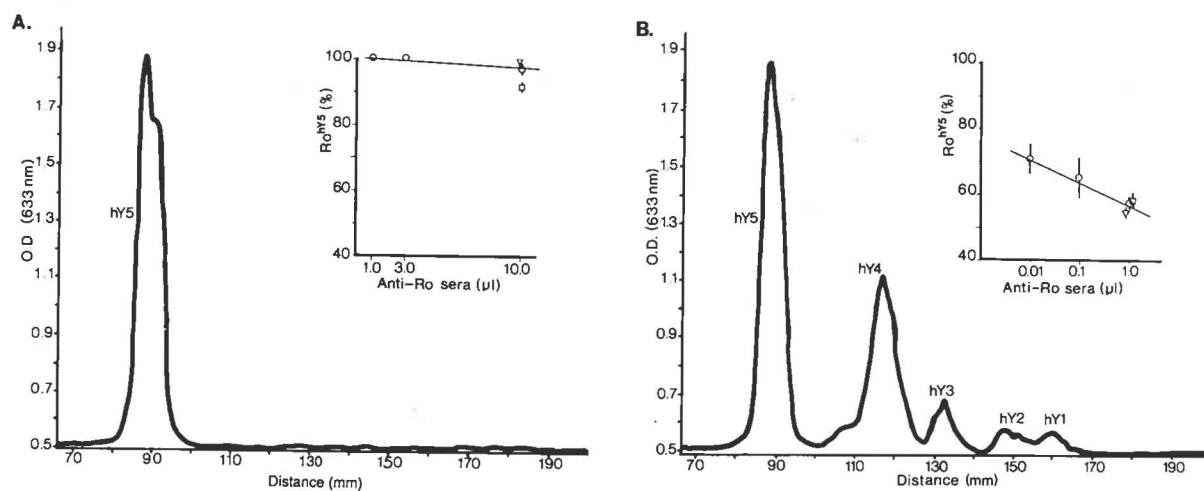
L'ARN hY5 représente la plus grande partie de la radioactivité présente dans les ribonucléoprotéines Ro immunoprécipitées par les sera Ro (comparez l'intensité de la bande correspondant à hY5 aux bandes correspondant aux ARNs hY1-hY4 dans la Figure 1, ligne 2). Il était donc possible que les sera prototypes J.O. et T.S. ne semblent être spécifiques pour Ro^{hY5} que parce qu'ils contiennent de faibles titres d'anticorps anti-Ro; dans ces conditions, seul l'ARN hY5 serait observé par autoradiographie. De fait, les deux sera ne donnaient pas de ligne de précipitine lorsque testés par immunodiffusion en gel d'agarose et les deux ne donnaient qu'une coloration cytoplasmique de faible intensité lorsqu'examinés par immunofluorescence indirecte sur des cellules Hep-2, suggérant que ces sera étaient de faible titre. Il apparaît toutefois qu'un faible titre d'anticorps anti-Ro n'explique pas la spécificité de l'immunoprécipitation de l'ARN hY5, puisque cet ARN représente plus de 90% de la radioactivité immunoprécipitée par les deux sera prototypes à

Figure 3: Détermination quantitative de l'ARN hY5 par rapport aux ARNs Ro totaux.

Les ARNs immunoprécipités à partir d'extraits de cellules HeLa radiomarquées au [³²P] ont d'abord été fractionnées dans un gel de 10% polyacrylamide-7 M urée, et les autoradiographies qui en résultaient ont été analysées par densitométrie au laser (voir la section Méthodes pour les détails).

A) Courbe correspondant à l'ARN immunoprécipité par le serum anti-Ro^{hY5} J.O.; l'ordonnée correspond à la densité optique à 633 nm et l'abscisse à la distance en mm à partir du bas du gel. La vignette montre les résultats obtenus à l'aide des deux sera anti-Ro^{hY5} J.O. et T.S.; les deux sera ont été utilisés en trois quantités variant de 1.0 à 10.0 µl par immunoprécipitation. L'ordonnée représente la surface sous la courbe de l'ARN hY5 divisée par la surface correspondant à tous les ARNs Ro (Ro^{hY5} %) et l'abscisse les quantités de sera utilisées. Dix µl des deux sera ont aussi été utilisés pour immunoprécipiter différentes quantités d'extraits cellulaires: (o) 2 x 10⁶ cellules; (▲) 2 x 10⁵ cellules; et (■) 4 x 10⁴ cellules. Les barres verticales représentent la déviation standard par rapport à la moyenne.

B) Courbe correspondant à un serum anti-Ro de référence. La vignette montre les résultats obtenus avec 4 sera anti-Ro de référence; les 4 sera ont été utilisés à des quantités variant entre 0.01 et 1.0 µl. Les barres verticales



représentent la déviation standard par rapport à la moyenne. Un μl des 4 sera a aussi été utilisé pour immunoprécipiter différentes quantités d'extraits cellulaires; les symboles correspondent à ceux définis en A).

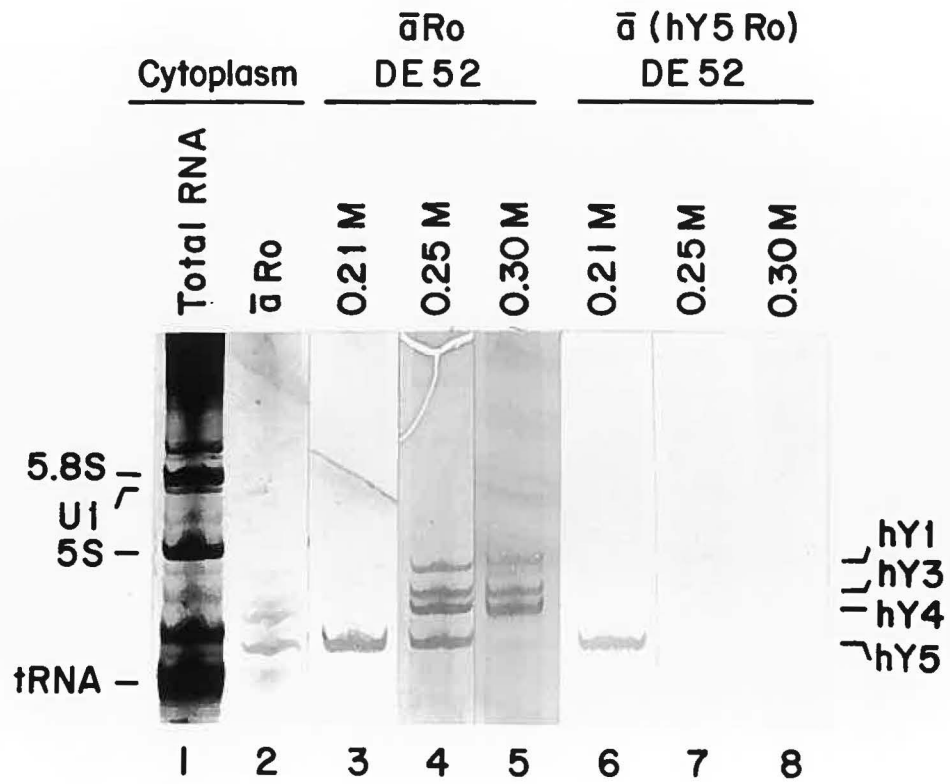
travers un éventail de dilutions des sera et à diverses concentrations d'extraits de cellules HeLa (Figure 3 A). En fait, l'ARN hY5 représente de 50 à 80% seulement de la radioactivité totale immunoprécipitée par les sera anti-Ro de référence sous toutes les conditions évaluées, les autres ARNs Ro représentant le reste de la radioactivité immunoprécipitée (Figure 3 B).

3.1.2 Purification biochimique des ribonucléoprotéines Ro

Puisque les expériences précédentes indiquaient que les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} pouvaient être reconnues spécifiquement par le système immunitaire, ces ribonucléoprotéines pouvaient donc présenter des caractéristiques particulières qui permettraient leur purification biochimique. En accord avec des études antérieures, nous avons observé que la fraction cytoplasmique de cellules HeLa, même préparée en l'absence de détergents, contient la plus grande partie des ribonucléoprotéines Ro (Kato et al., 1982). Nous avons donc fractionné ces préparations cytoplasmiques par chromatographie sur résine échangeuse d'anions. Des fractions contenant différentes ribonucléoprotéines Ro ont été obtenues par élution avec des tampons contenant des concentrations en sel de plus en plus grandes. Nous avons illustré en Figure 4 les résultats de cette expérience. Un serum anti-Ro de référence immunoprécipite les quatre ARNs Ro de

**Figure 4: Séparation biochimique des ribonucléoprotéines
Ro^{hY5} et Ro^{hY1-hY4}.**

Les échantillons correspondant à des étapes successives de purification ont été soit extraites au phénol/chloroforme et les ARNs totaux fractionnés dans un gel de 10% polyacrylamide-7 M urée (ligne 1), soit immunoprécipités à l'aide d'un serum anti-Ro de référence W.O. (lignes 2-5) ou avec le serum prototype Ro^{hY5} T.S. (lignes 6-8). Les lignes 1 et 2 se rapportent à l'extrait cytoplasmique total (les 4 ARNs Ro sont présents dans cette préparation, tel qu'illustré en 2); les lignes 3 et 6, 4 et 7, et 5 et 8 se rapportent aux fractions décrochées de la colonne de DEAE-cellulose à l'aide de 210 mM NaCl, 250 mM NaCl, et 300 mM NaCl.



préparations de cytoplasme de cellules HeLa avant la chromatographie sur résine échangeuse d'anions (Figure 4, ligne 2), mais le même serum n'immunoprécipite que l'ARN hY5 d'un extrait cellulaire élué avec un tampon contenant 210 mM NaCl (ligne 3). Les quatre ARNs Ro sont présents dans la fraction cellulaire éluée avec 250 mM NaCl (ligne 4), quoique la proportion de l'ARN hY5 soit fortement diminuée en comparaison avec les autres ARNs Ro (comparez les lignes 2 et 4). Les ARNs hY1-hY4, avec une contamination minimale de hY5, sont immunoprécipités de la fraction cellulaire éluée avec 300 mM NaCl (ligne 5). Comme on pouvait le prévoir, le serum prototype T.S. immunoprécipite l'ARN hY5 de la fraction obtenue avec 210 mM NaCl, ainsi qu'une quantité minimale de hY5 de la fraction 250 mM NaCl, mais n'immunoprécipite aucun ARN de la fraction préparée avec 300 mM NaCl (lignes 6-8).

3.1.3 Utilisation des ribonucléoprotéines Ro partiellement purifiées pour inhiber l'immunoprécipitation de la ribonucléoprotéine Ro^{hY5}

Afin de confirmer que les anticorps présents dans les sera J.O. et T.S étaient dirigés spécifiquement contre les ribonucléoprotéines Ro^{hY5}, nous avons vérifié si des ribonucléoprotéines Ro^{hY5} ou Ro^{hY1-hY4} purifiées pouvaient inhiber l'immunoprécipitation de l'ARN hY5 par ces sera. Dans ces expériences, nous avons d'abord incubé les sera avec un

excès de ribonucléoprotéines Ro non radiomarquées et partiellement purifiées. Ces sera furent par la suite utilisés pour immunoprécipiter des extraits de cellules HeLa radiomarquées *in vivo* avec [³²P]orthophosphate. Tel qu'illustré à la Figure 5, la fraction cellulaire enrichie de ribonucléoprotéines Ro^{hY5} et pauvre en ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4} (obtenue par élution avec 210 mM NaCl) inhibait complètement l'immunoprécipitation de Ro^{hY5} par le serum prototype J.O. (comparez la ligne 3 et la ligne 4). Au contraire, l'addition de la fraction cellulaire contenant surtout les ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4} (obtenue par élution avec 300 mM NaCl) n'inhibait que très partiellement l'immunoprécipitation de Ro^{hY5} par le même serum (ligne 5). Cette observation confirme donc que le serum prototype J.O. contient des anticorps spécifiques pour un épitope retrouvé seulement sur les ribonucléoprotéines Ro^{hY5}. En opposition à ces résultats, l'immunoprécipitation de tous les ARNs Ro par le serum de référence anti-Ro W.O. pouvait être presque totalement inhibée par les deux fractions cellulaires (comparez les lignes 7 et 8 à la ligne 6). Ceci indiquait que ce serum de référence contient des anticorps dirigés contre un épitope commun à toutes les ribonucléoprotéines Ro, incluant Ro^{hY5}.

Figure 5: Inhibition de l'immunoprécipitation des ARNs Ro radiomarqués au [³²P] par des fractions cellulaires non marquées enrichies soit en ribonucléoprotéines Ro^{hY5} soit en ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4}.

Les ARNs présents dans un extrait total de cellules HeLa sont illustrés en 1; un immunoprécipité formé par un serum humain provenant d'un individu normal en 2 (NHS); et les immunoprécipités formés par le serum prototype J.O. (lignes 3-5) et un serum anti-Ro de référence W.O. (lignes 6-8). Avant leur utilisation pour immunoprécipiter les extraits cellulaires radiomarqués, les deux derniers sera ont été incubés avec un excès 200x soit de la fraction cellulaire enrichie en Ro^{hY5} (lignes 4 et 7) soit de la fraction cellulaire enrichie en ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4} (lignes 5 et 8). Les lignes 3 et 6 représentent les immunoprécipités formés par les sera non modifiés.

3.1.4 Certains sera anti-Ro de référence contiennent des anticorps anti-Ro^{hY5}.

Nous avons alors voulu déterminer si les autoanticorps spécifiques pour les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} étaient fréquents. Tel qu'illustré à la Figure 6 (lignes 2-5), lorsque le serum G.L. est incubé avec des quantités croissantes de ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4}, l'immunoprécipitation des ribonucléoprotéines correspondantes est inhibée de façon préférentielle. Nous avons quantifié cette observation par étude densitométrique de l'intensité des bandes correspondant à chacun des ARNs Ro. Le pourcentage de la radioactivité correspondant à hY5 est ainsi passée de 62% dans les immunoprécipités formés par le serum G.L. en l'absence de toute préincubation à 100% dans les immunoprécipités formés après préincubation maximale (Tableau 1). Il apparaît donc que ce serum contienne une population d'anticorps reconnaissant spécifiquement les ribonucléoprotéines Ro^{hY5}. Par contre, la préincubation du serum W.O. avec les mêmes concentrations de ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4} inhibait de façon identique l'immunoprécipitation des 4 ARNs Ro (Figure 6, lignes 6-9), suggérant que ce serum ne contient pas un niveau significatif d'anticorps reconnaissant spécifiquement les ribonucléoprotéines Ro^{hY5}. Ceci est confirmé de façon quantitative par l'analyse densitométrique des autoradiographies. En effet, l'ARN hY5 constitue 50% de la radioactivité immunoprécipitée par ce serum en l'absence ou

Figure 6: Inhibition de l'immunoprécipitation des ARNs Ro radiomarqués au [32P] par des fractions cellulaires non marquées enrichies en ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4}.

Des anticorps anti-Ro^{hY5} sont présents dans des sera anti-Ro de référence. Les immunoprécipités formés par deux sera anti-Ro de référence (le serum G.L. aux lignes 2-5; le serum W.O. aux lignes 6-9) et le serum prototype J.O. (lignes 10-13) sont illustrés. Aucun inhibiteur n'a été ajouté dans les lignes 2, 6, et 10. L'inhibiteur a été ajouté à des excès 10x (lignes 3, 7, et 11), 100x (lignes 4, 8, et 12), et 400x (lignes 5, 9, et 13) par rapport à la quantité d'extraits cellulaires radiomarqués au [32P]. La ligne 1 représente les ARNs présents dans un extrait total de cellules radiomarquées.

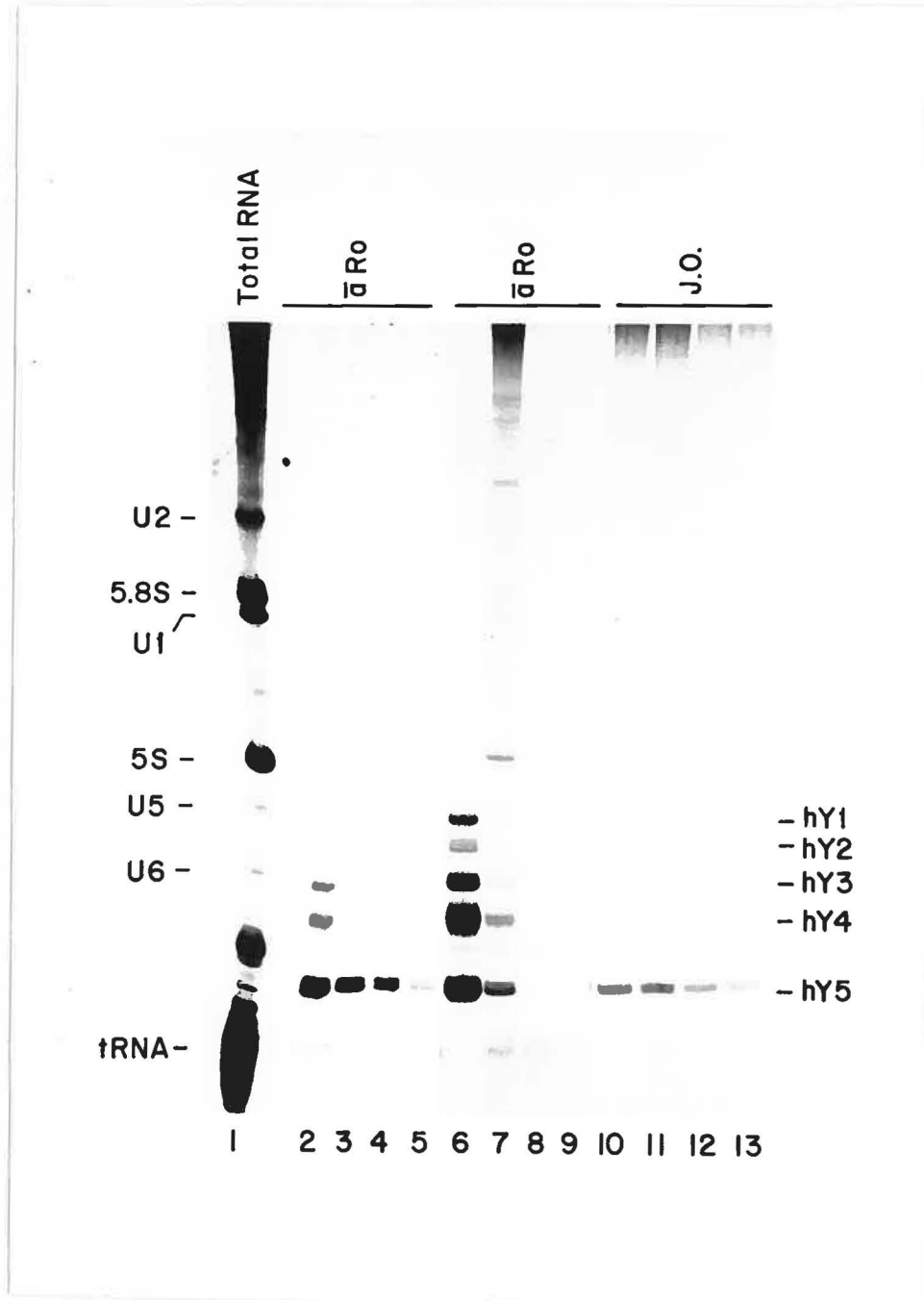


TABLEAU 1

DETECTION DES ANTICORPS ANTI-RO^{hY5} DANS LES SERA ANTI-RO

Sera	Ro ^{hY5} %			
	§Quantité d'inhibiteur Ro ^{hY1-hY4}			
	0	10	100	400
G.L.	62	87	99	100
S.A.	63	ND*	ND	100
C.M.	52	ND	ND	90
S.C.	55	ND	ND	91
W.O.	50	52	50	--
A.S.	57	44	47	52
J.O.	100	100	100	100
T.S.	100	100	100	100

§ exprimée en excès d'extrait non radiomarqué par rapport à l'extrait de cellules radiomarquées.

* Non fait

-- Indétectable.

Les sera anti-Ro G.L., S.A., C.M., S.C., W.O. et A.S. immunoprécipitent les 4 ARNs Ro à partir d'extraits de cellules HeLa radiomarquées au [³²P] lorsqu'ils ne sont pas incubés avec des ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4} utilisées comme inhibiteur. Les sera J.O. et T.S. immunoprécipitent seulement l'ARN hY5 des mêmes extraits radiomarqués.

Ro^{hY5} % représente la surface sous la courbe obtenue par densitométrie des autoradiogrammes correspondant à l'ARN hY5, divisée par la somme des surfaces correspondant aux 4 ARNs Ro x 100%.

en présence de faibles concentrations de ribonucléoprotéines $Ro^{hY1-hY4}$, l'immunoprécipitation des 4 ARNs devenant totalement inhibée lors de l'utilisation de fortes concentrations d'inhibiteur (Tableau 1). L'immunoprécipitation de l'ARN $hY5$ par le serum J.O., par contre, n'est jamais complètement inhibée même par de fortes concentrations de ribonucléoprotéines $Ro^{hY1-hY4}$ (Figure 6, lignes 10-13. Tableau 1).

