

Université de Sherbrooke

**Identification et caractérisation  
de l'autoantigène des cANCA: la myéloblastine**

Par

**Gratien Dalpé, B.sc.**

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade

de maître ès sciences (M.Sc.)

Septembre 1993



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street  
Ottawa, Ontario  
K1A 0N4

Bibliothèque nationale  
du Canada

Direction des acquisitions et  
des services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa (Ontario)  
K1A 0N4

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

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.

L'AUTEUR A ACCORDE UNE LICENCE IRREVOCABLE ET NON EXCLUSIVE PERMETTANT A LA BIBLIOTHEQUE NATIONALE DU CANADA DE REPRODUIRE, PRETER, DISTRIBUER OU VENDRE DES COPIES DE SA THESE DE QUELQUE MANIERE ET SOUS QUELQUE FORME QUE CE SOIT POUR METTRE DES EXEMPLAIRES DE CETTE THESE A LA DISPOSITION DES PERSONNE INTERESSEES.

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 CONSERVE LA PROPRIETE DU DROIT D'AUTEUR QUI PROTEGE SA THESE. NI LA THESE NI DES EXTRAITS SUBSTANTIELS DE CELLE-CI NE DOIVENT ETRE IMPRIMES OU AUTREMENT REPRODUITS SANS SON AUTORISATION.

ISBN 0-315-98693-X

Canada

**Gratien Dalpé**

**Identification et caractérisation  
de l'autoantigène des cANCA: la myeloblastine**

# Table des matières

	Pages
Table des matières .....	3
Liste des illustrations .....	7
Liste des abréviations .....	9
Résumé.....	11
<b>1.0 Introduction.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Système immunitaire.....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Définitions .....	19
1.1.1.1 Antigène.....	19
1.1.1.2 Epitope .....	19
1.1.1.3 Anticorps.....	19
1.1.1.4 Tolérance et autoimmunité .....	20
1.1.2 Mécanismes cellulaires de la réponse humorale.....	20
1.1.2.1 Présentation de l'antigène .....	21
1.1.2.2 Fonctions des lymphocytes T et $\beta$ .....	22
<b>1.2 Les ANCA.....</b>	<b>26</b>
1.2.1 Définitions.....	26
1.2.1.1 ANCA .....	26
1.2.1.2 cANCA, pANCA et aANCA .....	26
1.2.2 Historique .....	27
1.2.2.1 Découverte par immunofluorescence indirecte.....	27
1.2.2.2 Autoantigènes ciblés .....	27
1.2.2.2.1 pANCA .....	28



1.2.2.2.2 aANCA .....	28
1.2.2.2.3 cANCA .....	28
1.2.2.3 Sources cellulaires .....	30
1.2.2.4 Immunoglobulines ANCA.....	31
1.3 Rôle pathogénique des autoanticorps .....	31
1.4 Rôle pathogénique des ANCA.....	32
1.4.1 Un modèle <i>in vitro</i> .....	32
1.4.2 Un modèle animal .....	33
1.5 Différenciation cellulaire myéloïde .....	34
1.5.1 Modèle de différenciation des promyélocytes .....	34
1.5.2 Clonage de l'ADNc et rôle de la myéloblastine .....	35
1.6 La myéloblastine: aspects moléculaires.....	36
1.6.1 Clonage du gène .....	36
1.6.2 Expression du gène.....	37
1.6.3 Substrats de la protéase .....	38
1.6.4 Activité microbicide .....	39
1.6.5 Translocation de la protéase à la surface membranaire .....	39
1.6.6 Homologie avec des protéines procaryotiques .....	41
<b>2.0 Matériels et méthodes .....</b>	<b>43</b>
2.1 Liste du matériel et des fournisseurs.....	44
2.2 Sera .....	44
2.3 Culture de cellules et préparation des extraits cellulaires .....	45
2.4 Immunofluorescence indirecte.....	45
2.5 Technique d'électrophorèse des protéines.....	46
2.6 Marquage de cellules HL60 avec de la <sup>35</sup> S-méthionine et de la <sup>35</sup> S-cystéine .....	46
2.7 Immunoprécipitation à partir d'extraits cellulaires.....	47