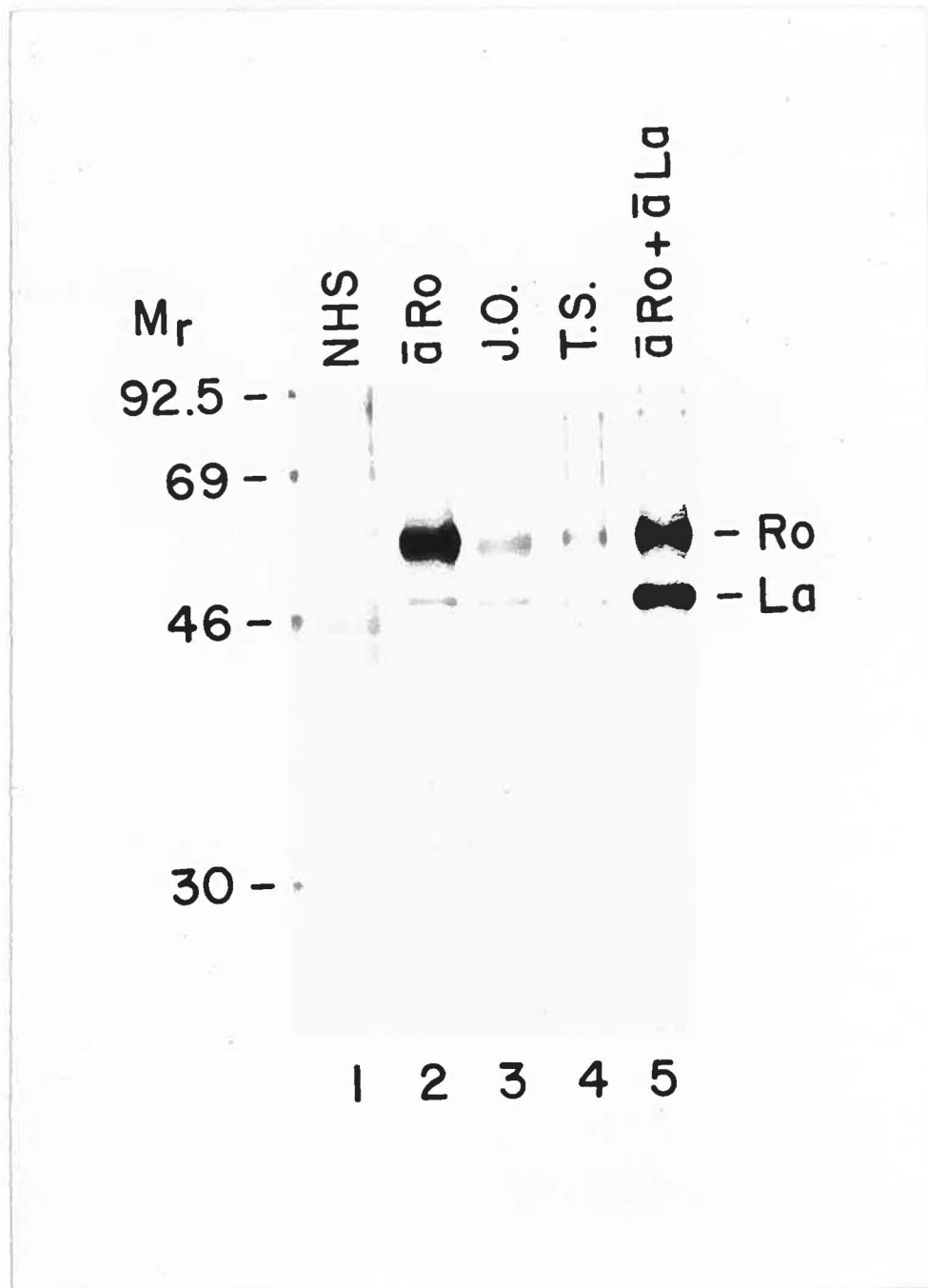
Des six sera anti-Ro testés, quatre continuent d'immunoprécipiter l'ARN $hY5$ même après inhibition complète de leur capacité d'immunoprécipiter les ribonucléoprotéines $Ro^{hY1-hY4}$ (sera G.L., S.A., C.M., et S.C., Tableau 1). Ces quatre sera contiennent donc des anticorps spécifiquement dirigés contre les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} . Par contre, deux sera (W.O. et A.S., Tableau 1) ne semblent pas contenir ce type d'autoanticorps. Il est toutefois important de noter que des sera qui contiennent de faibles titres d'anticorps anti- Ro^{hY5} pourraient donner des résultats faussement négatifs dans ce type d'expérience puisque notre préparation de ribonucléoprotéines $Ro^{hY1-hY4}$ contenait une faible quantité de ribonucléoprotéines Ro^{hY5} contaminantes (voir Figure 4, ligne 5).

3.1.5 L'épitope autoantigénique spécifique aux ribonucléoprotéines Ro^{hY5} dépend à la fois de la présence de la composante protéinique et de l'ARN hY5

Comme c'est le cas pour la majorité des anticorps antinucléaires décrits jusqu'à présent, tous les sera anti-Ro semblent reconnaître la portion protéinique des ribonucléoprotéines. Nous avons confirmé ce fait puisque aucun des deux sera prototypes anti-Ro^{hY5} n'immunoprécipite l'ARN hY5 d'extraits cellulaires dont les protéines ont été détruites soit par extraction au phénol soit par digestion à la protéinase K (résultats non illustrés). Cette observation suggère que l'épitope spécifique aux ribonucléoprotéines Ro^{hY5} est au moins partiellement constitué de la composante protéinique. De plus, les deux sera immunoprécipitent le polypeptide Ro de 60 kD d'extraits cellulaires marqués *in vivo* avec la [³⁵S]méthionine (Figure 7, lignes 3 et 4). Toutefois ces deux sera ne reconnaissent pas les polypeptides Ro humains ou bovins purifiés par immunoaffinité, soit en double immunodiffusion en gel d'agarose (résultats non illustrés), soit en immunobuvardage (résultats non illustrés). Ceci suggère donc que l'épitope spécifique à Ro^{hY5} nécessite la présence de l'ARN hY5 sur le polypeptide Ro pour son expression.

Figure 7: Immunoprécipitation d'extraits de cellules HeLa marquées *in vivo* à l'aide de [³⁵S]méthionine.

Les immunoprécipités sont formés à partir d'un serum provenant d'un individu normal (NHS, ligne 1), d'un serum anti-Ro monospécifique de référence (W.O., ligne 2), des sera prototype anti-Ro^{hy5} J.O. et T.S. (lignes 3 et 4), et d'un serum avec des anticorps anti-Ro et anti-La (lignes 5). Les polypeptides Ro de 60 kD et La de 50 kD sont identifiés. M_r = poids moléculaire multiplié par 10^{-3} .



3.1.6 Le déterminant antigénique présent sur les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} n'est présent que sur les ribonucléoprotéines Ro humaines

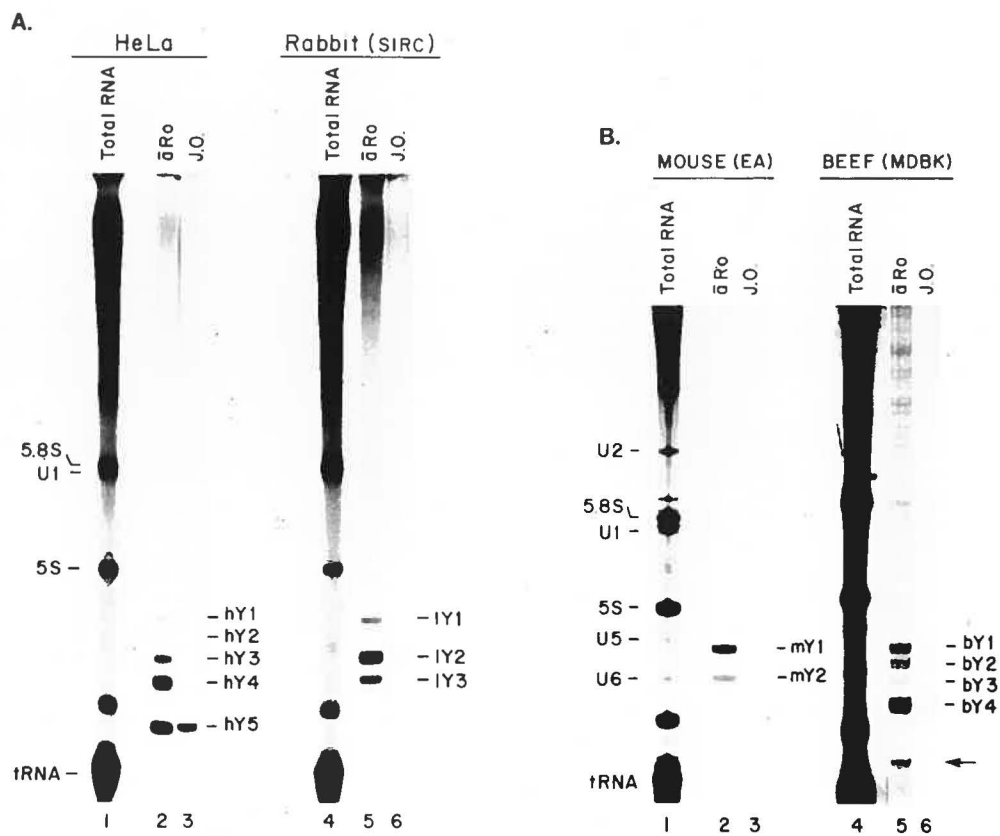
Wolin et Steitz (1983) ont démontré que les cellules de souris ne contiennent que deux ARNs Ro, appelés mY1 et mY2, qui présentent une homologie de séquence significative avec les ARNs hY1 et hY3 des cellules humaines. Les ARNs Ro de la souris ne présentent pas le même degré d'homologie avec l'ARN hY5. De leur côté, les cellules de lapin et de boeuf contiennent respectivement trois et quatre ARNs associés aux ribonucléoprotéines Ro, mais leurs éventuelles similarités structurelles avec les ARNs hY1-hY5 restent inconnues. Tel qu'illustré à la Figure 8, les sera anti-Ro de référence immunoprécipitent quatre ARNs d'extraits de cellules humaines (section A, ligne 2), trois d'extraits de cellules de lapin (section A, ligne 5), deux d'extraits de cellules de souris (section B, ligne 2), et quatre d'extraits de cellules de boeuf (section B, ligne 5). Au contraire, tel qu'illustré par la serum J.O., les sera reconnaissant spécifiquement les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} n'immunoprécipitent aucun ARN de ces trois lignées cellulaires animales (section A, ligne 6; section B, lignes 3 et 6). Il semble donc que l'épitope spécifique aux ribonucléoprotéines Ro^{hY5} n'est pas présent sur les ribonucléoprotéines Ro d'espèces autres qu'humaines, qui par ailleurs ne

Figure 8: Immunoprécipitation des ribonucléoprotéines marquées au [³²P] à partir de plusieurs lignées cellulaires de mammifères.

A) Cellules HeLa humaines et SIRC de lapin

B) Cellules d'ascite Ehrlich de souris et MDBK de boeuf.

Les ARNs présents dans les extraits cellulaires totaux sont illustrés en 1 et 4 (A et B). Les immunoprécipités formés par le serum anti-Ro de référence W.O. sont illustrés en lignes 2 et 5 (A et B); ce serum précipite 4 ARNs de cellules humaines (hY1-hY5), 3 des cellules de lapin (lY1-lY3), 2 des cellules de souris (mY1 et mY2), et 4 des cellules de boeuf (bY1-bY4) (Mamula et al., 1989). Aucune des lignées animales ne contient un ARN qui co-migre avec l'ARN hY5. Le serum J.O. ne précipite aucun ARN des lignées cellulaires non-humaines (ligne 6, A; lignes 3 et 6, B), bien qu'il immunoprécipite l'ARN hY5 d'extraits de cellules HeLa (ligne 3, A). Des résultats similaires ont été obtenus à l'aide du serum T.S.. Les sections A et B proviennent de gels différents. La flèche en B indique un probable produit de dégradation des ARNs Ro bovins, puisque cet ARN n'était pas immunoprécipité dans d'autres expériences semblables.



semblent donc pas contenir d'équivalent à cette ribonucléoprotéine.

3.2 Caractérisation des ribonucléoprotéines Ro

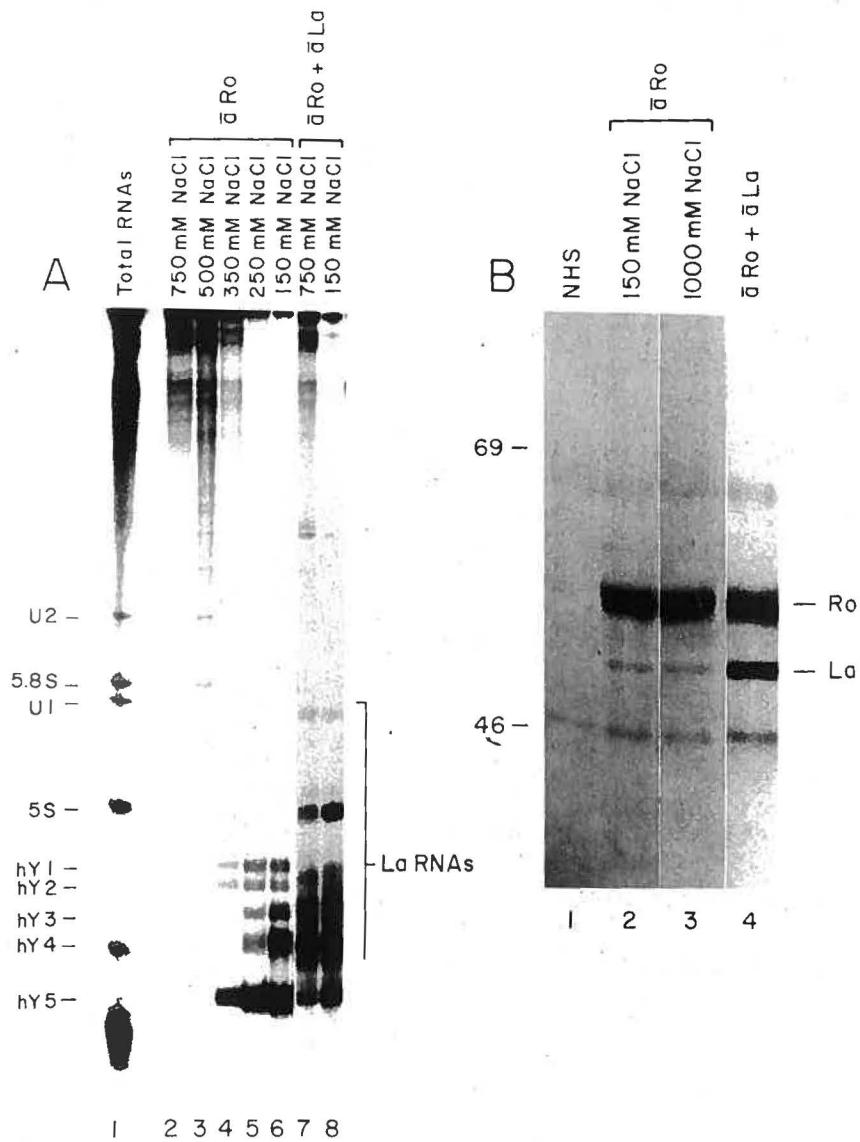
3.2.1 Les ARNs Ro se dissocient de la protéine Ro de 60 kD en tampon de force ionique élevée

Au cours d'expériences préliminaires pour définir les conditions optimales de purification permettant la préparation de ribonucléoprotéines Ro intactes, nous avons utilisé des tampons de force ionique croissante. Tel qu'illustré à la Figure 9A, des concentrations relativement faibles de sels dissocient les ARNs Ro de la protéine Ro de 60 kD. Des sera anti-Ro spécifiques pour le polypeptide de 60 kD ne pouvaient plus immunoprécipiter les ARNs Ro d'extraits cellulaires contenant 500 mM NaCl (Figure 9A, comparez les lignes 3 et 6). Cette incapacité ne résulte pas de la perte de l'affinité des anticorps pour le polypeptide lui-même puisque l'intensité de la bande correspondant au polypeptide de 60 kD immunoprécipité d'extraits cellulaires marqués *in vivo* à la [³⁵S]méthionine ne semble pas diminuer même lorsqu'obtenue à partir de tampons contenant jusqu'à 1 M NaCl (Figure 9B; comparez la ligne 2 à la ligne 3). Les ribonucléoprotéines Ro ne se dissocient pas toutes de façon identique en présence de tampons de force ionique élevée: les ARNs hY3 et hY4 sont complètement dissociés du

Figure 9: Immunoprécipitation des ribonucléoprotéines Ro à partir d'extraits de cellules HeLa maintenus dans des concentrations croissantes de NaCl.

Section A. Immunoprécipitation d'extraits radiomarqués au [³²P] à l'aide d'un serum anti-Ro (lignes 2-6) et d'un serum contenant à la fois de l'anti-Ro et de l'anti-La (lignes 7 et 8). Les immunoprécipitations étaient faites dans un tampon NET-2 modifié à l'aide de NaCl 4 M de façon à ce que sa concentration finale en NaCl soit 150 mM (lignes 6 et 8), 250 mM (ligne 5), 350 mM (ligne 4), 500 mM (ligne 3, et 750 mM (lignes 2 et 7). La ligne 1 représente les ARNs présents dans un extrait cellulaire total.

Section B. Immunoprécipitation d'extraits cellulaires radiomarqués à l'aide de [³⁵S]méthionine. Serum provenant d'un individu normal (NHS, ligne 1), serum anti-Ro (lignes 2 et 3) et serum anti-Ro et anti-La (ligne 4). Les immunoprécipitations étaient faites dans un tampon NET-2 contenant 150 mM NaCl (lignes 1, 2 et 4) ou 1000 mM NaCl (ligne 3). Les bandes correspondant aux polypeptides Ro de 60-kD et La de 50-kD sont indiquées. Aucune bande correspondant à une protéine de 52-kD n'est visible avec ces sera. Les bandes observées à 45 et 65 kD sont non spécifiques puisqu'elles sont observées aussi bien avec le serum normal. Les marqueurs de poids moléculaire utilisés étaient l'albumine sérique bovine (69 kD) et l'ovalbumine (46 kD) toutes deux marquées au [¹⁴C].



polypeptide de 60 kD en présence de 350 mM NaCl, alors que les ARNs hY1 et hY5 ne sont que partiellement dissociés dans un tampon de même force ionique (Figure 9A, ligne 4). La présence d'EDTA à des concentrations de l'ordre du millimolaire dans les tampons semblant stabiliser légèrement l'interaction ARN-protéine Ro (résultats non illustrés), nous avons par la suite ajouté 1 mM EDTA à tous les tampons.

La dissociation lors de l'exposition à des tampons de force ionique élevée est une caractéristique des ribonucléoprotéines Ro puisque l'immunoprécipitation des ARNs La par des sera anti-La n'est pas affectée de façon significative même en présence de 750 mM NaCl (Figure 9A; comparez la ligne 7 à la ligne 8). De façon intéressante, en présence de concentrations en sel qui provoquent la dissociation de tous les ARNs Ro du polypeptide Ro de 60 kD, un serum anti-La continue à immunoprécipiter un ARN co-migrant avec l'ARN hY5; les ARNs qui semblent correspondre aux ARNs Ro hY1 et hY2 (qui est un produit de dégradation de hY1) semblent avoir disparu (Figure 9A; comparez la ligne 7 à la ligne 8).

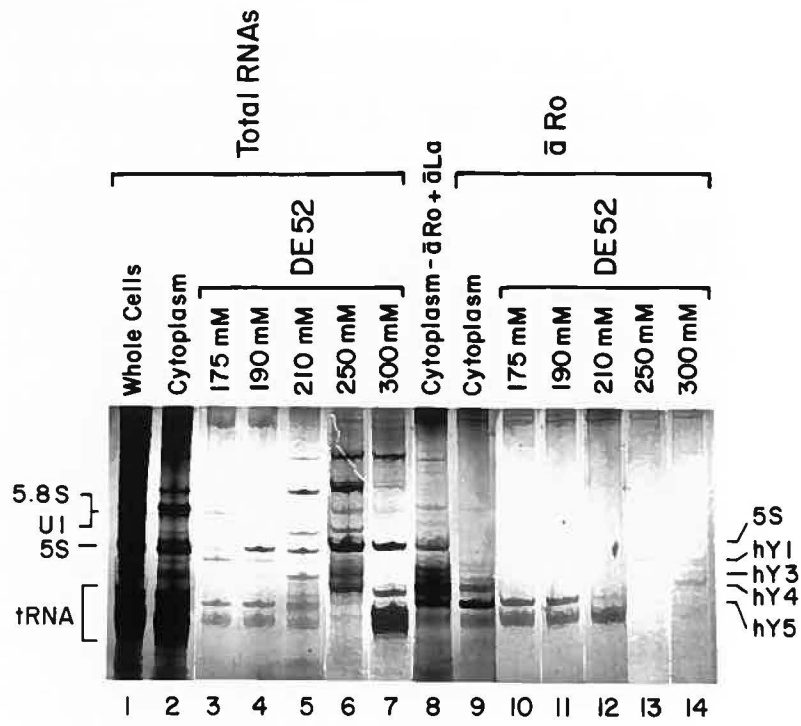
3.2.2 Trois populations de ribonucléoprotéines Ro peuvent être purifiées biochimiquement à partir d'extraits de cellules HeLa

Comme l'ont rapporté Kato et al (1982), plus de 90% des ribonucléoprotéines Ro se retrouvent dans la fraction cytoplasmique de cellules HeLa préparée en l'absence de détec-

gent (résultats non illustrés). La fraction cytoplasmique ainsi obtenue est d'abord chargée sur une colonne de résine échangeuse d'anion (DE52, Whatman), la colonne est lavée abondamment, puis le matériel retenu est élué par des gradients discontinus de sel. Tel qu'illustré dans la Figure 10, et comme décrit plus haut, les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} sont éluées d'abord avec 175 et 190 mM NaCl (lignes 3 et 4, lignes 10 et 11), un groupe de ribonucléoprotéines contenant les 4 ARNs Ro ($Ro^{hY1-hY5}$) est élué entre 210 et 250 mM NaCl (lignes 6 et 13), et enfin les ribonucléoprotéines contenant les ARNs hY1, hY3 et hY4 ($Ro^{hY1-hY4}$) sont éluées entre 250 et 300 mM NaCl (lignes 7 et 14). Les ARNs Ro présents dans chacune de ces fractions ont été immunoprécipités par un serum qui reconnaît le polypeptide Ro de 60 kD (lignes 10-14), ce qui démontre que ce polypeptide forme bien un complexe avec les ARNs. Les ribonucléoprotéines Ro ne sont toutefois pas obtenues à l'état pur. Des ARNs ribosomiaux 5S ainsi que des ARNs de transfert (tARN) sont présents dans chacune des fractions; toutefois il est remarquable que l'ARN hY5 et les ARNs La représentent les ARNs prédominants dans les fractions obtenues respectivement entre 175 et 190 mM NaCl et entre 210 et 250 mM NaCl (Figure 10, lignes 3 et 4, et ligne 6). Deux populations de ribonucléoprotéines Ro sont donc déjà apparentes: les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} et les ribonucléoprotéines $Ro^{hY1-hY4}$. L'existence d'une troisième population de ribonucléoprotéines contenant les quatre ARNs Ro et qui serait obtenue par élution entre 210

Figure 10. Purification des ribonucléoprotéines Ro sur résine échangeuse d'anion DEAE-cellulose.

Les ARNs totaux présents dans les différentes fractions sont illustrés dans les lignes 1-7. Pour aider l'identification des ARNs, des immunoprécipités formés par un serum anti-Ro et anti-La (ligne 8) et un serum anti-Ro (lignes 9-14) sont aussi illustrées. Ligne 1: ARNs présents dans l'extrait cellulaire total; lignes 2, 8, et 9: ARNs de la fraction cytoplasmique; lignes 3 et 10: fraction à 175 mM NaCl; lignes 4 et 11: fraction à 190 mM NaCl; lignes 5 et 12: fraction à 210 mM NaCl; lignes 6 et 13: fraction à 250 mM NaCl; lignes 7 et 14: fraction à 300 mM NaCl.



et 250 mM NaCl pourrait tout simplement résulter d'une contamination de chacune des deux autres populations. Toutefois, il n'est pas exclu que ces ribonucléoprotéines représentent une entité qui contient les quatre ARNs Ro en quantité approximativement équimolaire.

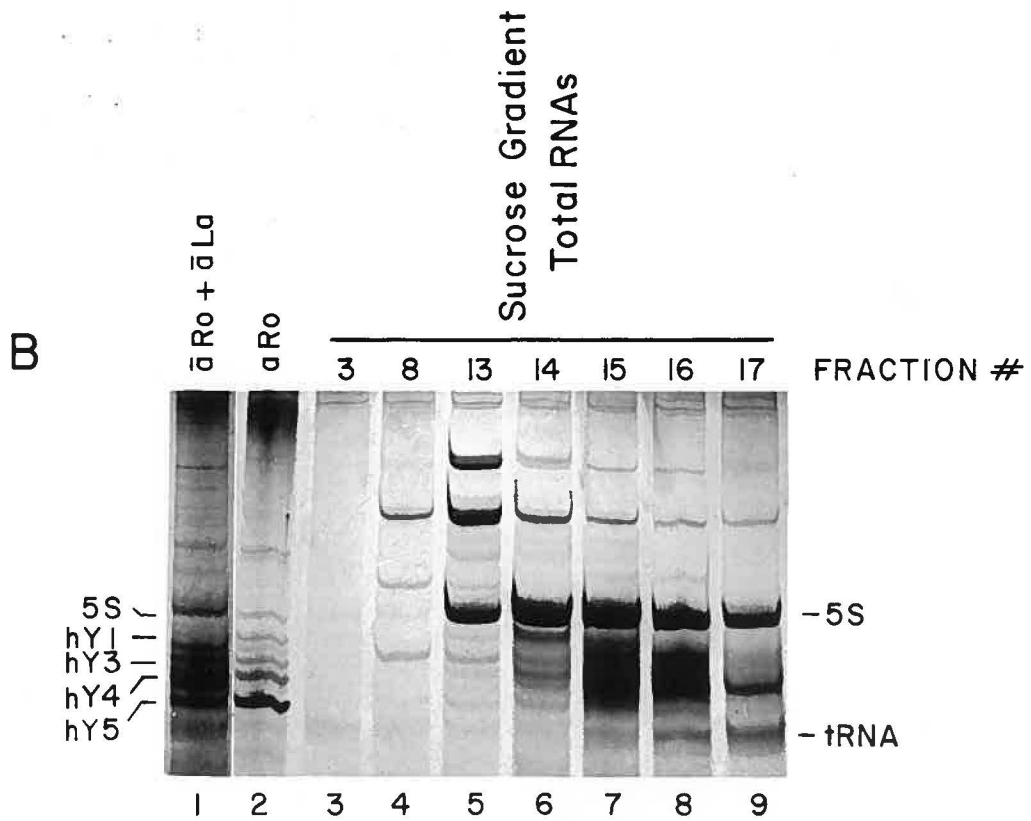
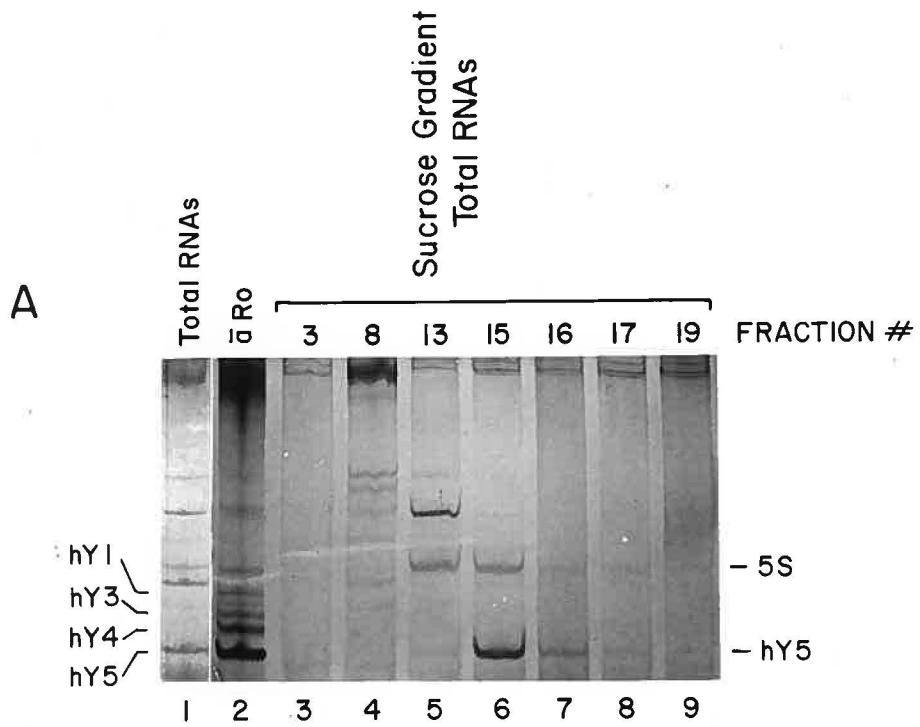
Les trois fractions obtenues de la colonne de DE52 sont alors concentrées jusqu'à 500 μ l par dialyse sous vide. Elles sont ensuite déposées séparément sur des gradients de sucrose 10-30% (poids:poids) et soumis à une ultracentrifugation. Les ribonucléoprotéines Ro^{hY5}, provenant de la fraction obtenue avec 175 mM NaCl, sédimentent pour former un seul pic où le contaminant majeur est l'ARN 5S (Figure 11A, ligne 6); dans la fraction du gradient contenant Ro^{hY5} l'ARN 5S n'est pas immunoprécipité par un serum anti-La (résultats non illustrés), suggérant que ce contaminant n'est pas présent sous la forme d'une ribonucléoprotéine contenant la protéine La. Les ribonucléoprotéines Ro présentes dans la fraction obtenue avec 250 mM NaCl semblent sédimenter légèrement plus rapidement que les ribonucléoprotéines La (Figure 11B, comparez les lignes 5 et 6 aux lignes 7 et 8). Ceci est confirmé lorsque les fractions successives du gradient sont évaluées par immunoprécipitation avec un serum anti-Ro et un serum anti-La, tel qu'illustré à la Figure 11C (à noter que le pic des ribonucléoprotéines Ro se trouve dans les tubes 14 et 15, alors que le pic des ribonucléoprotéines La se retrouve dans les tubes 16 et 17). Cependant il semble qu'une population de ribonucléoprotéines Ro^{hY4}

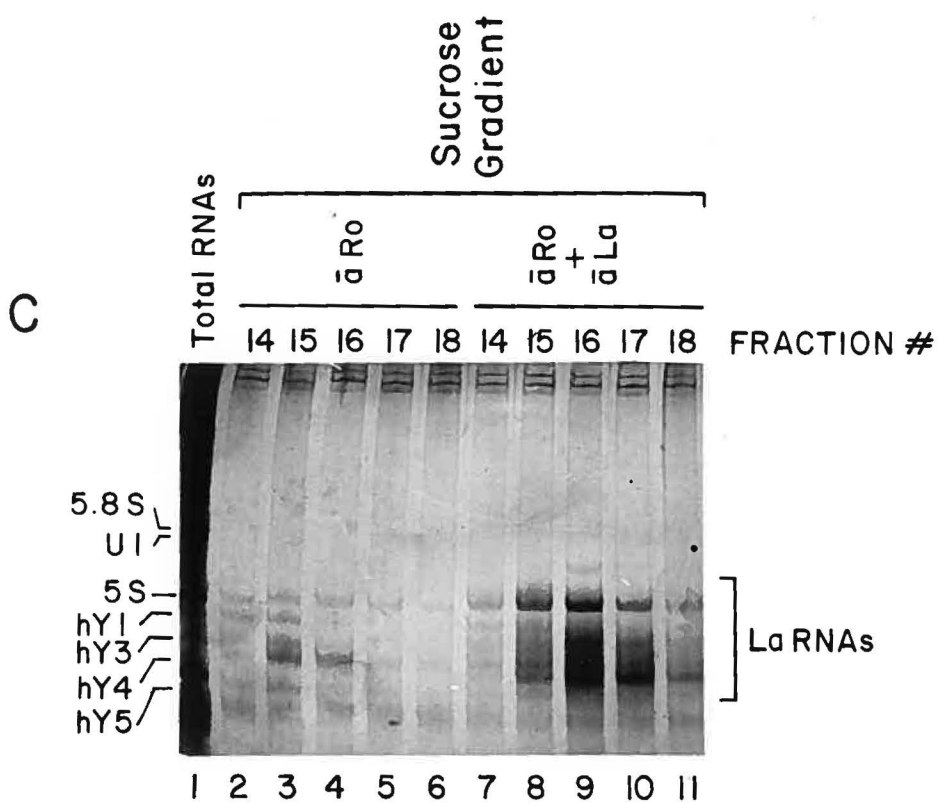
Figure 11. Ultracentrifugation des ribonucléoprotéines Ro à travers un gradient de sucrose.

Section A. Les ARNs totaux présents dans les fractions successives du gradient obtenu à partir de la fraction éluée de la résine DEAE-cellulose avec 175 mM NaCl. La ligne 1 illustre les ARNs totaux présents dans la fraction à 175 mM, et la ligne 2 illustre un immunoprécipité obtenu à partir d'un extrait cytoplasmique total utilisant un serum anti-Ro de référence. Les fractions consécutives 1 à 22 ont été récoltées à partir du fond du tube; les ARNs présents dans des fractions représentatives sont illustrées.

Section B. ARNs totaux présents dans les fractions successives du gradient formé à partir de la fraction éluée de la résine DEAE-cellulose avec 250 mM NaCl.

Section C. Immunoprécipités formés par un serum anti-Ro de référence (lignes 2-6) et un serum anti-La (lignes 7-11). Les fractions du gradient correspondent à celles de la section B.





sédimente avec le pic des ribonucléoprotéines La (Figure 11C, lignes 4 et 9), suggérant que les ribonucléoprotéines Ro^{hY4} pourraient représenter une troisième population de ribonucléoprotéines Ro, s'ajoutant aux Ro^{hY5} et à la population de ribonucléoprotéines qui contient les ARNs hY1, hY3, et hY4. Enfin il est à noter que l'apparition d'une population contenant uniquement l'ARN hY4 ne résulte pas de la dissociation *in vitro* de cet ARN du polypeptide Ro de 60 kD puisque les ribonucléoprotéines Ro^{hY4} peuvent être immunoprécipitées par un serum qui reconnaît la protéine Ro de 60 kD.

Les pics des ribonucléoprotéines Ro obtenues par sédimentation à travers un gradient de sucrose sont ensuite fractionnés par tamisage moléculaire sur une colonne HPLC. A nouveau les ribonucléoprotéines Ro^{hY4} se sont comportées différemment des autres ribonucléoprotéines Ro (Figure 12). Alors que le rayon de Stokes des ribonucléoprotéines Ro^{hY5} et $Ro^{hY1-hY4}$ est compatible avec celui d'une protéine globulaire de 300 à 350 kD, celui des ribonucléoprotéines Ro^{hY4} est plutôt compatible avec une protéine de 230 kD. Les ribonucléoprotéines Ro^{hY4} sont éluées avec le gros des ribonucléoprotéines La (résultats non illustrés), ce qui est compatible avec leur co-sédimentation dans les gradients de sucrose. Après l'étape de purification par HPLC, les fractions contenant les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} ne contiennent essentiellement pas d'autre ARN visible sur les gels des fractions extraites au phénol/chloroforme (Figure 13 A, lignes 4 et 5), quoique plusieurs polypeptides soient encore

Figure 12. Chromatographie de perméation moléculaire à haute pression (HPLC) des fractions de gradient de sucrose correspondant aux pics des ribonucléoprotéines Ro.

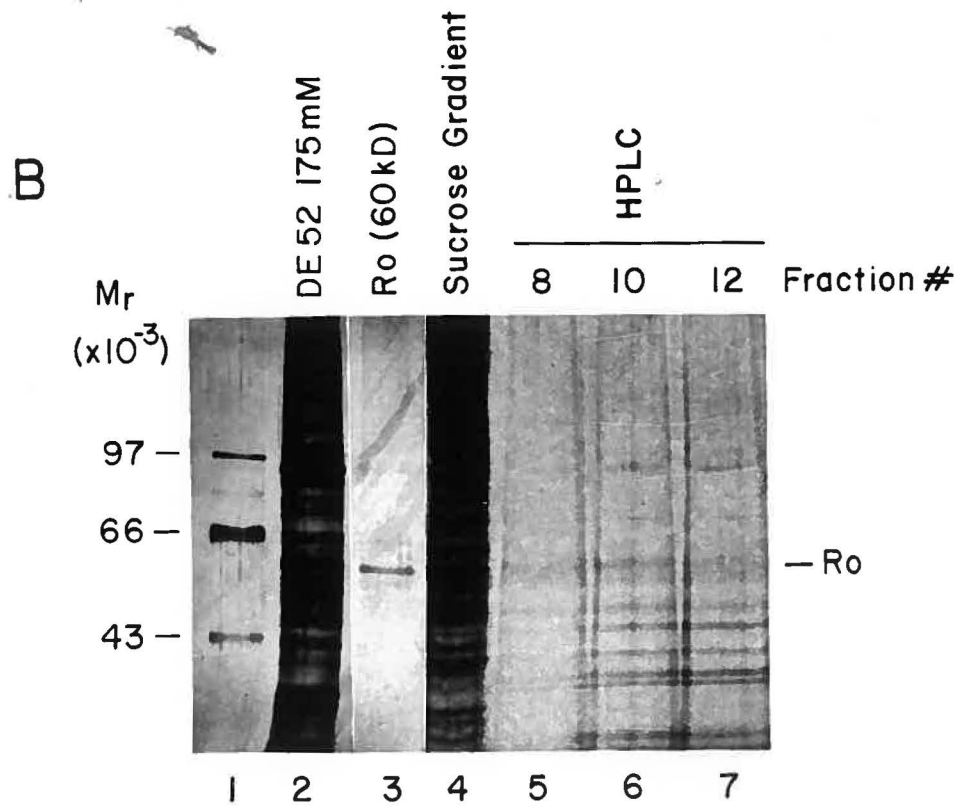
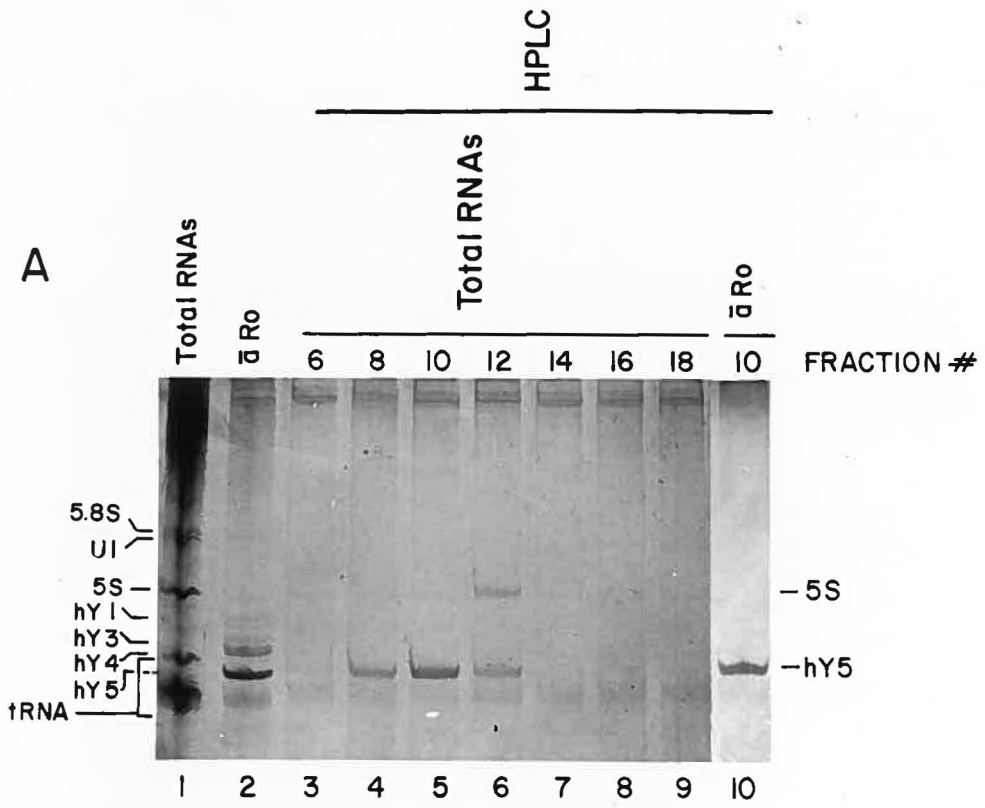
L'élution des substances de poids moléculaires de référence est illustrée (BSA = albumine sérique bovine; kD: kilodaltons). L'abscisse représente la fraction. Le profil d'élution des ribonucléoprotéines Ro^{hY5}, Ro^{hY4} et Ro^{hY1-hY4} est illustré en ordonnée.

(-) indique que l'ARN était indétectable par immunoprécipitation; (+) qu'il était faiblement détecté; (++) clairement détecté; et (+++) intensité maximale. Les espaces laissés libres indiquent les fractions qui n'ont pas été évaluées par immunoprécipitation.

Figure 13. Purification finale de ribonucléoprotéines**Ro^{hy5}.**

Section A. Les ARNs totaux présents dans les fractions successives obtenues par chromatographie de perméation moléculaire à haute pression (HPLC) contenant les ribonucléoprotéines Ro^{hy5} purifiées. La ligne 1 illustre les ARNs totaux présents dans un extrait cytoplasmique, et la ligne 2 montre les ARNs immunoprécipités de cet extrait par un serum anti-Ro de référence. Les fractions sont numérotées à partir de la première fraction éluée après le volume mort de la colonne. La ligne 10 illustre les ARNs immunoprécipités à partir de la fraction 10 en utilisant un serum anti-Ro de référence.

Section B. Gel de polyacrylamide coloré au nitrate d'argent. Les protéines présentes dans la fraction éluée de la colonne de DEAE-cellulose à l'aide de 175 mM NaCl (ligne 2), dans la fraction du gradient de sucrose contenant le pic des Ro^{hy5} (ligne 4), et dans la fraction du HPLC contenant le pic de ribonucléoprotéines Ro^{hy5} (lignes 5-7). La quantité d'extraits dans chaque puits provient d'approximativement un nombre équivalent de cellules. La ligne 3 illustre le polypeptide Ro de 60 kD purifié par affinité à partir de placenta humain.



présents dans ces fractions (Figure 13B, lignes 5 et 6). Les fractions contenant les ribonucléoprotéines $Ro^{hY1-hY4}$ et Ro^{hY4} restent fortement contaminées par des ribonucléoprotéines La, ceci même après l'étape de purification par HPLC.