2.8 Immunodéplétion de la myéloblastine d'un extrait de neutrophiles ....	47
2.9 Analyse des protéines de surface.....	48
2.10 Marquage des cellules HL60 avec du <sup>32</sup> P-orthophosphate.....	48
2.11 Traitement de la myéloblastine à la phosphatase alcaline.....	49
2.12 Immunoprécipitation de petits polypeptides de la myéloblastine par un sérum cANCA.....	49
2.13 Immunoprécipitation d'une phosphoprotéine de 15 kD induite par le mannitol dans les bactéries <u>Staphylococcus aureus</u> .....	49
<b>3.0 Résultats .....</b>	<b>51</b>
3.1 Immunofluorescence indirecte et immunoprécipitation des autoantigènes ciblés par les différents types d'ANCAs.....	52
3.2 Immunoprécipitation d'une protéase à sérine d'environ 30 kD, en plus d'une protéase de 47 et 70 kD avec des séras cANCAs dans les cellules HL60.....	56
3.3 Immunoprécipitation d'un triplet de protéases à sérine de 27, 29, et 30 kD, en plus d'une protéase de 47 kD chez les neutrophiles et les cellules mononucléées du sang périphérique .....	59
3.4 Les IgGs cANCAs ciblent avec une très bonne affinité apparente, une protéase à sérine majeure des neutrophiles .....	62
3.5 Régulation cellulaire de la forme p47 de la myéloblastine.....	65
3.6 Analyse des protéines de surface.....	68
3.7 Immunoprécipitation de protéines phosphorylées dans les cellules HL60 avec un sérum cANCA.....	69
3.8 Traitement de la myéloblastine à la phosphatase alcaline .....	73
3.9 Immunoprécipitation de la myéloblastine avec 29 séras d'une patiente, accumulés sur une période de deux ans.....	75
3.10 Immunoprécipitation de petits polypeptides liant le DFP à l'aide d'un sérum cANCA.....	75
3.11 Caractérisation d'une phosphoprotéine de <u>Staphylococcus aureus</u> immunoprécipitée par un sérum cANCA.....	79
<b>4.0 Discussion .....</b>	<b>81</b>
<b>5.0 Remerciements.....</b>	<b>94</b>

6.0 Liste des résumés de congrès.....	95
7.0 Liste des publications.....	95
8.0 Références .....	96

## Liste des illustrations

### Figures:

1. Homologie des séquences N-terminales des différentes protéases à sérine du neutrophile .....	29
2. Immunofluorescence indirecte sur neutrophiles et cellules HL60 des différents types d'ANCAs .....	52
3. Immunoprécipitations d'extraits de cellules HL60 radiomarquées <i>in vivo</i> à l'aide de la <sup>35</sup> S-méthionine et de la <sup>35</sup> S-cystéine.....	53
4. Immunoprécipitations d'extraits de cellules HL60 radio-marquées à l'aide du <sup>3</sup> H-DFP.....	56
5A. Immunoprécipitation d'une protéase à sérine de 29 kD et d'une composante mineure de 47 kD dans les neutrophiles et les cellules mononucléées .....	59
5B. Immunoprécipitation des protéases à sérine de 29 et 47 kD avec les sera de 36 patients atteints de la granulomatose de Wegener ainsi qu'avec un anticorps monoclonal anti-myéloblastine (12.8).....	60
6. Rapidité de l'immunoprécipitation avec un sérum cANCA humain .....	62
7. Immunodéplétion de l'antigène des cANCAs à partir d'un extrait de neutrophiles .....	63
8. Régulation cellulaire de la formation de la myéloblastine de 47 kD dans les neutrophiles .....	65
9. Inhibition de l'induction de p47 par le PMA, à l'aide d'une phospholipase D exogène.....	66
10. Démonstration de l'expression de surface de la myéloblastine sur les cellules HL60 et les neutrophiles .....	70
11. Immunoprécipitation à l'aide d'un sérum cANCA d'extraits de cellules HL60 radio-marquées avec du <sup>32</sup> P-orthophosphate .....	73
12. Élimination de la protéine p47 kD par un traitement à la phosphatase alcaline.....	75
13. Variation du titre des anticorps anti-myéloblastine d'une patiente (S.O.) atteinte de la granulomatose de Wegener, au cours d'une période de deux ans.....	76
14. Immunoprécipitation par un sérum cANCA (S.O.) de petits polypeptides de la myéloblastine .....	77

15. Caractérisation d'une phosphoprotéine de 15 kD de <u>Staphylococcus aureus</u> , induite par le mannitol et immunoprécipitée par un sérum cANCA de S.O. ....	79
16. Carte du polypeptide de la myéloblastine et de l'épitope ciblé par l'IgG cANCA de S.O.....	89

**Tableau:**

1. Régulation de l'expression de surface de la myéloblastine.....	71
---	----



## Liste des abbréviations

Å:	Angstrom
ADN:	Acide déoxyribonucléique
ADNc:	Acide déoxyribonucléique complémentaire
AME-1:	anticorps monoclonal anti-glycophorine A
ANA:	Anticorps anti-constituants du noyau (anti-nuclear antibodies)
ANCA:	Anticorps anti-cytoplasme du neutrophile
aANCA:	ANCA atypique
cANCA:	ANCA cytoplasmique
pANCA:	ANCA périnucléaire
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
BSA:	Albumine sérique bovine
CDR:	Complementary determining region
CHUS:	Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke
DFP:	Diisopropylfluorophosphate (DFP)
<sup>3</sup> H-DFP:	Diisopropylfluorophosphate tritié
DMSO:	Dimethylsulfoxyde
EDTA:	Ethylene diamine tetraacetate
ELISA:	Test immunoenzymatique (Enzyme linked immunosorbent assay)
FBS:	Sérum de veau foetal
FITC:	Fluoresceine isothiocyanate conjugated
GPI:	Glycosyl-phosphatidylinositol
HLA:	Antigène leucocytaire humain (correspond au MHC humain)
IIF:	Immunofluorescence indirecte
Ig:	Immunoglobuline
IgA:	Immunoglobuline d'isotype A
IgE:	Immunoglobuline d'isotype E
IgG:	Immunoglobuline d'isotype G
IgM:	Immunoglobuline d'isotype M
IP:	Immunoprécipitation
kD:	KiloDalton
kb:	Kilo paires de bases
M:	Molaire
mAb 12.8:	Anticorps monoclonal de souris anti-myéloblastine
Mbn:	Myéloblastine
ml:	Millilitre
mM:	Millimolaire
MPO:	Myeloperoxydase
1,25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25 dihydroxyvitamine D <sub>3</sub>
Nva	Norvaline
oNp	p-nitrophenylester
PAGE:	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
SDS-PAGE:	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
p47:	Forme de la myéloblastine avec un poid apparent de 47 kD
pb:	Paire de bases
PBS:	Solution saline tamponnée avec du phosphate
PLD:	Phospholipase D
PMA:	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF:	Phenylmethylsulfonyl fluoride

pNa	p-nitroanilide
PR3:	Proteinase 3
RPM:	Révolution par minutes
RPMI:	Milieu de culture RPMI
SBzl	Thiobenzyl ester
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
<u>S.aureus</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>
Suc	Succinyl
TCR:	Récepteur de lymphocyte T
TNF $\alpha$ :	Tumor necrosis factor $\alpha$
Tris:	Hydroxymethyl-aminomethane
uCi:	Microcurie
ug:	Microgramme
ul:	Microlitre
uM:	Micromolaire
UMR:	Unité des maladies rhumatismales
WG:	Granulomatose de Wegener



## Résumé

Les cANCA sont des autoanticorps qui ciblent une protéase à sérine des neutrophiles et des monocytes. Les analyses de séquences N-terminales de l'autoantigène publiées à ce jour, identifient une nouvelle protéase à sérine nommée la myéloblastine. Un premier objectif de mon travail de maîtrise est de confirmer la présence d'autoanticorps ciblant la myéloblastine dans le sérum de patients atteints de la granulomatose de Wegener. Un deuxième objectif est de proposer un modèle d'interaction entre les cANCA et leur autoantigène; nous voulons vérifier si l'antigène est exprimé à la surface des neutrophiles et des monocytes. Un troisième objectif est de définir un domaine de l'antigène ciblé par les cANCA, afin d'évaluer l'antigénicité des différentes parties de la protéine.