3.2.3 Caractérisation des ribonucléoprotéines Ro purifiées

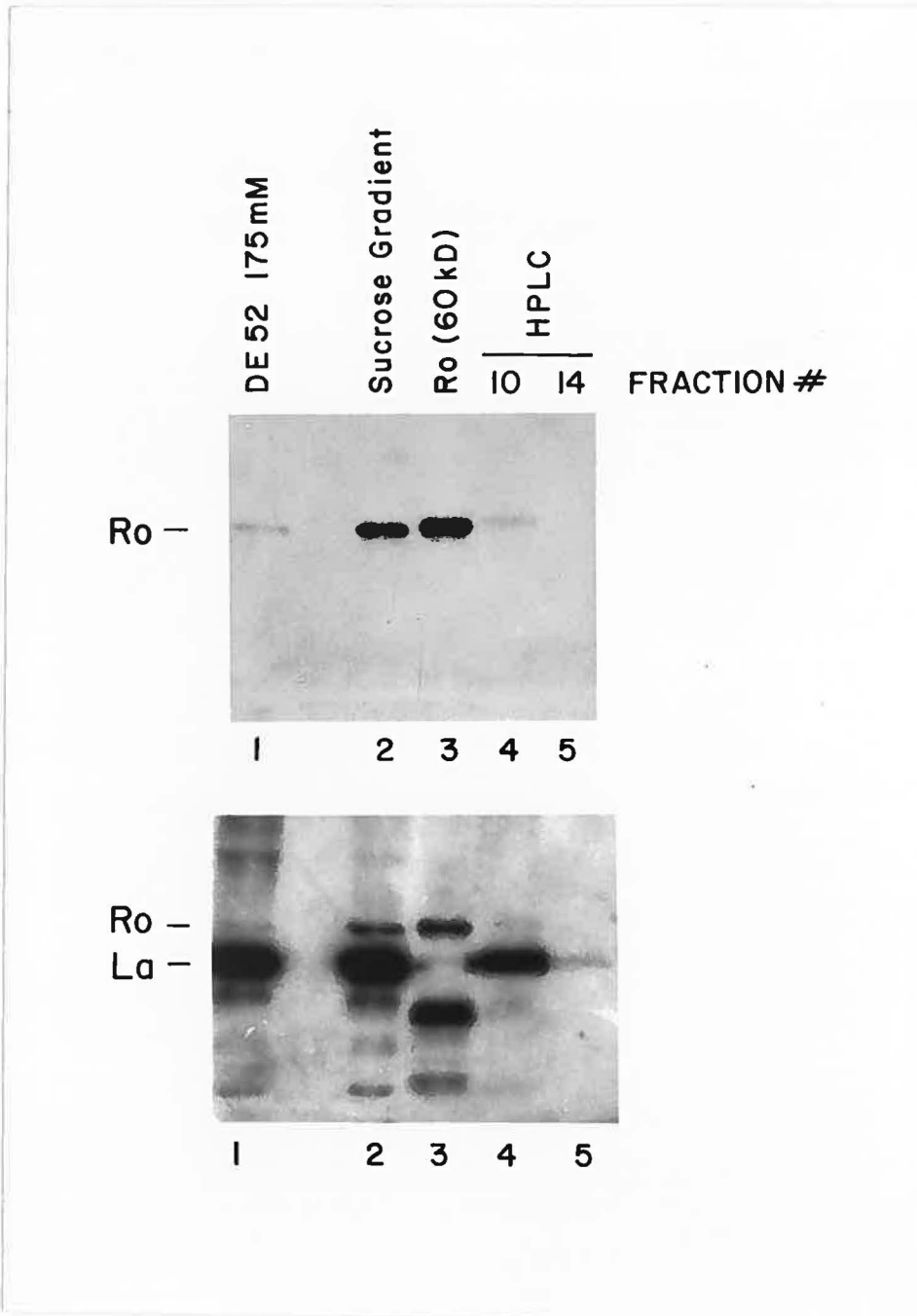
Après chaque étape de purification, les ARNs Ro ont été immunoprécipités avec des sera spécifiques pour le polypeptide Ro de 60 kD. Ceci signifie que cette protéine est restée attachée aux ARNs à travers toutes les étapes de purification. Pour le confirmer, nous avons évalué par immunobuvardage, utilisant des sera anti-Ro et des sera anti-La, les fractions obtenues de la colonne de tamisage moléculaire HPLC contenant les pics des ribonucléoprotéines Ro^{hY5} , $Ro^{hY1-hY4}$, et Ro^{hY4} . De ces expériences, il résulte que le polypeptide Ro de 60 kD (Figure 14, panneau du haut, ligne 4) et le polypeptide La de 50 kD (Figure 14, panneau du bas, ligne 4) sont tous deux présents dans les fractions contenant les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} . De plus, la quantité de ces protéines dans les fractions semble suivre en parallèle la quantité de ribonucléoprotéines Ro^{hY5} présente dans des fractions successives (comparez la Figure 13A, lignes 5 et 7 à la Figure 14, lignes 4 et 5). Ces fractions ne contiennent pas d'ARNs La contaminants, suggérant que le polypeptide La est associé de façon stable avec les ribonu-

Figure 14. Immunobuvardage des protéines présentes dans les fractions contenant les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} purifiées par HPLC.

Section du haut. La feuille de nitrocellulose a été incubée avec un serum anti-Ro monospécifique (1:100).

Section du bas. La feuille de nitrocellulose provenant de la section A a été réincubée avec un serum anti-La de titre élevé (1:200).

Dans chaque panneau, la ligne 1 représente la fraction éluée de la colonne de DEAE-cellulose avec 175 mM NaCl, la ligne 2 la fraction du gradient de sucrose préparé à l'aide de la fraction 175 mM NaCl contenant le pic des ribonucléoprotéines Ro^{hY5}, la ligne 3 le polypeptide Ro de 60 kD purifié par affinité à partir de placenta humain, la ligne 4 la fraction éluée de la colonne de HPLC contenant le maximum de Ro^{hY5}, et la ligne 5 une fraction éluée de la colonne de HPLC récoltée après le pic de Ro^{hY5}.



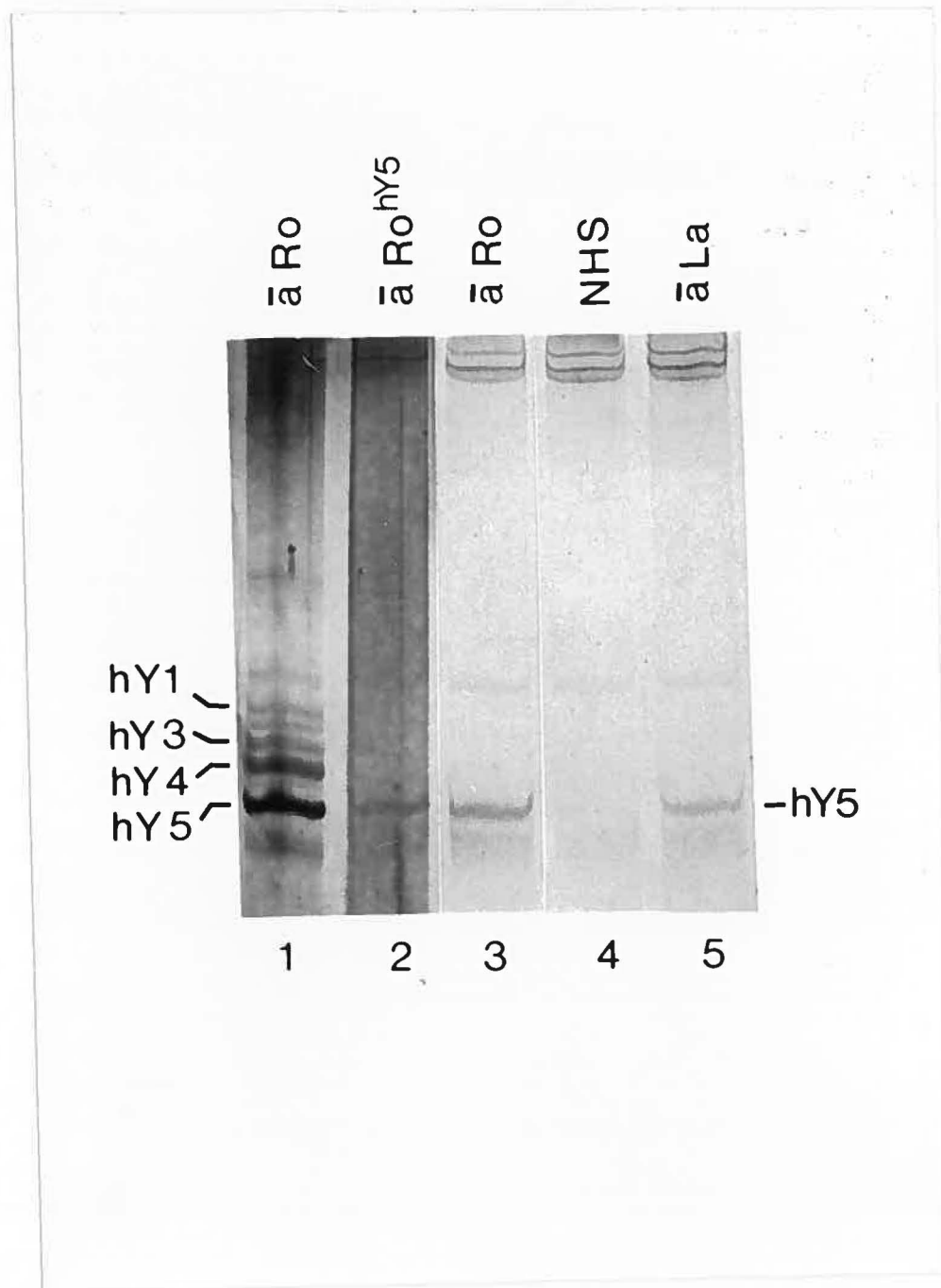
cléoprotéines Ro^{hY5} . Le polypeptide Ro de 60 kD et le polypeptide La sont aussi présents dans les fractions obtenues de la colonne de tamisage moléculaire contenant les ribonucléoprotéines $Ro^{hY1-hY4}$ et Ro^{hY4} (résultats non illustrés). Toutefois ce résultat est ininterprétable, puisque ces fractions contiennent des ARNs associés à la protéine La en plus des ARNs associés à la protéine Ro .

Il est important de noter que le polypeptide La dans les fractions obtenues de la colonne de HPLC est essentiellement sous la forme d'un polypeptide de 50 kD correspondant au poids moléculaire de la protéine intacte (Figure 14, panneau du bas, lignes 1, 2, 4, et 5). Ceci indique que notre schéma de purification donne lieu à très peu de dégradation, surtout lorsque comparé à la dégradation observée dans le polypeptide La contaminant notre préparation de polypeptide Ro purifié par affinité (Figure 14, panneau du bas, ligne 3). Des résultats semblables ont aussi été obtenus par immunobuvardage des fractions qui contiennent les pics de ribonucléoprotéines $Ro^{hY1-hY4}$ et Ro^{hY4} (résultats non illustrés). Puisque le polypeptide La est très sensible à la dégradation enzymatique, ceci est une indication additionnelle que les ribonucléoprotéines Ro purifiées d'après notre technique ne sont pas dégradées de façon substantielle et représentent des ribonucléoprotéines essentiellement intactes.

Enfin, pour définir plus complètement les composantes protéiniques des ribonucléoprotéines Ro^{hY5} purifiées par

Figure 15. Immunoprécipitation des ribonucléoprotéines Ro^{hy5} purifiées.

Les ribonucléoprotéines Ro^{hy5} purifiées par HPLC ont été immunoprécipitées à l'aide de 10 µl de serum anti-Ro^{hy5} spécifique (ligne 2), d'un serum spécifique pour le polypeptide Ro de 60 kD (ligne 3), du serum d'un individu normal (NHS, ligne 4) et d'anticorps anti-La purifiés par affinité (ligne 5). La ligne 1 montre les ARNs immunoprécipités d'un extrait cytoplasmique de cellules HeLa à l'aide du même serum anti-Ro de référence utilisé à la ligne 3.



HPLC, nous avons utilisé des anticorps spécifiques pour le polypeptide Ro de 60 kD et pour le polypeptide La. Nous avons aussi utilisé des anticorps reconnaissant spécifiquement les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} au cours de ces expériences. Tel qu'illustré dans la Figure 15, lignes 2, 3 et 5, ces trois anticorps sont capables d'immunoprécipiter les ribonucléoprotéines Ro^{hY5} purifiées. Nous n'avons pas procédé à une expérience d'immunoprécipitation semblable avec les fractions contenant les ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4} et Ro^{hY5} puisque ces fractions étaient fortement contaminées par des ribonucléoprotéines La, rendant les résultats ininterprétables.

3.3 Signification clinique des anticorps anti-Ro

3.3.1 Etude pilote

Trente des 334 sera testés entre Septembre 1983 et Décembre 1984 formaient une ligne de précipitine en gel d'agarose correspondant à l'anticorps anti-Ro. Vingt d'entre eux, soit 66%, contenaient aussi d'autres autoanticorps identifiables (Tableau 2). Des dix patients ne produisant que des anticorps anti-Ro, 8 souffraient de polyarthrite rhumatoïde (PR). Les deux autres patients souffraient respectivement de SS primaire et d'une combinaison de neutropénie et de splénomégalie sans arthrite (UCTD). Par ailleurs, deux des 7 patients souffrant de LED avaient

TABLEAU 2

ETUDE PILOTE

SPECIFICITE DES ANTINUCLEAIRES ET DIAGNOSTICS
CHEZ 30 PATIENTS AVEC ANTI-Ro

Antinucléaire UCTD/MCTD	Sera (%)	LED	PR	SS	
Aucun	10 (33)	0	8	1	1
nDNA	7 (24)	7*	0	0	0
La	5 (16)	0	1	2	2
nRNP/x**	8 (27)	2	1	2	3
Total (%) (20)	30 (100)	9 (30)	10 (33)	5 (17)	6

* Incluant 2 patientes avec un syndrome de chevauchement PR/LED.

** Dans 6 cas x était La, dans 1 cas x était non identifié et dans 1 cas seul nRNP était détecté.

d'abord développé une polyarthrite déformante, érosive, séropositive et nodulaire. Toutes deux avaient été traitées avec des agents rémittifs (sels d'or et D-pénicillamine) avec plus ou moins de succès, puis avaient développé des manifestations cliniques de LED. De façon intéressante, les manifestations cliniques de ces patientes incluaient une sérosité, des cytopénies, un rash de lupus érythémateux cutané subaigu (LECS), un abaissement des composantes C3 et C4 du complément, et des anti-nADN élevés sans atteinte de la fonction rénale ou du système nerveux central. De plus, au cours de la période de follow-up suivant cette étude, un des 8 patients avec PR anti-Ro positifs a développé un rash de LECS (cf. étude de cohorte).

Afin de pouvoir comparer ces patients avec une population contrôle, nous avons établi au hasard un groupe de 12 patients rhumatoïdes dont le serum ne contenait pas d'anti-Ro. Ce groupe a été tiré d'un ensemble d'environ 60 patients connus rhumatoïdes et suivis à l'UMR dont les sera ne formaient pas de ligne de précipitine anti-Ro. Ces sera avaient été envoyés au laboratoire d'Immuno-rhumatologie au cours de la même période que ceux des 12 sujets de l'étude. Douze noms ont ainsi été sélectionnés au hasard sauf pour l'âge parmi la liste des 60 noms pour constituer notre groupe contrôle. Ces 12 patients ont été choisis de façon à être appariés pour l'âge, tant avec le groupe de 10 rhumatoïdes sans manifestations lupiques qu'avec le groupe élargi qui incluait les 2 patientes souffrant d'un

chevauchement LED\PR. Nous avons fait les comparaisons statistiques avec et sans les 2 patientes souffrant d'un syndrome de chevauchement LED/PR. Puisque leur exclusion n'affectait pas le degré de signification calculé, nous ne présentons que les résultats des comparaisons qui incluent les patientes avec syndrome de chevauchement.

Les deux groupes étaient comparables pour un grand nombre de variables démographiques, cliniques et articulaires (Tableau 3A). Notamment, les manifestations cliniques du SS étaient présentes chez environ la moitié des patients dans chaque groupe: la xérophtalmie était présente chez 7 des patients anti-Ro (+) et chez 5 des patients anti-Ro (-), tandis que la xérostomie était présente chez 8 et 4 patients, respectivement. Les manifestations objectives du syndrome sec étaient toutefois peu fréquentes, puisque seulement 2 des 5 patients avec anti-Ro et 4 des 8 patients contrôle démontraient un test de Schirmer positif. De même, aucune des 4 biopsies de glandes salivaires mineures faites chez les patients avec anti-Ro et seulement 1 sur 6 chez les contrôles s'est révélée positive.

Par contre, le groupe de patients rhumatoïdes avec anti-Ro présentait plus fréquemment une hépatomégalie clinique sans évidence de dysfonction hépatique (Tableau 3B). Ces patients démontraient aussi plus fréquemment une splénomégalie et une leucopénie, alors que l'association de ces deux manifestations pour former un syndrome de Felty complet n'était retrouvé que chez deux patients anti-Ro

positifs. Les deux patientes avec syndrome de chevauchement présentaient une leucopénie mais une seule avait aussi une splénomégalie. Enfin, tel que déjà noté, 2 des patients producteurs d'anti-Ro avaient développé un syndrome de chevauchement PR/LED tandis que 2 autres développaient des manifestations de vasculite.

Au niveau sérologique, les patients rhumatoïdes producteurs d'anti-Ro produisaient des titres plus élevés de facteur rhumatoïde (FR) et de FAN, une hyperglobulinémie importante, des cryoglobulines d'apparition tardive plus abondantes, et un C3 plus bas. Seules les 2 patientes avec un syndrome de chevauchement avaient des anti-nADN élevés et un C4 abaissé (Tableau 4).

Nous avons enfin comparé la réponse des deux groupes de patients aux agents antirhumatismaux. Les deux groupes semblaient avoir été traités de façon à peu près identique. Les patients producteurs d'anti-Ro, toutefois, avaient moins bien répondu à ces traitements, sans avoir démontré d'effets secondaires plus importants ou inhabituels (Tableau 5). Six des 12 patients anti-Ro positifs avaient donc dû être traités avec des stéroïdes (à des doses supérieures à l'équivalent de 5 mg de Prednisone par jour) ou avec des immunosuppresseurs, alors qu'un seul des 12 patients contrôle avait dû recevoir ces médicaments. Bien que prometteurs, nous n'avons pas voulu soumettre ces résultats à une étude statistique car chaque groupe de traitement comportait trop peu de malades. Nous avons donc considéré ces résultats

TABLEAU 3

ETUDE PILOTE

COMPARAISON DES PATIENTS RHUMATOIDES ANTI-Ro POSITIFS ET NEGATIFSA) SIMILARITES CLINIQUES

	Anti-Ro	
	Positif (n=12)	Négatif (n=12)
Age (ans)	46.8 ^s ± 2.8	45.0 ± 2.1
Sexe (F:M)	10:2	11:1
Durée de la maladie (ans)	8.7 ± 2.2	7.7 ± 1.2
Critère de PR	7.9 ± 0.3	7.3 ± 0.5
Critère de LED	1.7 ± 0.3*	1.1 ± 0.3
Critère de SS	1.7 ± 0.4	1.3 ± 0.4
Grade radiologique	2.5 ± 0.2	2.1 ± 0.3
Nodules	7	5
Dysthyroïdie autoimmune	3	3

§ Toutes les valeurs sont exprimées comme Moyenne ± erreur de la moyenne. Il n'y avait aucune différence significative.

* Excluant 2 patientes avec syndrome de chevauchement PR/LED.

TABLEAU 3

ETUDE PILOTE
COMPARAISON DES PATIENTS RHUMATOIDES
ANTI-Ro POSITIFS ET NEGATIFS

B) DIFFERENCES CLINIQUES

	Anti-Ro		p**
	Positif (n=12)	Négatif (n=12)	
Hépatomégalie	6	1	0.03
Splénomégalie	5	2	NS
Vasculite* ou PR/LED	4	0	0.04***
Leucopénie ($\leq 4.0 \times 10^9/L$)	6	1	0.03

* Un patient présentait des infarctus périunguéaux, une pleuropéricardite avec tamponade, une polyneuropathie suivie d'un infarctus cérébelleux. Une autre présentait une vasculite leucocytoclastique récurrente. Deux autres patientes présentaient un syndrome de chevauchement lupus/polyarthrite rhumatoïde.

** Méthode exacte de Fisher.

*** p non significatif pour vasculite ou syndrome de chevauchement pris de façon isolée.

comme préliminaires et pouvant servir à définir les conditions d'une étude plus définitive. De façon intéressante le typage HLA de 9 des rhumatoïdes anti-Ro (+) et de 11 des rhumatoïdes anti-Ro (-) n'a pas permis de démontrer d'association avec un HLA particulier, tant pour la production de l'anti-Ro que pour la toxicité médicamenteuse (résultats non illustrés).

3.3.2 Etude transversale dans la population rhumatoïde

3.3.2.1 Echantillon

La période d'inclusion des patients s'est étendue de Novembre 1985 à Mai 1987. Au cours de cette période, les membres de l'UMR ont porté le diagnostic de PR chez 307 patients. De ceux-ci, 282 ont accepté de participer à l'étude et ont entre autres subi un prélèvement sanguin permettant de déterminer la présence ou l'absence d'anticorps anti-Ro dans leur serum. Quatre de ces patients ont été exclus à l'étape de la révision des dossiers parce qu'ils ne remplissaient pas les critères diagnostiques de PR: trois d'entre eux souffraient de polyarthrite chronique juvénile, et la quatrième remplissait les critères diagnostiques de MCTD. L'échantillonnage final était donc constitué de 278 patients remplissant les critères de PR définie selon l'ARA.

ETUDE PILOTE

PATIENTS RHUMATOIDES ANTI-Ro POSITIFS ET ANTI-Ro NEGATIFSDONNEES SEROLOGIQUES

	Anti-Ro		p ≤
	Positif (n=12)	Négatif (n=12)	
Hb (g/L)	102 ± 7 ⁺	124 ± 5	0.01
Leucocytes (10 ⁹ /L)	4.6 ± 0.6	6.8 ± 0.57	0.01
Plaquettes (10 ⁹ /L)	340 ± 40	317 ± 23	NS
Facteur rhumatoïde (U/ml)	1401 ± 632	170 ± 53	0.05
FAN*	3.0 ± 0.4	1.3 ± 0.4	0.01
anti-nDNA (ng/ml)	908 ± 190 ⁺⁺	650 ± 144	NS
Gammaglobulines (g/L)	2.4 ± 0.4	1.5 ± 0.1	0.02
C3 (mg/dl)	91 ± 9	128 ± 10	0.01
C4 (mg/dl)	19 ± 5	24 ± 3	NS
Cryoglobulines (µg/ml)	117 ± 32	39 ± 11	0.02

+ moyenne ± erreur de la moyenne

* log₂ de dilution où 1 est 1/40

++ incluant 2 patientes avec syndrome de chevauchement PR/LED avec titres élevés d'anti-nADN.

TABLEAU 5

ETUDE PILOTE

PATIENTS RHUMATOIDES ANTI-Ro POSITIFS ET ANTI-Ro NEGATIFSTRAITEMENTS ANTIRHUMATISMAUX

	Traitements*	Efficacité (E)	Toxicité (T)	E/T
Anti-Ro (+) (n=9)	18	4	4	1.0
Anti-Ro (-) (n=9)	18	9	3	3.0

* Nombre de traitements. Anti-Ro(+)/anti-Ro(-): Or parentéral (9/8), D-pénicillamine (3/4), Hydroxychloroquine (6/5).