Nous avons débuté par la détection de l'antigène dans une lignée cellulaire comme les cellules HL60 ainsi que dans les neutrophiles et les cellules mononucléées du sang périphérique. Nous sommes parvenu à détecter l'antigène par la technique d'immunoprécipitation à l'aide d'anticorps provenant de sera cANCA de patients et de protéines cellulaires liées à un ligand de protéase radiomarqué. Cette méthode très sensible nous a été très utile pour détecter de nombreux sera à hauts titres avec des anticorps dirigés contre une protéase à sérine 29 kD et sur une forme mineure de 47 kD nouvellement observée.

La protéine immunoprécipitée a un poids moléculaire de 29 kD comme initialement décrit, mais nous avons observé une nouvelle forme de 47 kD. Cette nouvelle forme ne peut être uniquement due à une modification post-traductionnelle, tel que démontré par les travaux publiés sur le clonage du gène de la myéloblastine. L'immunoprécipitation de protéines de cellules HL60 radiomarquées au  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate a permis de démontrer que la forme de 47 kD contient du phosphate, ainsi que celle de 29 kD. La séquence primaire de la myéloblastine ne contient pas de motifs connus de phosphorylation dans les cellules eucaryotes, nous suggérant que le phosphate est ajouté en bloc avec une autre composante. Cette protéase n'a pas de motif de liaison pour des acides nucléiques, et est

emprisonnée dans les granules, suggérant que le phosphate est ajouté à la protéine, dès sa synthèse dans le réticulum endoplasmique.

Nous avons aussi démontré par la technique de cytofluorométrie que l'antigène est exprimé à la surface membranaire des neutrophiles et des cellules HL60, en plus d'être présente sous forme libre dans les granules. Des inducteurs de dégranulation comme le  $TNF\alpha$  et le PMA augmentent l'expression de surface de la myéloblastine dans les cellules HL60. Ces deux agents activent la dégranulation de ces cellules, impliquant que l'augmentation de l'expression membranaire de la myéloblastine est due à la fusion des membranes de granules avec la membrane plasmique. Ceci suggère qu'une partie de la myéloblastine est ancrée dans une membrane dès sa synthèse dans le réticulum endoplasmique.

La séquence de l'ADNc de la myéloblastine n'a pas de séquences transmembranaires prédites pouvant permettre son ancrage dans la membrane. Donc, nous croyons que cette protéine doit subir une modification qui lui permet d'être liée à la membrane cytoplasmique. Les résultats présentés dans ce mémoire ne permettent pas d'affirmer quelle est cette modification. Cependant, nous suggérons que cette modification permet la liaison à la membrane plasmique. Parmi les hypothèses à envisager, il y a la modification du message par épissage alternatif: de nouveaux exons pourraient substituer des exons déjà connus ou être ajoutés sur le transcrit primaire. La traduction de ces exons expliquerait la différence de poids moléculaire. Il y a aussi l'hypothèse voulant que la protéine soit modifiée de façon post-traductionnelle. Ainsi, la Mbn pourrait s'associer de façon covalente à une protéine transmembranaire. Aussi, la protéine pourrait être modifiée pour permettre la liaison à la membrane. Il a été décrit que des protéines peuvent être modifiées de façon post-traductionnelle par l'ajout en bloc, au niveau de réticulum endoplasmique, d'un groupement glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). L'ajout d'un groupement GPI expliquerait la liaison à la membrane et la présence de phosphate sur la Mbn. Toutefois, il reste à démontrer que l'ajout d'un groupement GPI puisse modifier le



poinds moléculaire pour donner une forme de 47 kD. Nous avons également démontré que le PMA induit une diminution de la forme membranaire chez le neutrophile seulement. Le PMA génère également une forme de 47 kD extracellulaire (dans le surnageant des cellules) chez les neutrophiles. Ces données suggèrent qu'il existe un lien entre la forme de 47 kD et la forme membranaire de Mbn: la forme de 47 kD serait libérée de la membrane. Aussi ce phénomène peut être inhibé, car des neutrophiles traités avec une phospholipase D (PLD) exogène ne peuvent plus générer une forme p47 kD, induite normalement par le PMA. Nous n'avons pas encore déterminé si l'inhibition par la PLD est due à un effet pharmacologique sur les neutrophiles ou directement sur la myéloblastine membranaire.