Les 25 autres patients avec PR n'ont pas été inclus pour diverses raisons. Deux patientes ont refusé. Trois autres avaient accepté mais les prélèvements nécessaires ont soit été perdus ou n'ont pas été faits. Enfin, la majorité des patients non inclus ne semblent tout simplement pas avoir été sollicités. Comme dans la plupart des cas il s'est agi d'une visite ponctuelle unique, il a été impossible de procéder à leur inclusion. La comparaison des caractéristiques disponibles pour ces 25 patients avec celle des 278 patients inclus n'a pas permis de détecter de différence significative tant au niveau du sexe, de l'âge, de la durée de leur maladie, de leur grade radiologique, ou de la présence de FR et de FAN positifs (Tableau 6). Les patients non inclus avaient cependant plus tendance à présenter des manifestations de SS ($p \leq 0.05$, $X^2 = 5.095$).

Les caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude en font un groupe représentatif de la population rhumatoïde traitée dans un service de rhumatologie. En effet, ces caractéristiques correspondent aux données d'études épidémiologiques Nord-Américaines comparables (Tableau 6). Ainsi, un peu moins des deux tiers des patients sont des femmes, et 71% sont séropositifs. La durée de leur maladie s'étalait de 3 à 504 mois (moyenne de 107.0 ± 102.6 mois), avec 47 patients (17%) ayant une durée de maladie inférieure à 12 mois. L'âge au début de la maladie s'étalait de 17 à 76 ans, avec une moyenne de 48.2 ± 13.0 ans et une médiane

de 49 ans. Quatre patients remplissaient 3 critères de LED, et une seule en remplissait 4 (photosensibilité, aphtes buccaux, arthrite non érosive, et FAN positif). Par contre, 44 patients, soit 15.8%, remplissaient au moins 2 critères de SS, et souffraient donc possiblement d'un SS secondaire. Le grade radiologique variait de 1 à 4, avec une moyenne de 2.7; les radiographies de 2 des patients n'étaient pas disponibles. Excluant les patients examinés moins d'un an après le début des symptômes, 226 des 249 patients (90.8%) présentaient au moins un grade 2 de Steinbrocker et seulement 17 (6.8%) avaient des radiographies normales. Enfin, 126 patients (45.5%) présentaient un titre de FAN égal ou supérieur à 1:80 (182 ou 65.7% présentaient un titre égal ou supérieur à 1:40).

3.3.2.2 Prévalence des anticorps anti-Ro

Cette étude a été établie à une époque où nous ne disposions que de la seule technique d'ID pour identifier les anticorps antinucléaires. Nous comptons compléter la caractérisation de ces sera en utilisant des techniques plus sensibles pour lesquelles nous avons récemment développé la technologie, tout particulièrement le SDS-IB, le N-IB, et l'IPP. Nous tentons actuellement de développer une technologie Elisa qui nous permettrait de détecter les anticorps anti-Ro dirigés contre la ribonucléoprotéine Ro^{hY5}. Il sera donc bientôt possible de pouvoir comparer la

TABLEAU 6

ETUDE DE COHORTE SUR LA SIGNIFICATION CLINIQUE DES ANTI-Ro
DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE

CARACTERISTIQUES DES PATIENTS INCLUS ET NON INCLUS

	PATIENTS INCLUS (278)	PATIENTS NON INCLUS (25)	§LITTERATURE
Sexe F	178	17	66-75%
M	100	8	
Durée (mois)	107.0 ± 6.2*	131.7 ± 3.1	-----
Age au début (ans)	48.2 ± 0.8	45.0 ± 3.1	30-50 ans
Symptômes de SS	44 (15.8%)	6 ** (24.0%)	10-15%
Grade radiologique moyen	2.7	2.6	-----
Grade radiologique ≥ 2 (excluant durée < 12)	226/249	15/19***	-----
Séropositivité (FR)	198/278 (71.2%)	13/20 (65.0%)	70-75%
FAN ≥ 1/80	126/277 (45.5%)	5/14 (35.7%)	24-60%

§ Ruddy et al., 1985; Schumacher, 1988.

* ± erreur de la moyenne

** p ≤ 0.05

*** p ≤ 0.01

sensibilité et la spécificité de chacune de ces techniques pour la détection de l'anti-Ro dans une population à faible incidence d'anticorps antinucléaires et aussi de définir l'utilité clinique comparée de chacune de ces techniques. Nous ne rapportons toutefois ici que les résultats obtenus par ID puisque les autres dosages ne sont pas complétés.

Des 278 patients testés, 8 ont démontré un anti-Ro isolé, 2 étaient positifs pour un anti-La, et 1 était positif pour l'anti-Ro et l'anti-La (Tableau 7). La prévalence des anti-Ro dans notre population de rhumatoïdes (tel que détecté par ID) était donc de 3.2%, et celle des anti-La était de 1.1%. Par ailleurs 1 patiente produisait de l'anti-RNP, alors que 4 patientes formaient une ligne de précipitine qui ne correspondait à aucun des systèmes actuellement identifiés dans notre laboratoire.

Les caractéristiques démographiques (âge, sexe, durée de la maladie) des patients rhumatoïdes producteurs d'anti-Ro n'étaient pas statistiquement différentes de celles des patients ne produisant pas d'anti-Ro (Tableau 8). Parmi les données cliniques, seule la présence de manifestations suggestives d'un SS associé se retrouvait avec une fréquence plus élevée chez les patients producteurs d'anti-Ro. Le grade radiologique, les manifestations suggestives de LED, le pourcentage de séropositivité pour le FR et les FAN étaient en effet comparables (Tableau 8). Enfin, parmi les caractéristiques sérologiques évaluées, seul le niveau de C3 s'est révélé significativement plus bas dans le groupe de

TABLEAU 7

ETUDE DE COHORTE SUR LA SIGNIFICATION CLINIQUE DES ANTI-RO
DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE

PREVALENCE DES ANTICORPS ANTINUCLEAIRES

Anti-nADN	7
Anti-Ro	8
Anti-La	2
Anti-Ro et anti-La	1
Anti-RNP	1
Autres	4

N.B. Les anti-nADN ont été mesurés par épreuve de Farr, et les anticorps dirigés contre les antigènes protéiniques (Ro, La, RNP, autres) ont été identifiés par double immunodiffusion en gel d'agarose.

TABLEAU 8

ETUDE DE COHORTE SUR LA SIGNIFICATION CLINIQUE DES ANTI-Ro
DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE

CARACTERISTIQUES CLINIQUES EN FONCTION DE L'ANTI-Ro

	(Ro +) n = 9	(Ro -) n = 269
Critères PR	7.6 ± 0.4*	7.6 ± 0.2
Sexe Féminin	8 (88.9%)**	170 (63%)
Age au début (ans)	45.0 ± 3.0	48.3 ± 13.1
Durée maladie (mois)	78.3 ± 16.6	108.0 ± 103.0
Grade radiologique	2.4 ± 0.4	2.7 ± 0.2
Symptômes de SS	4 (44.4%)	40 (14.9%)**
Critères de SS	1.6 ± 1.7	0.5 ± 1.1
Critères de LED	1.0 ± 0.3	0.7 ± 0.5
Séropositivité (FR)	6	192
FAN (≥ 1:80)	4	126

* ± erreur de la moyenne

** p ≤ 0.00001

TABLEAU 9

ETUDE DE COHORTE SUR LA SIGNIFICATION CLINIQUE DES ANTI-RoDANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDECARACTERISTIQUES SEROLOGIQUES

	(Ro +)	(Ro -)
	n = 9	n = 269
FR (patients positifs)	460 ± 110	410 ± 50 (n=192)
Gammaglobulines (g/L)	17.9 ± 2.8	13.7 ± 0.2 (n=253)
C3 (mg/dl)	119.6 ± 7.3	140.4 ± 69.2** (n=249)
C4 (mg/dl)	27.2 ± 4.3	26.9 ± 11.4 (n=249)
Leucocytes (10 ⁹ /L)	7.0 ± 0.9	7.9 ± 2.4 (n=269)
Plaquettes (10 ⁹ /L)	308 ± 53	330 ± 102 (n=261)
Cryoglobulines (µg/ml)	58.6 ± 23.0	49.5 ± 72.0 (n=267)
Anti-nADN (ng/ml)	752 ± 202	485 ± 493 (n=278)

* ± erreur de la moyenne

** p ≤ 0.02

patients producteurs d'anti-Ro, bien que le niveau moyen de ce groupe soit resté dans les limites de la normale (Tableau 9).

3.3.2.3 Prévalence des manifestations cibles

Globalement, 24 patients sur 278 (7.2%) ont présenté l'une ou l'autre des manifestations définies sévères *a priori*. Cinq des 9 patients anti-Ro (55.5%) appartiennent à ce groupe, versus 19 des 269 patients anti-Ro négatifs (7.1%) (Tableau 10). Cette différence apparaît hautement significative (RR = 7.87; $G_{adj} = 11.303$, $p \leq 0.001$).

Une seule patiente avait donné naissance à un enfant atteint de bloc AV congénital, plusieurs années avant les manifestations cliniques de PR; le serum de cette patiente contenait de l'anti-Ro. Un patient a développé un rash de LECS en cours d'étude (puisque nos critères nous avaient fait exclure d'emblée les 2 patientes précédemment décrites qui avaient développé un LECS et un LED franc sur un tableau de PR); le serum de ce patient contenait aussi de l'anti-Ro. Une autre patiente remplissait à la fois 4 critères du LED (photosensibilité, aphtes buccaux, arthrite non érosive, et FAN positif mais pas de rash de LECS) et un tableau de PR; son serum ne contenait pas d'anti-Ro. Huit patients présentaient une leucopénie lors de l'étude (3 autres avaient auparavant présenté une leucopénie qui s'était corrigée sous stéroïdes); 1 patiente leucopénique produisait

de l'anti-Ro (et de l'anti-La), alors qu'une des patientes dont la leucopénie s'était corrigée sous stéroïdes produisait de l'anti-Ro. Par ailleurs, 6 patients présentaient des manifestations vasculitiques lors de l'étude, soit 1 présentant une artérite nécrosante systémique de type rhumatoïde et 5 présentant un purpura non thrombopénique de type vasculite leucocytoclasique. Deux des 5 patients avec purpura produisaient de l'anti-Ro et 1 produisait de l'anti-Ro et de l'anti-La. La patiente (non-productrice d'anti-Ro) souffrant d'artérite nécrosante ainsi que 2 des 3 patients producteurs d'anti-Ro étaient traités avec des corticostéroïdes lors de l'étude. Trois patients avaient présenté des manifestations vasculitiques sévères dans le passé (mononévrite multiplex dans un cas, artérite rhumatoïde dans 2 cas), dont aucun ne produisait de l'anti-Ro lors de l'étude. Deux de ces dernières avaient reçu des immunosuppresseurs dans le passé (1 levamisole et 1 cyclophosphamide), et toutes trois recevaient encore des corticostéroïdes; il n'est pas clair si ce traitement a pu modifier leur positivité pour l'anti-Ro. De façon surprenante, un nombre élevé de patients présentaient soit un C3 abaissé (21 sur 258 ou 8.1%) soit un C4 abaissé (22 sur 258 ou 8.5%). Toutefois, seulement 8 patients présentaient à la fois un C3 et un C4 abaissés, suggérant une consommation exagérée et non un déficit isolé ou une anomalie de laboratoire. De ces 8 patients, 1 seul produisait de l'anti-Ro.

TABLEAU 10

**ETUDE DE COHORTE SUR LA SIGNIFICATION CLINIQUE DES ANTI-Ro
DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE**

PREVALENCE DES MANIFESTATIONS CIBLES

	(Ro +)	(Ro -)	RISQUE RELATIF
	n = 9	269	(RR)
L'une ou l'autre des 5 manifestations	5*	19	7.87
Bloc AV	1	0	α
PR/LED	1**	1	29.89
Vasculite	3	6	14.94
Purpura	3	2	44.83
C3 et C4 abaissés	1	7	2.30
Leucopénie ($\leq 4.0 \times 10^9/L$)			
lors de l'étude	1	7	2.30
en cours d'évolution	2	9	6.64
Photosensibilité	2	3	19.93

* $p \leq 0.001$

** Les deux patientes déjà décrites dans l'étude pilote avaient été exclues d'emblée bien qu'elles remplissaient les critères de PR et qu'elles étaient toujours suivies à l'UMR. Incluant ces 2 patientes, le RR deviendrait 73.36.

En résumé, des 9 patients producteurs d'anti-Ro identifiés par ID, 5 présentaient des manifestations extra-articulaires considérées sévères: une a donné naissance à un enfant avec bloc AV, 2 ont présenté des manifestations vasculitiques isolées de type purpura (accompagné d'anti-nADN élevés dans un cas), un patient a présenté une leucopénie, un lupus cutané subaigu et un abaissement simultané du C3 et du C4, alors qu'une patiente a présenté une leucopénie corrigée sous fortes doses de stéroïdes associée à un abaissement isolé du C4 et à du purpura.

Les risques relatifs pour les patients rhumatoïdes producteurs d'anti-Ro de présenter les différentes manifestations cibles vont donc de 2.30 pour un abaissement simultané du C3 et du C4, à 6.64 pour une leucopénie en cours d'évolution, à 29.89 pour un syndrome de chevauchement PR/LED, à 44.83 de présenter un purpura récidivant. De plus, seuls les patients producteurs d'anti-Ro semblent développer un lupus cutané subaigu ou donner naissance à un enfant avec bloc AV.

Il faut noter que 3 des 9 patients anti-Ro positifs (33%) étaient traités avec des stéroïdes à doses élevées lors de l'étude, alors que seulement 61 des 269 patients anti-Ro négatifs (22.7%) avaient été traités, à un moment quelconque de leur évolution, avec des doses équivalents de stéroïdes, et seulement 36 (13.4%) étaient toujours traités lors de l'étude. Des doses élevées de corticostéroïdes risquent de diminuer l'incidence de l'abaissement du complé-

ment et de la neutropénie, diluant ainsi toute différence significative potentielle entre les patients anti-Ro positifs et négatifs.

De façon fortuite, nous avons noté que 5 patients rhumatoïdes présentaient une histoire de photosensibilité marquée: deux de ces patients produisaient de l'anti-Ro. Compte tenu de l'association bien connue des anti-Ro avec la photosensibilité dans d'autres groupes de malades (Mond et al., 1989), cette constatation pourrait donc représenter un marqueur additionnel permettant d'identifier les patients producteurs d'anti-Ro.

3.3.2.4 Traitements antirhumatismaux

Deux cents des 278 patients avaient été traités par des agents antirhumatismaux ou des corticostéroïdes à doses élevées lors de leur inclusion. Des 78 patients non traités, 37 étaient symptomatiques depuis 12 mois ou moins. Des 231 patients souffrant de PR depuis plus de 12 mois, 190 (82.2%) avaient donc eu une tentative de traitement antirhumatismal.

Des 47 patients ayant une évolution plus courte que 12 mois, 10 (21.3%) avaient eu un traitement antirhumatismal (4 aux sels d'or, 4 avec l'hydroxychloroquine, et 2 avec des corticostéroïdes). Tous les traitements précoces aux sels d'or et à l'hydroxychloroquine semblaient se révéler efficaces, avec une seule réaction toxique aux sels

d'or. Quoique les patients traités précocément semblaient montrer une réponse encourageante, le design de notre étude ne nous permet pas d'extrapoler sur l'indication de traiter précocément, comme le suggère la littérature récente (Kushner, 1989; Wilske et Healey, 1989; Fries, 1990).

Les agents antirhumatismaux les plus utilisés chez les 190 patients ayant une durée de maladie supérieure à 12 mois étaient les sels d'or avec 155 traitements, l'hydroxychloroquine avec 108 traitements, la Dpénicillamine (44 traitements) et les immunosuppresseurs (13 traitements); un traitement, inefficace, à l'aide de sulfasalazine, n'a pas été comptabilisé (Tableau 11). Les corticostéroïdes avaient été utilisés chez 64 patients (23.0%), la plupart du temps (55 patients, 86%) en association avec ou après l'échec d'un ou plusieurs agents antirhumatismaux. Le profil de chacun des antirhumatismaux respecte les attentes telles que rapportées dans la littérature (Fries et al., 1990; Ruddy, 1985). En effet, 118 des 155 traitements aux sels d'or (76.1%) avaient été efficaces (y inclus 7 rémissions), tout comme 61 des 108 traitements aux anti-malariques (56.5%) et 23 des 44 traitements à la D-pénicillamine (52.3%). L'incidence des effets toxiques était plus faible avec les antimalariques (13.0%), suivi des sels d'or (38.7%), et enfin de la D-pénicillamine (50%).

Les patients producteurs d'anti-Ro semblaient avoir été traités de façon à peu près équivalente aux autres patients (Tableau 11). Deux patients n'avaient jamais reçu

d'agents antirhumatismaux. Quatre patients avaient reçu des sels d'or (efficaces dans 3 cas), et 4 des antimalariques (efficaces dans 1 cas). Il est notable toutefois qu'aucun de ces patients n'avait été traité avec la D-pénicillamine, reflétant probablement le faible taux d'utilisation de cet agent dans notre population. Aucune toxicité médicamenteuse particulière n'a été notée chez les patients producteurs d'anti-Ro. Tel que mentionné plus haut, les patients producteurs d'anti-Ro étaient plus susceptibles d'être traités avec des doses élevées de corticostéroïdes (3 sur 9) et des immunosuppresseurs (2 sur 9), donc au total 5 sur 9 traités avec l'un et/ou l'autre agent versus 69 sur 269 dans le groupe sans anti-Ro (RR 2.65). L'utilisation d'un traitement "plus lourd" reflète probablement la sévérité des manifestations extra-articulaires de ces patients.

TABLEAU 11

<u>ETUDE DE COHORTE SUR LA SIGNIFICATION CLINIQUE DES ANTI-Ro</u>				
<u>DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE</u>				
<u>TRAITEMENTS ANTIRHUMATISMAUX</u>				
<u>OR</u>		<u>EFFICACES</u>	<u>INEFFICACES</u>	<u>TOXIQUES</u>
Ro(-) (n=151) (39.1%)		115 (76.2%)*	16 (10.6%)	59
Ro(+)	(n=4)	3 (75%)	1 (25%)	1 (25%)
<u>HYDROXYCHLOROQUINE</u>				
Ro(-) (n=104) (13.5%)		60 (57.72%)	35 (33.7%)	14
Ro(+)	(n=4)	1 (25%)	3 (75%)	0
<u>D-PENICILLAMINE</u>				
Ro(-) (n=44)		23 (52.3%)	7 (15.9%)	22 (50%)
Ro(+)	(n=0)	-	-	-
<u>IMMUNOSUPPRESSEURS</u>				
Ro(-) (n=2+)		ND	ND	ND
Ro(+)	(n=0++)	ND	ND	ND
<u>CORTICOSTEROIDES</u>				
Ro(-) (n=36+++)		ND	ND	ND
Ro(+)	(n=3)	ND	ND	ND

* La somme des traitements efficaces, inefficaces et toxiques est supérieure au total des patients traités car certains traitements ont été à la fois efficaces (ou inefficaces) et toxiques.

+ 6 patients avaient été traités antérieurement avec des immunosuppresseurs, mais les avaient cessés lors de l'étude

++ 2 patientes avaient été traités antérieurement avec des immunosuppresseurs, mais les avaient cessés lors de l'étude

+++ 25 autres patients avaient aussi été traités avec des corticostéroïdes en cours d'évolution.

ND: Non évalué

DISCUSSION

Nous avons étudié la réponse autoimmune dirigée contre l'antigène Ro de deux perspectives différentes mais complémentaires. Nous avons en effet caractérisé plus précisément les anticorps anti-Ro eux-mêmes, en étudiant l'antigène qu'ils reconnaissent. En parallèle, nous avons examiné la signification clinique de la présence de ces anticorps dans le serum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Les deux approches sont nécessaires puisque l'hétérogénéité immunologique des anticorps anti-Ro que nous avons démontrée pourrait fort bien sous-tendre une certaine hétérogénéité clinique. Dans un premier temps, je crois qu'il est préférable de discuter des résultats obtenus par chacune de ces approches avant de tenter de les réconcilier.

4.1 Des autoanticorps anti-Ro reconnaissent spécifiquement une ribonucléoprotéine Ro humaine à l'état natif

Nous avons d'abord étudié le spectre de la réponse humorale anti-Ro. Pour ce faire, nous aurions pu définir certaines propriétés de ces autoanticorps, telles que leur affinité, leur point isoélectrique, leurs isotypes et idiotypes prédominants, etc.. De même, il aurait été possible d'étudier les déterminants de la réponse à l'antigène Ro au niveau génétique, soit au niveau des molécules du CMH servant à la présentation de l'antigène, soit au niveau des molécules du récepteur des lymphocytes T qui déterminent la reconnaissance du complexe antigène-CMH

et par la suite induisent des clones spécifiques de lymphocytes B à produire des anticorps. Nous avons préféré étudier les anticorps anti-Ro du point de vue de l'antigène qu'ils reconnaissent.

Nous partions en effet de l'hypothèse que les autoantigènes eux-même, et probablement sous une forme relativement intacte, jouent un rôle dans l'induction de la réponse autoimmune. Cette hypothèse découle de plusieurs observations que nous rappelons brièvement. Tout d'abord, presque tous les autoantigènes fréquemment reconnus font partie de complexes macromoléculaires qui interagissent avec des acides nucléiques; seule une petite proportion de ces complexes macromoléculaires sont effectivement reconnus par des autoanticorps. De même, certains autoanticorps sont produits de façon liée, i.e. qu'un anticorps (e.g. anti-La) n'est pratiquement jamais produit sans qu'un autre anticorps (e.g. anti-Ro) ne soit aussi produit (Harley et al, 1986; Reichlin, 1986; Hamilton et al, 1988; Arnett et al, 1989). Or, les protéines Ro et La feraient partie, au moins transitoirement, d'une même ribonucléoprotéine; cette ribonucléoprotéine deviendrait donc un candidat idéal pour l'autoimmunisation. Enfin, il est clairement établi pour certains autoanticorps (e.g. anti-tARN synthétases produits dans la polymyosite) que certains anticorps reconnaissent des déterminants conformationnels sur les autoantigènes. Les autoantigènes pourraient donc être accessibles sous forme intacte aux lymphocytes B. En effet, la sélection

clonale des lymphocytes B qui produiront des anticorps repose essentiellement sur un double mécanisme de reconnaissance: celle de l'antigène intact par les immunoglobulines de surface du lymphocyte B, et celle d'un fragment dérivé du même antigène en association avec une molécule CMH de classe II à la surface du même lymphocyte B par un lymphocyte T auxiliaire.

Nous avons d'abord décrit un nouvel autoanticorps qui reconnaît spécifiquement les ribonucléoprotéines Ro qui contiennent l'ARN hY5 (Ro^{hY5}). Ces autoanticorps reconnaissent un déterminant antigénique conformationnel dont l'expression sur le polypeptide Ro de 60 kD nécessite son association avec l'ARN hY5. Ces autoanticorps constituent, à l'occasion, l'essentiel de la réponse autoimmune anti-Ro. Grâce à des sous-populations de ribonucléoprotéines Ro purifiées biochimiquement, nous avons démontré par une technique d'inhibition compétitive d'immunoprécipitation que la majorité des sera anti-Ro contiennent aussi des anticorps dirigés spécifiquement contre les ribonucléoprotéines Ro^{hY5}. De plus, ce déterminant n'est retrouvé que sur les ribonucléoprotéines Ro humaines. Ce nouvel autoanticorps semble donc différer d'autres autoanticorps qui reconnaissent des régions conservées sur certains autoantigènes (Tan, 1989).

Parmi 32 sera qui immunoprécipitaient exclusivement les ARNs Ro, nous en avons identifié 2 (J.O. et T.S.) qui n'immunoprécipitaient qu'un seul ARN qui co-migrerait avec l'ARN hY5. Nous avons d'abord démontré que cet ARN était

bien hY5 et non un ARN de même poids moléculaire. Premièrement, l'ARN hY5 précipité par un serum anti-Ro classique et l'ARN immunoprécipité par le serum J.O. migraient de façon identique lorsque fractionnés en une ou en deux dimensions. Deuxièmement, nous avons digéré par la RNase A les ribonucléoprotéines retenues sur des billes de protéine A-sépharose recouvertes des deux mêmes sera; les fragments protégés dérivant de l'ARN précipité par le serum J.O. étaient identiques aux fragments protégés de l'ARN hY5 précipité par un serum anti-Ro. Troisièmement, l'ARN précipité par le serum J.O. était spécifiquement éliminé d'un extrait de cellules HeLa par des incubations répétées avec des anticorps anti-Ro monospécifiques adsorbés sur des billes de protéine A-sépharose. Quatrièmement, l'ARN précipité par le serum J.O., sous forme de ribonucléoprotéine, co-purifiait avec la ribonucléoprotéine Ro^{hY5}. Bien que nous n'ayions pas séquencé directement l'ARN immunoprécipité par les sera J.O. et T.S., ces expériences nous ont convaincu que ces antisera étaient bel et bien dirigés contre la ribonucléoprotéine Ro^{hY5}. Les sera J.O. et T.S. ont alors été baptisés anti-Ro^{hY5}, pour dénoter qu'ils reconnaissaient spécifiquement cette ribonucléoprotéine.

Nous avons ensuite exploré les épitopes des anticorps contenus dans les sera J.O. et T.S.. Ni l'ARN hY5 seul (dans des extraits cellulaires dont les protéines avaient été détruites par extraction au phénol ou digestion par la protéinase K), ni la protéine Ro de 60 kD seule (en im-

munobuvardage en conditions dénaturantes et en ELISA utilisant un polypeptide immunopurifié) n'étaient reconnus. Toutefois, les sera anti-Ro^{hY5} reconnaissaient la ribonucléoprotéine Ro^{hY5} par l'intermédiaire de la protéine Ro de 60 kD, puisque celle-ci était la protéine majeure précipitée par ces sera à partir d'extraits de cellules HeLa marquées à la [³⁵S]méthionine. Une protéine de 50 kD (mineure) co-migrant avec la protéine La était également immunoprécipitée par ces sera. De même, la protéine Ro de 60 kD n'était effectivement reconnue qu'en association avec l'ARN hY5. En effet, l'immunoprécipitation de l'ARN hY5 était inhibée par des extraits enrichis en ribonucléoprotéines Ro^{hY5} et pauvres en Ro^{hY1-hY4}, mais n'étaient pas inhibée par les ribonucléoprotéines Ro^{hY1-4}. A l'opposé, ces dernières ribonucléoprotéines étaient capables d'inhiber l'immunoprécipitation de tous les ARNs Ro, y compris l'ARN hY5, par un serum anti-Ro de référence. Il apparaît donc que la ribonucléoprotéine Ro^{hY5} comporte deux épitopes distincts: un premier unique à cette ribonucléoprotéine, et un second commun à toutes les ribonucléoprotéines Ro. Tel que mentionné précédemment, certains autoanticorps, et notamment les anti-Ro (comme nous l'avons démontré dans un travail antérieur en collaboration avec Sylvie Lapointe), reconnaissent des déterminants conformationnels sur une protéine. Par contre, l'autoanticorps anti-Ro^{hY5} semble le premier exemple d'un autoanticorps spontané dont la spécificité dépend de l'association d'une protéine et d'un ARN.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, nous avons identifié 2 sera anti-Ro^{hY5} parmi 32 sera qui immunoprécipitaient les ARNs Ro (mais pas les ARNs La) à partir d'extraits cellulaires de cellules HeLa. Ceci représente probablement la prévalence minimale des sera spécifiques pour Ro^{hY5}. En effet les deux sera anti-Ro^{hY5} prototypes ne donnaient qu'une faible fluorescence cytoplasmique sur des cellules Hep-2 en culture. Dans la majorité des laboratoires (y compris le nôtre), les épreuves de caractérisation des antinucléaires sont réservées aux sera fortement positifs en immunofluorescence. Des sera présentant une spécificité semblable risquent donc habituellement de ne pas être caractérisés.

Afin de déterminer si la formation d'anticorps anti-Ro^{hY5} était fréquente, nous avons développé une épreuve d'inhibition compétitive de l'immunoprécipitation de ribonucléoprotéines radiomarquées. Quatre des 6 sera anti-Ro testés contenaient des anticorps reconnaissant spécifiquement Ro^{hY5} après incubation avec des ribonucléoprotéines Ro^{hY1-hY4}. La technique que nous avons utilisée pourrait toutefois sous-estimer la véritable incidence des anti-Ro^{hY5} puisque notre préparation de ribonucléoprotéines Ro^{hY1-4} était contaminée par une faible quantité de Ro^{hY5}. Nous avons donc pu conclure que la reconnaissance d'épitopes hautement conformationnels sur Ro^{hY5} semblait une propriété générale de la réponse immune à l'antigène Ro. De plus les anticorps anti-Ro^{hY5} seraient habituellement produits en tandem avec des

anticorps qui immunoprécipitent toutes les ribonucléoprotéines Ro. Cette association rend la détection des anti-Ro^{hY5} impossible à moins que des épreuves d'inhibition spécifique soient faites.

Les anticorps anti-Ro^{hY5} devaient nous réserver une seconde surprise. En effet ces anticorps non seulement ne reconnaissaient pas les ribonucléoprotéines Ro humaines ne contenant pas l'ARN hY5, mais ils ne reconnaissaient pas les ribonucléoprotéines Ro d'origine animale. Cette observation avait une double implication. Tout d'abord, au moins une portion des anticorps anti-Ro sont véritablement des AUTOanticorps, en ce sens qu'ils reconnaissaient un antigène spécifiquement humain. Cette observation suggère fortement que la ribonucléoprotéine Ro^{hY5} intacte joue un rôle direct d'autoimmunogène. Deuxièmement, un épitope non conservé dans l'évolution pouvait être reconnu par un autoanticorps. Utilisant des données recueillies dans d'autres systèmes antigène/anticorps, Tan (1989) a proposé que les épitopes reconnus par les autoanticorps sont des sites hautement conservés dans l'évolution, le plus probablement des sites responsables de l'activité enzymatique ou fonctionnelle. Cette théorie irait à l'encontre de l'expérience acquise dans le domaine des anticorps induits par immunisation. En effet, les anticorps induits reconnaissent de façon prédominante les sites non conservés dans l'évolution. La réponse immune "mature" ensuite progressivement pour reconnaître d'autres portions de l'antigène qui sont sélectionnées par

des propriétés comme l'accessibilité et l'index d'hydrophilicité (Benjamin et al., 1984). L'exemple des anticorps anti-Ro^{hY5} pourrait être compatible avec un processus d'autoimmunisation par la ribonucléoprotéine intacte. Nous proposons donc que le processus initial d'immunisation dans les collagénoses pourrait être la production d'anticorps qui reconnaissent des épitopes non conservés (fort probablement conformationnels) sur des polypeptides conservés. La présence constante de l'autoantigène conduirait ensuite à la maturation du répertoire des lymphocytes B, avec la production d'anticorps reconnaissant un grand nombre d'épitopes accessibles à la surface de l'antigène (Benjamin et al., 1984; Harlow et Lane, 1988). Quoique notre hypothèse souligne l'importance des sites sujets à des variations de séquences et/ou de conformation des antigènes pour induire ou permettre l'induction du processus d'autoimmunisation, il est tentant d'y rattacher l'hypothèse que ces sites soient situés à proximité des sites actifs des autoantigènes. Ceci expliquerait l'inhibition de l'activité enzymatique des antigènes par certains autoanticorps. De plus, un site actif est par définition accessible à un substrat, tout en étant aussi à risque d'être bloqué ou de réagir avec un produit exogène jouant le rôle d'un haptène et donc capable d'induire la réponse immune lors de son association avec l'autoantigène. Cette hypothèse ouvre la voie à l'étude de différences structurelles ou fonctionnelles des

autoantigènes chez les sujets sains et les sujets producteurs d'anti-Ro.

4.2 Caractérisation des ribonucléoprotéines Ro

Comme la ribonucléoprotéine Ro^{hY5} intacte semblait pouvoir jouer un rôle direct dans l'induction de la réponse anti-Ro, il nous a semblé important de tenter de déterminer les caractéristiques structurelles ou fonctionnelles qui pouvaient lui conférer cette immunogénicité particulière. Nous avons alors voulu répondre à ce problème en purifiant biochimiquement les ribonucléoprotéines Ro. Les conditions de purification furent choisies de façon à minimiser toute dégradation ou dissociation: fractionnement cellulaire mécanique sans détergent, chromatographie d'échange d'anion avec élution à faible force ionique, ultracentrifugation à travers un gradient de sucrose isotonique, et enfin tamisage moléculaire en HPLC. Les ribonucléoprotéines Ro ont ainsi été purifiées en trois groupes: une contenant uniquement l'ARN hY5, une contenant uniquement l'ARN hY4, et une contenant les 3 ARNs hY1 à hY4. La ribonucléoprotéine Ro^{hY5} a été purifiée jusqu'à quasi-homogénéité, alors que les autres ribonucléoprotéines Ro restaient contaminées par des ribonucléoprotéines La.

Les ribonucléoprotéines Ro purifiées apparaissaient intactes d'après plusieurs critères. Tout d'abord, les ARNs des ribonucléoprotéines purifiées n'étaient pas dégradés

puisque leur migration lors de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée était identique à celles d'ARNs Ro immunoprécipités d'extraits cellulaires fraîchement préparés. Ensuite, l'immunobuvardage des fractions contenant les ribonucléoprotéines purifiées indiquaient que le polypeptide Ro de 60 kD et le polypeptide La (très sensible à l'activité protéolytique) (Habets et al., 1983) étaient intacts. Troisièmement, le polypeptide antigénique Ro de 60 kD restait associé avec les ARNs Ro durant toutes les étapes de la purification puisque les ARNs Ro pouvaient être immunoprécipités à l'aide de sera anti-Ro reconnaissant spécifiquement cette protéine. De même, la protéine La demeurait associée à la ribonucléoprotéine Ro^{hY5} puisque celle-ci pouvait être immunoprécipitée en utilisant des anticorps anti-La immunopurifiés. Et enfin, le déterminant antigénique dépendant de l'intégrité de la conformation de la ribonucléoprotéine Ro^{hY5} était toujours présent puisque ces ribonucléoprotéines pouvaient toujours être immunoprécipitées à l'aide d'un serum anti-Ro^{hY5}.

Cette purification a permis de définir deux propriétés importantes des ribonucléoprotéines Ro, et des Ro^{hY5} en particulier. Tout d'abord, le poids moléculaire apparent des ribonucléoprotéines Ro variait de 230 kD environ pour Ro^{hY4} à 300-350 kD pour les autres. Ce poids moléculaire diffère fortement de celui antérieurement rapporté (100 à 150 kD). Deux éléments expliquent probablement cette différence. Premièrement, le poids moléculaire avait auparavant été es-

timé à partir d'extraits de tissus ou dans des conditions rendant improbable la préservation de la composante ARN. Aucun effort n'avait alors été fait pour vérifier l'intégrité des ribonucléoprotéines purifiées. Deuxièmement, le comportement des ribonucléoprotéines en solution pourrait différer de celui des protéines globulaires, pouvant conduire à une estimation inadéquate du poids moléculaire. Toutefois, une ribonucléoprotéine 7S de poids moléculaire 107 kD (Monteilhet et Aggerbeck, 1986), donc très proche de celui théorique des ribonucléoprotéines Ro, a été purifiée par tamisage moléculaire en HPLC. Le poids moléculaire estimé de ces ribonucléoprotéines était de 120 kD, soit environ la moitié du poids moléculaire apparent des ribonucléoprotéines Ro. Le poids moléculaire apparent très élevé des ribonucléoprotéines Ro pourrait donc résulter d'une dimérisation (i.e. l'association de deux ribonucléoprotéines contenant chacune une protéine de 60 kD et un ARN), ou de la présence d'autres protéines au sein des ribonucléoprotéines. Alors que la dimérisation est une caractéristique fréquente des protéines qui interagissent avec les acides nucléiques puisqu'elle favorise la stabilisation de l'interaction, nous n'avons pour le moment aucun élément pouvant confirmer cette hypothèse. Par contre, nous avons démontré par immunoprécipitation des ribonucléoprotéines Ro^{hy5} purifiées à l'aide d'anticorps anti-La immunopurifiés, ainsi que par immunobuvardage des protéines contenues dans les fractions contenant les ribonucléoprotéines Ro^{hy5}, que la

protéine La était associée de façon stable avec les ribonucléoprotéines Ro^{hy5}. Cette association stable pourrait soutenir la formation souvent conjointe dans un même serum d'anticorps dirigés contre les protéines Ro et La. Ce dernier élément constitue d'ailleurs un argument additionnel suggérant que les ribonucléoprotéines intactes pourraient jouer un rôle immunogénique direct. Nos résultats ne nous permettent pas de préciser si les polypeptides Ro (de 52, 54 et 60 kD) récemment décrits sont aussi des composantes des ribonucléoprotéines Ro purifiées puisque les sera que nous avons utilisés ne reconnaissaient pas spécifiquement ces antigènes. Il n'est pas non plus établi si la protéine La est une composante des ribonucléoprotéines Ro^{hy1-4}. Les fractions finales de ces ribonucléoprotéines restaient en effet contaminées par des ribonucléoprotéines La, de sorte que les expériences d'immunoprécipitation et d'immunobuvardage utilisant des anticorps anti-La immunopurifiés étaient ininterprétables. Toutefois, la taille de ces ribonucléoprotéines (supérieure à 220 kD) suggère qu'elles comportent plus qu'une copie du polypeptide Ro de 60 kD associé à une copie d'un ARN d'environ 30 kD.

4.3 Hétérogénéité des ribonucléoprotéines Ro et des auto-anticorps anti-Ro

Pour résumer, nous avons démontré que, du moins dans le cas de la réponse immune à l'antigène Ro, six éléments nouveaux pouvaient être énoncés:

- 1) une forte proportion des patients producteurs d'anti-Ro produisent des anticorps reconnaissant un épitope hautement conformationnel dépendant de l'interaction de la protéine Ro de 60 kD et de l'ARN hY5; rarement ces anticorps constituent l'essentiel des anticorps anti-Ro d'un serum;
- 2) les anticorps anti-Ro^{hY5} sont dirigés contre un déterminant spécifiquement humain qui n'est pas retrouvé sur d'autres ribonucléoprotéines humaines ou animales;
- 3) les anticorps anti-Ro et anti-Ro^{hY5}, tout comme les anticorps anti-Ro et anti-La, sont fréquemment produits en tandem ou de façon liée. L'association stable de ces deux polypeptides et de ces trois épitopes au sein d'une même ribonucléoprotéine constitue un complexe macromoléculaire qui pourrait être l'objectif de ces autoanticorps;
- 4) les ribonucléoprotéines Ro humaines sont biochimiquement hétérogènes puisqu'elles peuvent être purifiées en trois groupes: Ro^{hY5}, Ro^{hY4}, et Ro^{hY1-4}. Les caractéristiques biochimiques uniques des ribonucléoprotéines Ro^{hY5} sous-tendent vraisemblablement leurs caractéristiques immunologiques uniques. Il reste à préciser si elles sous-tendent des caractéristiques fonctionnelles uniques;

5) les ribonucléoprotéines Ro présentent un poids moléculaire apparent en solution beaucoup plus élevé (220 à 300-350 kD) que la somme des poids moléculaires de leurs composantes nominales (environ 90 kD). Quoique la signification exacte de ce poids moléculaire élevé reste à préciser, il est vraisemblable qu'il résulte de l'une ou de plusieurs des conditions suivantes: comportement en solution différent de celui d'une protéine globulaire, association avec une autre composante protéique, ou dimérisation. Il est vraisemblable que si elles sont présentes, l'association avec une autre protéine ou la dimérisation jouent un rôle dans la fonction cellulaire des ribonucléoprotéines Ro; il est aussi possible qu'elles contribuent à leur immunogénicité;

6) le polypeptide La est associé de façon stable avec les ribonucléoprotéines Ro^{hY5}. Puisque la fonction du polypeptide La semble être celle d'un facteur de terminaison de la transcription par l'ARN polymérase III, il est possible que la fonction des ribonucléoprotéines Ro puisse être d'agir comme un cofacteur qui module l'activité de la protéine La, ou une sorte de "siphon" qui permette le recyclage des polypeptides La pour un autre cycle de terminaison de transcription.

Les points 1) à 3) constituent des éléments fortement suggestifs d'un rôle direct des ribonucléoprotéines Ro^{hY5} dans le processus initial d'autoimmunisation contre l'antigène Ro dans le LED et certaines maladies associées.

De plus, les composantes protéiques et ARN sont essentielles pour l'activité enzymatique de certains autres autoantigènes ribonucléoprotéiques (Sharp, 1987; Altman et al., 1988; Walter et Blobel, 1983). Il est donc possible que des ribonucléoprotéines Ro intactes comme celles que nous avons obtenues puissent devenir des réactifs permettant d'étudier l'activité des ribonucléoprotéines Ro, soit seules ou en association avec le polypeptide La, possiblement dans la régulation de la transcription par l'ARN polymérase III. De semblables études restent cependant à venir.

4.4 Signification clinique des anticorps anti-Ro: étude pilote

Après avoir discuté de notre travail d'approche fondamentale, nous allons maintenant traiter de nos études cliniques. Nous avons d'abord mené une étude pilote pour déterminer la signification clinique de la présence d'anticorps anti-Ro dans le serum des patients suivis dans notre Centre Hospitalier. Notre travail s'inscrivait dans le courant fort utilisé et fort productif en rhumatologie qui utilise les autoanticorps pour aider à la classification diagnostique et pronostique des collagénoses (Tan, 1989).

Dans notre population, en utilisant la technique relativement peu sensible de la double immunodiffusion en gel d'agarose, nous avons déterminé que lorsque l'anti-Ro était le seul autoanticorps détectable, il se trouvait 8 fois sur

10 dans le serum d'un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde. De plus 2 patientes produisant des anti-nADN en plus des anti-Ro avaient d'abord présenté un tableau de polyarthrite séro-positif, nodulaire et érosive avant de développer un lupus cutané sub-aigu puis un LED franc. L'association de la production isolée d'anti-Ro avec la PR est confirmée par une relecture de la littérature. Scopelitis et al (1985) ont rapporté que sur 100 sera anti-Ro positifs en ID, 44 ne contenaient pas d'autres spécificités. De ces 44, 10 provenaient de patients atteints de PR, alors que 27 souffraient de collagénoses mal définies (UCTD) ou ne souffraient d'aucune collagénose identifiable; 4 patients seulement souffraient de LED et 1 seul de sclérodermie. Les anti-Ro, lorsque présents de façon isolée, pourraient donc être fréquemment associés avec la PR.

Nous avons ensuite étudié plus à fond nos 12 patients rhumatoïdes producteurs d'anti-Ro. Pour fins de comparaison, nous avons établi au hasard, parmi les patients rhumatoïdes connus non-producteurs d'anti-Ro, un groupe contrôle apparié pour l'âge. Les données démographiques, cliniques et paracliniques de ces 24 patients ont alors été établies par une étude rétrospective de leurs dossiers.

Les 12 patients rhumatoïdes anti-Ro positifs étaient démographiquement comparables à un groupe de patients rhumatoïdes anti-Ro négatifs appariés pour l'âge. Les patients producteurs d'anti-Ro présentaient cependant des manifestations extra-articulaires plus sévères. Quoique

cette conclusion reposait sur l'utilisation de comparaisons multiples, le niveau de signification de chaque comparaison et le fait que les résultats de la majorité des tests favorisaient la même hypothèse suggéraient que les différences observées étaient réelles.