Nous avons également voulu déterminer quel type d'épitope est reconnu par un sérum cANCA typique. Nous avons déterminé qu'un des sera cANCA peut immunoprécipiter des déterminants linéaires, y compris des petits polypeptides de la myéloblastine de 12 et de 7.5 kD liés au  $^3\text{H}$ -DFP. Sachant que le site de liaison du DFP est situé sur la sérine catalytique, ceci nous indique que ce sérum contient des IgGs dirigées contre la partie carboxy terminale de la protéine. De plus, ce sérum est capable d'immunoprécipiter une phosphoprotéine de 15 kD, induite par le mannitol chez la bactérie Staphylococcus aureus. Cette immunoprécipitation peut être inhibée en fonction de la quantité de protéines de granules primaires des cellules HL60 préincubées avec le sérum. Ce sérum ayant des anticorps monospécifiques contre la myéloblastine, nous concluons que les cANCAs ont une réaction croisée avec cette phosphoprotéine, que l'on croit être le produit du gène EIIA<sub>mtl</sub> de S.aureus. La séquence publiée de cette protéine contient un motif de phosphorylation sur les histidines parfaitement conservé sur la séquence primaire de la myéloblastine (près du site de liaison au DFP), supportant l'hypothèse que les anticorps anti-myéloblastine (cANCA) pourraient être produits d'abord pour se défendre contre une infection de S.aureus, et par mimétisme moléculaire contre une protéine "soi": la myéloblastine. De plus, la myéloblastine est la seule protéine eucaryote (dans la banque de séquences EMBL) à posséder ce motif de phosphorylation, ce qui pourrait représenter un

mécanisme d'autoimmunisation très spécifique. Ce mécanisme autoimmun serait un moyen possible de contourner la tolérance immunitaire et pourrait expliquer, compte tenu du rôle pathogénique possible de ces autoanticorps, l'importance déjà connue des infections bactériennes dans la granulomatose de Wegener.

## Introduction

Notre étude sur les cANCA ("anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies") porte sur la caractérisation et l'identification de l'autoantigène ciblé pour pouvoir en étudier la fonction cellulaire. Cette étude pourra éventuellement nous permettre de vérifier si ces autoanticorps peuvent moduler la fonction cellulaire de l'antigène pour provoquer un effet potentiellement pathogénique ou s'ils utilisent l'antigène comme point d'ancrage pour exercer une réaction immunitaire classique sur les cellules ciblées. Nous avons observé, comme d'autres avant nous, que la présence des cANCA est notée dans presque 100% des cas de granulomatose de Wegener (WG) non-traitées, et que le titre des cANCA varie fréquemment en fonction de l'activité de la maladie, suggérant un rôle pathogénique. Des modèles *in vitro* et *in vivo* chez le rat, démontrent que la production d'ANCA (pANCA) peut provoquer la dégranulation des neutrophiles/monocytes via la liaison de ces anticorps à leurs antigènes exprimés à la surface membranaire. Une partie du travail présenté est axé sur la démonstration de l'expression membranaire de l'antigène des cANCA, afin de proposer un modèle d'interaction entre l'antigène et l'autoanticorps. Nous tenterons aussi d'élucider le comment de cette liaison biochimique à la membrane plasmique de la cellule.

Les cANCA sont possiblement des autoanticorps pathogéniques, mais leur émergence dans la circulation reste un mystère. Par quel mécanisme la tolérance est-elle contournée? Est-ce que l'antigène des cANCA est très immunogénique? Probablement que non, parce que seulement des patients atteints de vasculites produisent des cANCA. La littérature sur la tolérance nous permet de croire que les lymphocytes  $\beta$  autoimmuns sont toujours présents et n'attendent pour être activés, qu'une stimulation de la part de lymphocytes T helper. Il a été mentionné dans une étude clinique que l'augmentation du titre des cANCA chez des patients atteints de la granulomatose de Wegener, est souvent précédée par une infection avec Staphylococcus aureus. Pourrait-il s'agir de mimétisme moléculaire? Ayant observé qu'une partie de la séquence primaire de la myéloblastine avait une identité de séquence avec le domaine de phosphorylation d'une enzyme de E.coli et de



S.aureus, nous voulons vérifier s'il y a une réaction croisée entre ces deux protéines, ce qui pourrait suggérer que les cANCA's cibleraient d'abord des protéines procaryotiques.

La caractérisation de la protéine membranaire d'une part, et la réaction croisée avec une protéine procaryotique d'autre part, sont deux aspects s'unifiant pour expliquer la présence des immunoglobulines cANCA's, leur interaction avec l'antigène exprimé à la surface des cellules et pourquoi les infections de S.aureus joueraient un rôle clé (déclenchant?, aggravant ?) dans la granulomatose de Wegener. Il a été démontré que l'interaction des pANCA's avec leurs antigènes membranaires peut provoquer une dégranulation des globules blancs, par un mécanisme peu caractérisé à ce jour. Ce modèle proposé à partir de faits expérimentaux correspond bien aux données cliniques observées dans les maladies vasculitiques qui sont étroitement associées à la présence d'ANCA's dans la circulation. Nous tenterons d'établir un modèle analogue pour l'antigène des cANCA's, dans lequel l'autoanticorps se sert de l'antigène exprimé à la surface cellulaire pour provoquer une dégranulation spécifique des neutrophiles.

Dans cette introduction, nous ferons un rappel des notions immunitaires de base servant à comprendre la production d'un anticorps et les mécanismes de tolérance du système immunitaire. Nous ferons également une revue des connaissances actuelles sur les ANCA's ainsi que des modèles *in vitro* et *in vivo* expliquant l'effet pathogénique de ces autoanticorps. Finalement, une revue des caractéristiques moléculaires connues de la myéloblastine/proteinase 3, la protéine identifiée comme autoantigène des sera cANCA's sera présentée.

## 1.1 Système immunitaire.

### 1.1.1 Définitions. (Harlow E., 1988)

#### 1.1.1.1 Antigène.

Un antigène est une molécule ou un complexe de molécule contre lesquels l'organisme peut développer une réponse immunitaire. Un antigène peut être composé de protéines, de sucres, d'acides nucléiques ou de toute autre substance synthétique ou naturelle.

#### 1.1.1.2 Épitope

Un anticorps ou un récepteur de lymphocyte liant un antigène ne lie pas tout l'antigène dans son site de liaison car certains antigènes sont de grosses molécules. L'anticorps occupe un espace d'environ 500 à 700 Å sur l'antigène (Harlow, 1989). L'anticorps ou le récepteur lie un épitope, qui est la portion de l'antigène ciblée par l'anticorps. Un épitope peut adopter plusieurs structures, soit 1) un épitope linéaire, c'est à dire que l'anticorps lie un segment continu sur la séquence primaire d'une protéine, d'un acide nucléique, d'un sucre ou de toute autre structure; ou soit 2) un épitope conformationnel, qui est formé d'éléments discontinus sur une séquence de protéine, d'acide nucléique mais réunis par le repliement de la chaîne ou de la structure. Notons qu'un épitope linéaire est habituellement composé d'un domaine court et qu'il peut quand même être ciblé par l'anticorps en conditions dénaturantes. Par contre, un épitope conformationnel ne peut pas être ciblé par son anticorps homologue en condition dénaturante.

#### 1.1.1.3 Anticorps

Les anticorps font partie de la famille des immunoglobulines (Ig). Les Igs font partie d'une superfamille de gènes comme d'autres récepteurs du système immunitaire tels les anticorps, les complexes majeurs d'histocompatibilité et les récepteurs de lymphocytes T. Les anticorps lient des antigènes à l'endroit de leur épitope. La liaison antigène-anticorps est très spécifique quant à la structure reconnue et est réversible, donc

peut être décrite en termes de réaction d'équilibre. L'affinité d'un anticorps pour un antigène peut varier de  $10^5 \text{ M}^{-1}$  jusqu'à plus de  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ . Un sérum polyclonal contient un mélange d'anticorps dirigés contre une protéine. Un sérum monoclonal contient un seul type d'anticorps d'une affinité donnée, dirigés contre une protéine donnée, donc contre un épitope spécifique.