La présence d'anti-Ro chez des patients atteints de SS primaire est associée à des manifestations systémiques et vasculitiques similaires à celles de nos patients (Alexander et al., 1983). Notre groupe de rhumatoïdes anti-Ro positifs ne présentait cependant pas plus de manifestations du SS que le groupe contrôle. De même, dans une étude effectuée dans notre laboratoire portant sur une exocrinopathie autoimmune chez les patients atteints de PR (Radoux et al., 1987), 12 des 30 patients présentaient un SS documenté mais aucun ne produisait d'anti-Ro. Il semble donc que les manifestations systémiques retrouvées chez nos patients ne pouvaient être facilement attribuées à un SS associé, tout comme la production d'anti-Ro chez les rhumatoïdes ne semblait pas reliée à la présence d'un SS associé.

Les anticorps anti-Ro sont étroitement associés au développement d'un lupus érythémateux cutané subaigu (LECS). Nous avons observé au cours de cette étude que 2 patients atteints de PR, ne produisant initialement que des anti-Ro, avaient ensuite développé des anti-nADN et un rash de LECS, puis un tableau de LED. Un troisième patient porteur d'anti-Ro devait éventuellement développer un rash de LECS (voir résultats de l'étude de cohorte) et finalement des

anti-nADN. Cette association a été confirmée par d'autres (Cohen et al., 1986). Quoique le nombre de patients avec syndrome de chevauchement PR\LED soit faible, cette observation suggère que la présence d'anti-Ro chez les patients atteints de PR pourrait précéder le développement de ce syndrome et ainsi avoir une certaine valeur pronostique.

De façon intéressante, dans cette étude pilote, les patients anti-Ro positifs semblaient avoir répondu moins bien aux agents antirhumatismaux et avoir nécessité l'utilisation de corticostéroïdes et\ou d'immunosuppresseurs plus fréquemment que le groupe contrôle. L'inefficacité des traitements semblait plus fréquente que toute toxicité spécifique. D'un autre côté, une toxicité plus fréquente des patients anti-Ro positifs à la D-pénicillamine a été rapportée (Moutsopoulos et al., 1985). Une association entre HLA-DR3, toxicité à la D-pénicillamine, et anti-Ro a aussi été proposée (Panayi et al., 1978). Les résultats du typage HLA de nos patients ne semblaient pas confirmer cette hypothèse, mais portaient sur un nombre insuffisant de malades. Compte tenu des développements récents dans la caractérisation moléculaire des antigènes du CMH qui ont permis de définir de nombreuses sous-classes aux HLA, il n'est pas étonnant que les associations définies sérologiquement ne soient pas absolues.

En conclusion, ces résultats préliminaires suggéraient que la présence d'anti-Ro caractérisait un sous-groupe de patients avec PR qui présentait des manifestations cliniques

et sérologiques plus sévères et une réponse moins qu'optimale aux agents antirhumatismaux.

4.5 Signification clinique des anti-Ro dans la polyarthrite rhumatoïde

Outre les résultats de notre étude pilote, l'étude de la signification clinique des anticorps anti-Ro dans la polyarthrite rhumatoïde nous semblait justifiée. La première raison était quantitative. La prévalence d'anti-Ro chez les patients atteints de PR se situe probablement entre 3 et 5% (Tan, 1982) (bien qu'une étude grecque aie rapporté jusqu'à 23% [Moutsopoulos et al., 1984]); le même anticorps serait présent chez environ 30% des patients atteints de LED, chez 50 à 80% des patients atteints de Sjögren primaire, et chez 10 à 20% des patients atteints de sclérodémie. Bien que la contribution des patients atteints de PR puisse ainsi apparaître négligeable, la prévalence de chacune de ces maladies influence fortement le nombre de patients avec anti-Ro: 0.3 à 1.5% de la population âgée de plus de 18 ans souffrirait de PR, alors que la prévalence pour le LED et le SS primaire dans cette population serait d'environ 0.05 à 0.1% chacune, et celle de la sclérodémie inférieure à 0.01%. Pour chaque million d'adultes, on peut calculer qu'un minimum de 500 et un maximum de 1870 personnes atteintes de collagénose produiraient des anti-Ro. Celles-ci se répartiraient en 90 à 750 souffrant de PR, 250

à 800 de SS, 150 à 300 de LED, et 10 à 20 de sclérodermie. Les patients rhumatoïdes représenteraient donc environ 35% (intervalle de 7 à 65%) des patients atteints de collagénose producteurs d'anti-Ro. Jusqu'à présent, la plupart des études sur la signification clinique des anti-Ro ont porté sur les patients atteints de LED ou de SS, négligeant la population rhumatoïde.

Deuxièmement, la PR est une maladie extrêmement hétérogène pour laquelle il est difficile d'établir un pronostic. Certains autoanticorps représentent déjà des marqueurs utiles. Ainsi, la présence d'un facteur rhumatoïde IgM positif est associée à une atteinte extra-articulaire plus sévère; un tel autoanticorps est toutefois présent chez 70% des patients et présente donc peu de spécificité. De même, la présence d'un FAN positif pourrait indiquer une sévérité plus importante de la maladie, mais les résultats restent conflictuels. Identifier des sous-populations plus homogènes à l'intérieur des patients atteints de PR pourrait permettre d'améliorer leur management ainsi que la planification d'essais cliniques.

Nous avons opté pour une étude de cohorte transversale sans intervention, donc essentiellement descriptive. Tous les patients consécutifs évalués par un membre de l'Unité des Maladies Rhumatismales du CHU de Sherbrooke entre Novembre 1985 et Mai 1987 constituaient la population cible. L'inclusion automatique des patients lors du diagnostic, l'absence de rappel des patients connus producteurs d'anti-

Ro et l'analyse groupée des sera codés visaient à minimiser les biais éventuels. Les relevés des dossiers ont été faits (en partie par une étudiante d'été, Nathalie Cauchon) dans l'ignorance des résultats des tests de détection des anticorps antinucléaires. De même nous avons défini à l'avance, à partir des résultats de notre étude pilote, 5 manifestations extra-articulaires considérées cliniquement significatives que nous désirions comparer. Le développement de l'une ou l'autre de ces manifestations chez un patient était considérée la manifestation d'une atteinte sévère. De même, la taille de l'échantillon visé a été établie a priori à 292 patients (intervalle 180 à 600). Cet échantillon devait nous permettre d'identifier une différence significative (statistiquement et cliniquement), et ceci avec une puissance de 80%.

Nous avons essentiellement atteint notre objectif puisque un total de 303 patients porteurs d'un diagnostic de PR ont été examinés par un membre de l'UMR au cours de la période de l'étude. De ce nombre, 278 ont signé un formulaire de consentement et ont subi le bilan recommandé. Ceci représente un taux d'inclusion de 91.7% de la population disponible. Deux patientes ont refusé d'être incluses dans l'étude, trois sera semblent avoir été perdus, et 20 patients ne semblent pas avoir été sollicités. Les patients non-inclus dans l'étude ne différaient pas significativement des patients inclus au niveau des données démographiques et du taux de séropositivité pour le facteur rhumatoïde et le

FAN. Les patients non inclus semblaient toutefois présenter de façon significative une atteinte radiologique articulaire moins sévère. Ceci pourrait toutefois résulter de ce que plusieurs patients non inclus n'avaient pas subi de radiographies récentes. Le grade radiologique montre habituellement une détérioration rapide au cours des 2 premières années de maladie (Fuchs et al., 1989) puis une détérioration plus graduelle mais le plus souvent continue. Par contre, les patients non-inclus étaient aussi plus susceptibles ($p \leq 0.05$) de souffrir de symptômes de SS. La signification de cette différence est difficile à préciser puisque les données disponibles au dossier des patients non-inclus étaient très fragmentaires. La non-inclusion de ces 25 patients ne nous semble pas représenter un biais systématique et est donc peu susceptible de modifier significativement les conclusions de notre étude.

De l'échantillon de 278 patients rhumatoïdes, 16 produisaient un anticorps détectable par ID. Huit produisaient des anti-Ro isolés, 1 de l'anti-Ro et de l'anti-La, 2 des anti-La isolés, 1 de l'anti-RNP, et 4 se formaient des lignes de précipitine ne correspondant à aucun système de référence connu. La prévalence d'anti-Ro dans notre échantillon était donc de 3.2%. Les patients producteurs d'anti-Ro ne différaient au niveau clinique du groupe anti-Ro négatif que par la prévalence plus importante de symptomatologie suggestive de SS ($p \leq 0.00001$). Cette constatation vient en contradiction avec notre étude pilote où les patients

avec PR producteurs d'anti-Ro ne présentaient pas de SS plus fréquemment que le groupe contrôle. Rétrospectivement, il est possible que la tenue d'une étude sur une exocrinopathie associée au SS chez les patients avec PR concurremment à notre étude pilote aie biaisé l'ensemble de patients à partir duquel notre groupe contrôle avait été établi. En effet le nombre de critères par patient producteur d'anti-Ro est similaire dans les deux études (1.7 vs 1.6), alors qu'il diffère fortement dans le cas des patients anti-Ro négatifs (1.3 vs 0.5). Les résultats de notre étude transversale confirment donc l'association anti-Ro\SS secondaire chez les patients avec PR (Moutsopoulos et al., 1984; Moutsopoulos et al, 1985).

De même, les patients producteurs d'anti-Ro ne différaient pas significativement des patients anti-Ro négatifs au niveau sérologique, sauf en ce qui concerne le niveau du C3 ($p \leq 0.02$). Nous n'avons donc pas confirmé les résultats de notre étude pilote suggérant une hyperréactivité immune associée à la production d'anti-Ro. Effectivement, les titres de facteur rhumatoïde ainsi que la quantité de gammaglobulines et de cryoglobulines étaient plus élevés dans le groupe anti-Ro positif (surtout ceux présentant des manifestations extra-articulaires sévères), mais aucune de ces différences n'atteignait un niveau significatif.

Dans l'échantillon total, 24 patients (8.6%) ont présenté les manifestations cibles, ce qui représente une prévalence plus élevée que prévu. Cette prévalence élevée

rhumatoïdes producteurs et non-producteurs d'anti-Ro est confirmée par un test d'indépendance ($G = 11.3$, pour un $p \leq 0.001$). De façon intéressante, 2 patients avec anti-Ro et 3 patients anti-Ro négatifs présentaient une photosensibilité importante, définissant un risque relatif de 19.93. Il semble donc que la présence d'anti-Ro dans leur serum représente un marqueur pour le développement de ces manifestations extra-articulaires. Il n'est pas clair, toutefois, si ce lien est de nature causale ou si la production de l'autoanticorps reflète une immunodéficiences prédisposant à ces manifestations cliniques, ou encore si la production de l'autoanticorps représente une réponse de l'hôte aux stimuli induisant la maladie.

Chez nos patients rhumatoïdes, nous n'avons pas observé d'association de l'anti-Ro avec des manifestations comme la vasculite nécrosante, l'anémie ou la thrombopénie, l'hypergammaglobulinémie, des titres élevés de facteur rhumatoïde ou de FAN, ou les atteintes du système nerveux central, tel que décrites dans le SS (Alexander et al., 1983; Provost et al., 1988). De même, parmi les manifestations associées à l'anti-Ro dans le LED, nous n'avons pas observé une incidence accrue de néphrite ou de production d'anti-nADN (Wasicek et al., 1982), ni un titre de facteur rhumatoïde plus élevé (Bell et al., 1980); la photosensibilité semblait toutefois, comme dans le LED (Mond et al., 1989), significativement associée à l'anti-Ro. Il semble donc que les associations de l'anti-Ro que nous

rapportons reflètent une situation propre à la PR. Comme les manifestations associées à l'anti-Ro sont variables d'une collagénose à l'autre, il est vraisemblable que le background génétique de l'individu ou la maladie dont il est atteint module les associations cliniques associées à l'anti-Ro. Par ailleurs, puisque les patients producteurs d'anti-Ro ne représentaient que 9% (4/44) des patients avec SS secondaire, il semble que les manifestations extra-articulaires observées soient associées à la production d'anti-Ro et non à la présence d'un syndrome sec. La part respective que joueraient le SS et l'anti-Ro dans les manifestations observées sera l'objet d'études ultérieures.

Les associations les plus étroites avec la présence d'anti-Ro, qui devraient donc éveiller l'attention, sont le développement d'un purpura non thrombocytopénique, une photosensibilité importante, et une leucopénie non explicable par une toxicité médicamenteuse. Par contre, nos observations confirment l'étroite association entre la présence d'anti-Ro et la mise au monde d'un enfant atteint de bloc AV congénital et du développement d'un syndrome de chevauchement LED\PR caractérisé par un lupus érythémateux cutané subaigu. Notre population de rhumatoïdes semble enfin avoir été traitée de façon semblable à des populations similaires de rhumatoïdes. Aucune toxicité particulière des patients anti-Ro positifs aux agents anti-rhumatismaux n'a été identifiée. L'absence d'exposition de nos malades producteurs d'anti-Ro à la D-pénicillamine ne nous permet

pas de confirmer la fréquence des réactions toxiques qui y serait associée. Tout au plus est-il possible d'affirmer que, probablement en conséquence de leur prévalence de manifestations extra-articulaires sévères, les patients producteurs d'anti-Ro ont plus de risques d'être traités avec des doses élevées de corticostéroïdes et/ou avec des immunosuppresseurs.

En conclusion, il semble donc que la présence d'anticorps anti-Ro détectables par ID représente un marqueur pour un sous-groupe de patients souffrant de PR. Ces patients ne semblent pas présenter de différences au niveau de leur maladie articulaire. Toutefois, ils souffrent plus fréquemment de SS secondaire, de neutropénie sévère, de photosensibilité, et de purpura de type vasculitique. Certains d'entre eux sont également à risque de donner naissance à un enfant avec lupus néonatal et de développer un lupus cutané subaigu dans le cadre d'un syndrome de chevauchement LED\PR. Puisque les patients producteurs d'anti-Ro ne représentaient que 9% (4/44) des patients avec SS secondaire, il semble que les manifestations extra-articulaires observées soient associées à la production d'anti-Ro et non à la présence d'un syndrome sec. De plus, nous n'avons pas observé chez nos patients avec PR d'association de l'anti-Ro avec des manifestations telles que la vasculite nécrosante, la thrombopénie, l'hyperactivité immune (hypergammaglobulinémie, titres élevés de FR et de FAN), ou l'atteinte du système nerveux central décrites avec le SS

(Alexander et al, 1983). Il semble donc que la présence d'une collagénose sous-jacente module les manifestations cliniques associées à l'anti-Ro. La part respective que joueraient le SS et l'anti-Ro dans les manifestations observées sera l'objet d'études ultérieures.

4.6 Conclusion

Les patients atteints de PR producteurs d'anti-Ro présentent donc eux-même une hétérogénéité clinique. Nous croyons que la démonstration d'une hétérogénéité immunologique des anticorps anti-Ro pourrait sous-tendre cette diversité. Au moins quatre types de déterminants antigéniques reconnus par les anti-Ro ont ainsi été mis en évidence: des épitopes linéaires sur le polypeptide Ro de 60 kD, des épitopes conformationnels sur la protéine Ro de 60 kD, des épitopes conformationnels sur la ribonucléoprotéine RohY5, alors que certains anticorps anti-Ro reconnaissent d'autres polypeptides de 52, 54, ou 60 kD. A l'aide de techniques de détection plus sensibles et reconnaissant chacune de ces populations d'anticorps, nous espérons analyser leurs corrélations cliniques. Par la même occasion, nous évaluerons la spécificité et la sensibilité des techniques d'immunodiffusion et d'immunobuvardage pour la détection d'anti-Ro dans cette population par rapport à l'immunoprécipitation (Boire et al., 1990). L'utilité cli-

nique de ces techniques de détection plus sensibles et/ou plus spécifiques reste toutefois à préciser.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Henri-A. Ménard pour son encouragement et son support tout au long de cette maîtrise. Je le remercie de m'avoir montré l'intérêt, et la beauté, de la rhumatologie tant dans ses aspects cliniques que fondamentaux.

Je tiens à remercier sincèrement les Drs Joe Craft et John A. Hardin pour leur support inconditionnel pendant et après mon séjour dans leur laboratoire. Je les remercie notamment de l'autonomie qu'ils m'ont accordée tout en me fournissant un cadre où j'ai pu améliorer ma formation et jeter les bases d'une carrière de chercheur autonome.

Il est important de souligner la collaboration des Drs André Lussier et Daniel Myhal qui ont ainsi rendu possibles les études cliniques décrites dans mon mémoire. Je remercie également le personnel du laboratoire du Dr Ménard, notamment Carol Richard, Hélène Labonville, et Maryse Gendron, pour leur aide inestimable dans le déroulement des études cliniques.

Je tiens à souligner la bonne humeur et l'ardeur au travail de Nathalie Cauchon, dont l'aide pour la révision des dossiers m'a été indispensable.

Un merci particulier va aussi à Marthe Filion pour son aide dans la mise en page finale de ce mémoire.

Et j'adresse mes derniers remerciements à Marie-Claude, à qui j'ai imposé tant de difficultés, de frustrations, et de surcroît de travail dans l'éducation de nos enfants.

REFERENCES

Alarcon-Segovia D., Ruiz-Arguelles A. & Llorente L. (1979) Antibody penetration into living cells. II. Anti-ribonucleoprotein IgG penetrates into Tgamma lymphocytes causing their deletion and the abrogation of suppressor function. *J. Immunol.* 122; 1855-1863.

Alexander E.L., Arnett F.C., Provost T.T. & Stevens M.B. (1983) Sjögren's syndrome: association of anti-Ro(SS-A) antibodies with vasculitis, hematologic abnormalities, and serologic hyperreactivity. *Ann. Intern. Med.* 98; 155-159.

Alspaugh M.A., Talal N. & Tan E.M. (1976) Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 19; 216-222.

Altman S.A., Gold H. & Bartkiewicz M. (1988) Ribonuclease P as an snRNP. Dans M. Birnstiel (Editeur) *Small nuclear ribonucleoproteins*. Springer, New York. pp. 183-195.

Arnett F.C., Hamilton R.G., Reveille J.D., Bias W.B., Harley J.B. & Reichlin M. (1989) Genetic studies of Ro (SS-A) and La (SS-B) autoantibodies in families with systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 32; 413-419.

Babbitt B.P., Allen P.M., Matsueda G., Haber E. & Unanue E.R. (1985) Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317; 359-361.

Barlow D.J., Edwards M.S. & Thornton J.M. (1986) Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 322; 747-748.

Bell D.A. & Maddison P.J. (1980) Serologic subsets in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 23; 1268-1273.

Bell D.A., Komar R., Chodirker W.B., Block J. & Cairns E. (1984) A comparison of serologic reactivity among SLE patients with or without anti-Ro(SS-A) antibodies. *J. Rheumatol.* 11; 315-317.

Bell D.A., Cairns E., Cikalo K., Ly V., Block J. & Pruzanski W. (1987) Antinucleic acid autoantibody responses of normal human origin: antigen specificity and idiotypic characteristics compared to patients with systemic lupus erythematosus and patients with monoclonal IgM. *J Rheumatol.* 14 (Suppl. 13); 127-131.

Benacerraf B. (1988) Antigen processing and presentation. The biologic role of MHC molecules in determinant selection. *J. Immunol* 141 (Suppl.); S17-S20.

Ben-Chetrit E., Chan E.K.L., Sullivan K.F. & Tan E.M. (1988) A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J. Exp. Med.* 167; 1560-1571.

Ben-Chetrit E., Gandy B.J., Tan E.M. & Sullivan K.F. (1989) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J. Clin. Invest.* 83; 1284-1292.

Benjamin D.C., Berzofsky J.A., East I.J., Gurd F.R.N., Hannum C., Leach S.J., Margoliash E., Michael J.G., Miller A., Prager E.M., Reichlin M., Sercarz E.E., Smith-Gill S.J., Todd P.E. & Wilson A.C. (1984) The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Annu. Rev. Immunol.* 2; 67-101.

Boire G. & Ménard H.A. (1985) Clinical significance of anti-SSA (Ro) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 28 (supplément); S47.

Boire G. & Ménard H.A. (1989) RUPUS: a RA subset predicted and defined by the presence of anti-native Ro antibody. *Arthritis Rheum.* 32 (supplément): S16.

Boire G., Lopez-Longo F.X. & Ménard H.A. (1987) Western blotting of anti-Ro (SS-A) positive sera reveals at least two subsets. *Arthritis Rheum.* 30 (supplément); A53.

Boire G. & Ménard H.A. (1988) Clinical significance of anti-Ro(SSA) antibody in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol* 15; 391-394.

Boire G. & Craft J. (1989) Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. Analysis with sera specific for the Ro^{hY5} particle. *J. Clin. Invest.* 84; 270-279.

Boire G. & Craft J. (1990) Human Ro ribonucleoprotein particles: Characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J. Clin. Invest.* 85; 1182-1190.

Boire G., Gendron M., Richard C. & Ménard H.A. (1990) Native immunoblotting to detect anti-Ro autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 33 (supplément); R43.

Cairns E., Komar R. & Bell D.A. (1986) Cytoskeletal binding of monoclonal anti-DNA antibodies derived from tonsillar lymphoid cells of a normal subject. *Arthritis Rheum.* 29; 1351-1358.

Carroll P., Stafford D., Schwartz R.S. & Stollar B.D. (1985) Murine monoclonal anti-DNA autoantibodies bind to endogeneous bacteria. *J. Immunol.* 135; 1086-1090.

Chestnut R.W. & Grey H.M. (1981) Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 126; 1075-1079.

Clark G., Reichlin M. & Tomasi T.B. Jr (1969) Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 102; 117-122.

Cohen S., Stastny P. & Sontheimer R.D. (1986) Concurrence of subacute cutaneous lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 29; 421-425.

Craft J., Mimori T., Olsen T.L. & Hardin J.A. (1988) The U2 small nuclear ribonucleoprotein particle as an autoantigen: analysis with sera from patients with overlap syndromes. *J. Clin. Invest.* 81; 1716-1724.

Decker J.L. & Plotz P.H. Extra-articular rheumatoid disease. Dans D.J. McCarty (Editeur) *Arthritis and allied conditions.* Lea et Febiger, Philadelphia (1985), pp. 620-642.