#### 1.1.1.4 Tolérance et autoimmunité.

Le système immunitaire est très efficace (grâce aux anticorps et aux lymphocytes T cytotoxiques) à éliminer les antigènes et organismes exogènes. Il est très important de ne pas développer de réponse immunitaire contre des molécules de notre organisme. La tolérance est un processus permettant de ne pas développer de réponses immunitaires contre des molécules dites "soi". Dans l'autoimmunité, le processus est brisé ou contourné, permettant à des lymphocytes  $\beta$  de produire quand même des anticorps ciblant des molécules "soi".

#### 1.1.2 Mécanismes cellulaires de la réponse humorale. (Harlow E., 1988)

La production d'un anticorps par un lymphocyte  $\beta$  est le produit final de la réponse immunitaire humorale face à un antigène. Cette réponse humorale implique l'immunisation avec un antigène, présentation de cette antigène par des cellules présentatrices, reconnaissance de l'antigène par des lymphocytes T helper et activation d'un lymphocyte  $\beta$  possédant une immunoglobuline membranaire ciblant l'antigène en question. Il y a alors sécrétion d'interleukines (Il-4 et Il-5) par le lymphocyte T helper pour provoquer la différenciation du lymphocyte  $\beta$  en plasmocytes et en cellules B mémoires. Les plasmocytes sont spécialisées à sécréter une grande quantité d'IgG (typiquement 40% ou plus de la quantité totale de protéines de la cellule), alors que les cellules B mémoires ne produisent pas d'IgGs, mais restent en circulation et possèdent toujours une IgM membranaire ciblant l'antigène. Les cellules B mémoires sont entraînées à répondre rapidement à une deuxième immunisation par l'antigène. Le deuxième volet de la réponse immunitaire est la réponse cellulaire à l'aide des lymphocytes T cytotoxiques. Cette classes



de lymphocytes attaquent les cellules infectées par un virus et les cellules transformées de l'organisme hôte, qui expriment de nouvelles protéines susceptibles d'être reconnues "étrangères" par le système immunitaire. La réponse immunitaire de type cANCA est une activation de lymphocytes  $\beta$  autoimmuns, donc une réponse humorale face à un autoantigène.

#### 1.1.2.1 Présentation de l'antigène.

L'étape de la présentation de l'antigène nécessite d'abord la phagocytose de cet antigène par une cellule présentatrice. Les cellules présentatrices sont les macrophages, les cellules de Langerhans de la peau, les cellules dendritiques dans la rate ainsi que les nodules lymphoïdes, et les monocytes dans le sang. Après la phagocytose, les vésicules de phagocytoses sont fusionnées aux lysosomes pour que l'antigène soit partiellement dégradé.

La présentation des antigènes phagocytés par les cellules est faite grâce aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (HLA de classe II). Les HLAs de classe II sont des hétérodimères contenant des polypeptides de 25 et 33 kD. Ces HLAs de classe II sont exprimés à la surface cellulaire et ont un domaine externe dans lequel le peptide immunogène est inclus pour être présenté. Il y a fusion des vésicules contenant l'antigène dégradé en peptides (les peptides immunogènes) avec les granules d'excrétion contenant un HLA de classe II, le peptide antigénique s'installe dans la poche du HLA, et le complexe est transloqué à la surface membranaire pour présenter le peptide au récepteur des lymphocytes T helper. Un processus semblable prend place dans la réponse immunitaire cellulaire pour présenter les antigènes non-phagocytés: les antigènes produits par toutes les cellules somatiques de l'organisme. Les peptides immunogéniques sont alors présentés par les HLAs de classe I, qui présentent tous les antigènes produits dans le réticulum endoplasmique, d'où est synthétisé le HLA de classe I. Les gènes codant pour les HLAs de classe I et II sont très polymorphiques et il existe plusieurs familles de

HLAs chez une espèce. Ainsi, certains antigènes peuvent être présentés par une famille de HLA chez un individu alors qu'il ne le seront pas chez un autre individu.