Deng J.S., Sontheimer R.D. & Gilliam J.N. (1985) Molecular characteristics of SS-B/La and SS-A/Ro cellular antigens. *J. Invest. Dermatol.* 84; 86-90.

Deng J.S., Bair L.W. Jr., Shen-Schwarz S., Ramsey-Goldman R. & Medsger T. Jr. (1987) Localisation of Ro (SS-A) antigen in the cardiac conduction system. *Arthritis Rheum.* 30; 1232-1238.

Deutscher S.L., Harley J.B. & Keene J.D. (1988) Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 9479-9483.

Eisenberg R.A. (1985) Association between the Ro and La antigenic determinants: immunodiffusion analysis of human spleen extract. *J. Immunol.* 135; 1707-1713.

Elkon K.B. & Culhane L. (1984) Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J. Immunol.* 132; 2350-2356.

Fleiss J.L., Tytun A. & Ury H.K. (1980) A simple approximation for calculating sample size for comparing independent proportions. *Biometrics* 36; 343-346.

Forman M.S., Nakamura M., Mimori T., Gelpi C. & Hardin J.A. (1985) Detection of antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and small cytoplasmic ribonucleoproteins using unlabeled cell extracts. *Arthritis Rheum* 28; 1356-1361.

French D.L., Laskov R. & Scharff M.D. (1989) The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. *Science* 244; 1152-1157.

Fries J.F. (1990) Reevaluating the therapeutic approach to rheumatoid arthritis: the "sawtooth" strategy. *J. Rheumatol* 17 (Supplement 22); 12-15.

Fries J.F., Spitz P.W., Williams C.A., Bloch D.A., Singh G. & Hubert H.B. (1990) A toxicity index for comparison of side effects among different drugs. *Arthritis Rheum.* 33; 121-130.

Fritzler M.J., Kinsella T.D. & Garbutt E. (1980) The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am. J. Med.* 69; 520-526.

Fuchs H.A., Kaye J.J., Callahan L.F., Nance E.P. & Pincus T. (1989) Evidence of significant radiographic damage in RA within the first 2 years of disease. *J. Rheumatol* 16; 585-591.

Furukawa F., Lyons M.B., Lee L.A., Coulter S.N. & Norris D.A. (1988) Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. Another possible mechanism for estradiol influence of lupus erythematosus. *J. Immunol.* 141; 1480-1488.

Gaither K.K., Fox O.F., Yamagata H., Mamula M.J., Reichlin M. & Harley J.B. (1987) Implications of anti-Ro/Sjögren's syndrome A antigen autoantibody in normal sera for autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 79; 841-846.

Germain R.N. (1986) The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 322; 687-689.

Goldberg J. & Pinals R.S. (1980) Felty syndrome. *Sem. Arthritis Rheum.* 10; 52-65.

Gottlieb E. & Steitz J.A. (1989) Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.* 8; 851-861.

Greenspan J.S., Daniels T.E., Talal N. & Sylvester R.A. (1974) The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Pathol* 37; 217-229.

Habets W.J., den Brok J.H., Boerbooms A.M.T., van de Putte L.B.A. & van Venrooij W.J. (1983) Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells. *EMBO J.* 2; 1625-1631.

Hamilton R.G., Harley J.B., Bias W.B., Roebber M., Reichlin M., Hochberg M.C. & Arnett F.C. (1988) Two Ro (SS-A) autoantibody responses in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 31; 496-505.

Hardin J.A. & Mimori T. (1985) Autoantibodies to ribonucleoproteins. *Clin. Rheum. Dis.* 11; 485-505.

Harley J.B., Alexander E.L., Bias W.B., Fox O.F., Provost T.T., Reichlin M., Yamagata H. & Arnett F.C. (1986) Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 29; 196-206.

Harlow E., & Lane D. Antigen-antibody interaction. Dans E. Harlow & D. Lane (Ed.): *Antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988), pp. 23-35.

Harmon C.E., Deng J.S., Peebles C.L. & Tan E.M. (1984) The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum.* 27; 166-173.

Hedrick S.M., Cohen D.I., Nielsen E.A. & Davis M.M. (1984) Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane associated proteins. *Nature* 308; 149-153.

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. *Mol. Cell. Biol.* 1; 1138-1149.

Hochberg M.C. Epidemiology of the rheumatic diseases. Dans H.R. Schumacher (Editeur) Primer on the rheumatic diseases. (1988) Arthritis Foundation, Atlanta, pp 48-51.

Hollander Z. & Katchalski-Katzir E. (1986) Use of monoclonal antibodies to detect conformational alterations in lactate dehydrogenase isoenzyme 5 on heat denaturation and on adsorption to polystyrene plates. *Mol. Immunol.* 23; 927-933.

Hozumi N. & Tonegawa S. (1976) Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73; 3628-3632.

Jemmerson R. & Margoliash E. (1979) Specificity of the antibody response of rabbits to a self-antigen. *Nature* 282; 468-471.

Jemmerson R. (1987) Antigenicity and native structure of globular proteins: low frequency of peptide reactive antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84; 9180-9184.

Jemmerson R. & Blankenfeld R. (1988) Clonal analysis of the BALB/c secondary B cell repertoire specific for a self-antigen, cytochrome c. *J. Immunol.* 140; 1762-1769.

Kato N., Hoshino H. & Harada F. (1982) Nucleotide sequence of 4.5S RNA (C8 or hY5) from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108; 363-370.

Koffler D., Agnello V. & Kunkel H.G. (1974) Polynucleotide immune complexes in serum and glomeruli of patients with systemic lupus erythematosus. *Am. J. Pathol.* 74; 109-124.

Kurt-Jones E.A., Liano D., HayGlass K.A., Benacerraf B., SY M.S. & Abbas A.K. (1988) The role of antigen-presenting B cells in T cell priming in vivo. Studies of B cell-deficient mice. *J. Immunol.* 140; 3773-3778.

Kushner I (1989) Does aggressive therapy of rheumatoid arthritis affect outcome? *J. Rheumatol.* 16; 1-4.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227; 680-685.

Lanzavecchia A. (1985) Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314; 537-539.

Lapointe S. (1990) Des autoanticorps reconnaissent des déterminants conformationnels de la protéine Ro(SS-A) Mémoire de maîtrise déposé, Université de Sherbrooke.

Lee L.A., Gaither K.K., Coulter S.N., Norris D.A. & Harley J.B. (1989) Pattern of cutaneous immunoglobulin G deposition in subacute cutaneous lupus erythematosus is reproduced by infusing purified anti-Ro(SSA) autoantibodies into human skin-grafted mice. *J. Clin. Invest.* 83; 1556-1562.

LeFeber W.P., Norris D.A., Ryan S.R., Huff J.C., Lee L.A., Kubo M., Boyce S.T., Kotzin B.L. & Weston W.L. (1984) Ultra-violet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 74; 1545-1551.

Lerner M.R. & Steitz J.A. (1979) Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76; 5495-5499.

Levinson A.I. & Martin J. (1988) Rheumatoid factor: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Br. J. Rheumatol.* 27; 83-90.

Lieu T.S., Jiang M., Steigerwald J.C. & Tan E.M. (1984) Identification of the SS-A/Ro intracellular antigen with autoimmune sera. *J. Immunol. Meth.* 71; 217-228.

Lieu T.S., Newkirk M.M., Capra J.D. & Sontheimer R.D. (1988) Molecular characterization of human Ro/SS-A antigen. Amino terminal sequence of the protein moiety of human Ro/SS-A antigen and immunological activity of a corresponding synthetic peptide. *J. Clin. Invest.* 82; 96-101.

Lorenz R.G. & Allen P.M. (1988) Direct evidence for functional self-protein/Ia-molecule complexes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 5220-5223.

Mamula M.J., Fox O.F., Yamagata H. & Harley J.B. (1987) The Ro/SSA autoantigen as an immunogen. Some anti-Ro/SSA antibody binds IgG. *J. Exp. Med.* 86; 1889-1901.

Mamula M.J., O'Brien C.A., Harley J.B. & Hardin J.A. (1989) The Ro ribonucleoprotein particle: induction of autoantibodies and the detection of Ro RNAs among species. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52; 435-446.

McCauliffe D.P., Lux F.A., Lieu T.S., Sanz I., Hanke J., Newkirk M.M., Bachinski L.L., Itoh Y., Siciliano M.J., Reichlin M., Sontheimer R.D. & Capra J.D. (1990) Molecular cloning, expression, and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. *J. Clin. Invest.* 85; 1379-1391.

Melms A., Chrestel S., Schalke B.C.G., Wekerle H., Mauron A., Ballivet M. & Barkas T. (1989) Autoimmune T lymphocytes in myasthenia gravis. Determination of target epitopes using T lines and recombinant products of the mouse nicotinic acetylcholine receptor gene. *J. Clin. Invest.* 83; 785-790.

Meyer O., Hauptmann G., Tappeiner G., Ochs H.D. & Mascart-Lemone F. (1985) Genetic deficiency of C4, C2 or C1q and lupus syndromes. Association with anti-Ro (SS-A) antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 62; 678-684.

Mimori T., Hardin J.A. & J.A. Steitz (1986) Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders. *J. Biol. Chem.* 261; 2274-2278.

Mond C.B., Peterson M.G.E. & Rothfield N.F. (1989) Correlation of anti-Ro antibody with photosensitivity rash in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 32; 202-204.

Monteilhet C. & Aggerbeck L.P. (1986) High performance liquid chromatographic purification of a ribonucleoprotein complex and its protein component. *Anal. Biochem.* 154; 162-170.

Moutsopoulos H.M., Giotaki H., Maddison P.J., Mavridis A.C., Drosos A.A. & Skopouli F.N. (1984) Antibodies to cellular antigens in Greek patients with autoimmune rheumatic diseases: anti-Ro(SSA) antibody a possible marker of penicillamine-D intolerance. *Ann. Rheum. Dis.* 43; 285-287.

Moutsopoulos H.M., Skopouli F.N., Sarras A.K., Tsampoulas C., Mavridis A.K., Constantopoulos S.H. & Maddison P.J. (1985) Anti-Ro(SSA) positive rheumatoid arthritis (RA): a clinicoserological group of patients with high incidence of D-penicillamine side effects. *Ann. Rheum. Dis.* 44; 215-219.

Norris D.A., Ryan S.R., Fritz K.A., Kubo M., Tan E.M., Deng J.S. & Weston W.L. (1984) The role of RNP, Sm, and SS-A/Ro-specific antisera from patients with lupus erythematosus in inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of targets coated with nonhistone nuclear antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 31; 311-320.

Nossal G.J.V. & Lederberg J. (1958) Antibody production by single cells. *Nature* 181; 1419-1420.

Nossal G.J.V., Cunnigham A., Mitchell G.F. & Miller J.F.A.P. (1968) Cell to cell interaction in the immune response. *J. Exp. Med.* 128; 839-853.

Nossal G.J.V. (1983). Cellular mechanisms of immunologic tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 1; 33-62.

Nossal G.J.V. (1987) The basic components of the immune system. *N. Engl. J. Med.* 316; 1320-1325.

Nossal G.J.V. (1989) Immunologic tolerance: collaboration between antigen and lymphokines. *Science* 245; 147-153.

Notman D.D., Kurata N. & Tan E.M. (1975) Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann. Intern. Med.* 83; 464-469.

O'Brien C.A. & Harley J.B. (1990) A subset of hY RNAs is associated with erythrocyte Ro ribonucleoproteins. *EMBO J.* 9; 3683-3689.

Ohsone Y., Akizuki M., Hirakata M., Satoh M., Yamagata H. & Homma M. (1986) In vitro production of autoantibodies to U1 ribonucleoproteins by peripheral blood mononuclear cells from patients with connective tissue diseases. *Arthritis Rheum.* 29; 1343-1350.

Panayi G.S., Wooley P. & Batchelor J.R. (1978) Genetic basis of rheumatoid disease: HLA antigens, disease manifestations, and toxic reactions to drugs. *Br. Med. J.* 2; 1326-1328.

Parham P. (1989) MHC molecules. A profitable lesson in heresy. *Nature* 340; 426-428.

Provost T.T., Talal N., Harley J.B., Reichlin M. & Alexander E.L. (1988) The relationship between anti-Ro (SS-A) antibody-positive Sjögren's syndrome and anti-Ro (SS-A) antibody-positive lupus erythematosus. *Arch. Dermatol.* 124; 63-71.

Rader M.D., O'Brien C., Liu Y., Harley J.B. & Reichlin M. (1989) Heterogeneity of the Ro/SSA antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J. Clin. Invest.* 83; 1293-1298.

Radoux V., Ménard H.A., Bégin R., Décary F. & Koopman W.J. (1987) Airways disease in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 30; 249-256.

Raptis L. & Ménard H.A. (1980) Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest* 66; 1391-1399.

Reddy R., Tan E.M., Henning D., Nohga K. & Busch H. (1983) Detection of a nucleolar 7-2 ribonucleoprotein and a cytoplasmic 8-2 ribonucleoprotein with autoantibodies from patients with scleroderma. *J. Biol. Chem.* 258; 1383-1386.

Reeves W.H., Fisher D.E., Lahita R.G. & Kunkel H.G. (1985) Autoimmune sera reactive with Sm antigen contain high levels of RNP-like antibodies. *J. Clin. Invest.* 75; 580-587.

Reeves W.H. & Stoeber Z.M. (1989) Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J. Biol. Chem.* 264; 5047-5052.

Reichlin M. (1986) Significance of the Ro antigen system. *J. Clin. Immunol.* 6; 339-348.

Robinson M.F., Roberts J.L., Verrier Jones J. & Lewis E.J. (1979) Circulating immune complex assays in patients with lupus and membranous glomerulonephritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 14; 348-360.

Rock K.L., Benacerraf B. & Abbas A.K. (1984). Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med* 160; 1102-1113.

Rosa M.D., Hendrick J.P., Lerner M.R., Steitz J.A. & Reichlin M. (1983) A mammalian tRNA^{his}-containing antigen is recognized by the polymyositis-specific antibody anti-Jo-1. *Nucleic Acids Res.* 11; 853-870.

Rosario M.O., Fox O.F., Koren E. & Harley J.B. (1988) Anti-Ro(SS-A) antibodies from Ro(SS-A)-immunized mice. *Arthritis Rheum.* 31; 227-237.

Ruddy S. The management of rheumatoid arthritis. Dans W.N. Kelley, E.D. Harris Jr., S. Ruddy et C.B. Sledge (Editeurs) *Textbook of rheumatology.* (1985) W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 979-992.

Sanders V.M., Snyder J.M., Uhr J.W. & Vitetta E.S. (1986) Characterization of the physical interaction between antigen-specific B and T cells. *J. Immunol.* 137; 2395-2404.

Scherrer B. Comparaison de fréquences, proportions ou pourcentages. Dans G. Morin (Editeur) *Biostatistique* (1984) Gaetan Morin Editeur, Chicoutimi, Québec, pp. 465-500.

Schleif R. (1988) DNA binding by proteins. *Science* 241; 1182-1187.

Schumacher H.R. Criteria for the diagnosis and classification of the rheumatic diseases. Dans *Primer on the rheumatic diseases.* (1988) Arthritis Foundation, Atlanta, pp. 316-320.

Scopelitis E., Biundo J.J. & Alspaugh M.A. (1980) Anti-SS-A antibody and other antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 23; 287-293.

Scopelitis E., Perez M. & Biundo J.J. (1985) Anti-Ro(SS-A) antibody: a connective tissue disease marker. *J. Rheumatol.* 12; 1105-1108.

Scott J.S., Maddison P.J., Taylor P.V., Esscher E., Scott O. & Skinner R.P. (1983) Connective-tissue disease, antibodies to ribonucleoproteins, and congenital heart block. *N. Engl. J. Med.* 309; 209-212.

Sette A., Adorini L., Colon S.M., Buus S. & Grey H. (1989) Capacity of intact proteins to bind to MHC Class II molecules. *J. Immunol.* 143; 1265-1267.

Sharp G.C., Irvin W.S., Tan E.M., Gould R.G. & Holman H.R. (1972) Mixed connective tissue disease. An apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52; 148-159.

Sharp P.A. (1987) Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235; 766-771.

Shimonkevitz R., Kappler J., Marrack P. & Grey H. (1983) Antigen recognition by H-2-restricted T cells I. Cell-free antigen processing. *J. Exp. Med.* 158; 303-316.

Skopouli F.N., Andonopoulos A.P. & Moutsopoulos H.M. (1988) Clinical implications of the presence of anti-Ro(SSA) antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J. Autoimmunity* 3; 381-388.

Smith D.E. & Fischer P.A. (1984) Identification, developmental regulation, and response to heat shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose sheets. *J. Cell. Biol.* 99; 20-28.

Sontheimer R.D., Maddison P.J., Reichlin M., Jordon R.E., Stastny P. & Gilliam J.N (1982) Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 97; 664-671.

Stefano J.E. (1984) Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 36; 145-154.

Steinbrocker O., Traeger C.H. & Batterman R.C. (1949) Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *JAMA* 140; 659-662.

Tan E.M. (1982) Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv. Immunol.* 33; 167-240.

Tan E.M. (1989) Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44; 93-151.

Tesar J.T. & Armstrong J. (1986) Expression of Ro/SSA and La/SSB antigens on epithelial cell surface following in vitro adenovirus (AV) infection. *Arthritis Rheum.* 29 (Supplément); S74.

Theofilopoulos A.N. Autoimmunity. Dans Stites, Stobo and Wells (Ed.): *Basic and clinical immunology*. Appleton and Lange (1987), pp 128-158.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76; 4350-4354.

Townsend A., Ohlen C., Bastin J., Ljunggren H.G., Foster L. & Karre K. (1989) Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340; 443-448.

Unanue E.R. (1984) Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2; 395-428.

Walter P. & Blobel G. (1983) Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. *Cell* 34; 525-533.

Wasicek C.A. & Reichlin M. (1982) Clinical and serological differences between systemic lupus erythematosus patients with antibodies to Ro versus patients with antibodies to Ro and La. *J. Clin. Invest.* 69; 835-843.

Watson R.M., Lane A.T., Barnett N.K., Bias W.B., Arnett F.C. & Provost T.T. (1984) Neonatal lupus erythematosus. A clinical, serological and immunogenetic study with review of the literature. *Medicine* 63; 362-378.

Wilske K.R. & Healey L.A. (1989) Remodeling the pyramid - A concept whose time has come. *J. Rheumatol.* 15; 565-567.

Wolin S.T. & Steitz J.A. (1983) Genes for two small cytoplasmic Ro RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell* 32; 735-744.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81; 1996-2000.

Yamagata H., Harley J.B. & Reichlin M. (1984) Molecular properties of the Ro/SSA antigen and enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibody. *J. Clin. Invest.* 74; 625-633.

Yanagi Y., Yoshikai Y., Leggett K., Clark S.P., Aleksander I. & Mak T.W. (1984) A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 308; 145-149.

Zubler R.H., Werner-Favre C., Wen L., Sekita K.I. & Straub C. (1987) Theoretical and practical aspects of B-cell activation: murine and human systems. *Immunol. Rev.* 99; 281-299.

ANNEXE ATITRE DU PROJET: L'ANTI-SSA (Ro) DANS L'ARTHRITE RHUMATOIDE

Le.....

Par la présente, je consens à ce que le sérum tiré d'un prélèvement de 20 cc de mon sang total serve à la recherche d'auto-anticorps. Ce prélèvement servira à préciser la nature et l'étendue des anomalies biologiques qui pourraient être associées à cette maladie. Ce prélèvement pourrait être répété annuellement pour les besoins de cette étude ou plus fréquemment s'il s'avère que les trouvailles aient une implication pratique immédiate sur mon évolution et traitement.

La procédure m'a été expliquée par mon médecin et je comprends que ces prélèvements sanguins font partie de l'évaluation habituelle et n'ont pas de conséquences néfastes sur mon état de santé.

Il est entendu que ma participation n'implique aucun autre don ou prélèvement de spécimen biologique autre que ceux justifiés par mon état de santé. Tous les renseignements obtenus à l'occasion de cette étude seront traités de façon confidentielle.

.....
Signature du patient

.....
Signature du témoin

ANNEXE B

No dossier	Nom	Date Naissance	Sexe	Date d'inclusion	TOTAL
164 835		30-09-1933	M	09-85	

Critères PR: raideur arthrite 1 arthrite 2 symétrique douleur
 FR mucine Rx nodules hist. nodule hist. synov.

Durée de la maladie: 27 (x d. 78)

Niveau fonctionnel: 2

Grade radiologique: II

Critères LED: Papillon cutané photosensibilité aphtes arthrite
 sérologie rein séreuse hémato CNS FAN

SS: Bouche Biopsie: _____ Scintigraphie: _____
 Oeil Schirmer: _____ Rose Bengale: _____

Examen: thyroïde
 purpura ou vasculite
 rales pulmonaires auscultation
 foie augmenté cirrhose _____ Echo _____ Scinti _____
 rate augmentée Echo _____ Scinti _____
 neuropathie

Laboratoire: FR titre 1/3 UI/ml
 FAN titre NF
 C3 NF
 C4 NF
 Gammaglobuline NF
 Hb 14.1
 GB 3700
 PMN 64%
 Plaquettes 287 ca
 Protéinurie N
 SGOT > 2 N
 CPK > N NF
 EFR NF obstructif _____ restrictif _____

HLA-B270

Kit # 5000
 - cryo 2.3
 - dsDNA 7.6 A
 - Sm
 - RNP
 - autres
 - SSA
 - SSB
 - blotting Ro _____ La _____ ANA 1/40 faible
 Savoie _____
 Autre _____

Traitement: 1er -OR IM 7204 (durée 7203) EFF _____ INEFF TOX
 1er -Ridaura 8263 (durée 3765) EFF INEFF _____ TOX schizoparad 2
 1er -D-Pen 7452 (durée 71-12) EFF _____ INEFF TOX
 1er -Plaquenil 7722 (durée 88-13) EFF _____ INEFF TOX
 Immunosuppresseurs: 1

Prednisone > 5 mg die (durée _____)
 Autres: q

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56