#### 1.1.3.2 Fonctions des lymphocytes T et $\beta$ (Paul W.E., 1989).

Après la présentation de l'antigène, il y a reconnaissance du peptide immunogénique présenté, par les récepteurs à lymphocytes T helper ou T cytotoxique (TCR). Les lymphocytes T cytotoxiques sont spécialisés dans la destruction de cellules modifiées par un virus ou transformées, et leurs récepteurs ciblent le complexe peptide-HLA de classe I. Les lymphocytes T helper sont spécialisés pour aider la différenciation des lymphocytes  $\beta$ , et ciblent avec leur récepteurs le complexe peptide-HLA de classe II par leur molécule de surface CD4. Le récepteur des lymphocytes T est un hétérodimère composé d'une chaîne polypeptidique  $\alpha$  et  $\beta$ . Ce récepteur contient beaucoup de similarité avec les immunoglobulines: il contient une région variable et constante (la région variable liant l'antigène), ainsi que des ponts disulfures inter- et intramoléculaires maintenant la structure tertiaire. Il y a plus de  $10^7$  récepteurs différents avec un site de liaison de l'antigène unique à chacun, et cette diversité est générée par un mécanisme similaire à celui utilisé pour les immunoglobulines. Ainsi, aux loci des chaînes polypeptidiques formant le TCR, il y a réarrangement au niveau de l'ADN génomique des régions V, D, et J pour former la région variable d'une chaîne polypeptidique mature et fonctionnelle du TCR. Il est important de noter que chaque lymphocyte T produit un seul TCR, donc ne peut répondre qu'à un antigène présenté par un MHC donné. Il existe une très grande diversité de TCRs générée par: 1) les différentes combinaisons de réarrangements V-D-J, 2) les différentes jonctions générées lors des réarrangements V-D-J, dues à des recombinaisons imparfaites, 3) les combinaisons générées par l'association des différentes chaînes  $\alpha$  et des chaînes  $\beta$ . A cause de cette très grande diversité de récepteurs présents à la surface des lymphocytes T, il est nécessaire qu'il y ait un processus éliminant les lymphocytes T possédant un TCR autoimmun. Un processus nommé la délétion clonale prend place dans le thymus durant l'ontogénie des lymphocytes T et élimine ces lymphocytes fonctionnels



La délétion clonale se fait de façon coïncidente avec l'expression nouvelle du TCR sur les lymphocytes immatures; les lymphocytes T fonctionnels possédant un TCR autoimmun sont alors éliminés. De plus, il a été décrit que les TCRs ne peuvent maturer par mutation somatique, ce qui procure une protection supplémentaire contre la génération de lymphocytes T autoimmuns. En effet, le TCR ne doit plus maturer après le processus de délétion clonale, car on pourrait produire à nouveau des lymphocytes T autoimmuns. Un processus de suppression des lymphocytes T autoréactifs via des lymphocytes T suppresseurs (Paul W., 1989) peut aider à rendre silencieux ces lymphocytes, mais la contribution de ces mécanismes *in vivo* reste à déterminer.

La liaison du lymphocyte T à une cellule présentatrice démarre une cascade d'événements conduisant à la prolifération et à la différenciation des cellules T. L'activation des lymphocytes T nécessite la reconnaissance de l'antigène dans la poche du HLA et la liaison de la molécule accessoire (CD4 ou CD8) du TCR au HLA lui-même. Cette reconnaissance active la production d'interleukine 1 (II-1) par la cellule présentatrice. Ceci active la sécrétion de l'interleukine 2 (II-2) par le lymphocyte T, avec activation de la synthèse du récepteur de l'II-2 et, finalement activation de la prolifération du lymphocyte T sous le contrôle de cette stimulation autocrine.

Les lymphocytes  $\beta$  sont aussi capables de présenter des peptides immunogéniques aux lymphocytes T. Le peptide immunogénique est présenté par les HLAs de classe II, cependant l'entrée de l'antigène dans la cellule se fait de façon spécifique à l'antigène. Une molécule d'IgM membranaire est présente pour capter un antigène et, le complexe est internalisé pour dégrader l'antigène et le présenter aux cellules T ( $CD4^+$ ) par le HLA classe II.

L'activation des lymphocytes  $\beta$  par les lymphocytes T helper, donne un très haut niveau d'activation des lymphocytes  $\beta$ . Ce haut niveau d'activation nécessite trois conditions importantes, soit 1) l'antigène doit se lier à la surface du lymphocyte  $\beta$  via l'IgM membranaire, 2) l'antigène absorbé et dégradé doit se lier au HLA de classe II et 3) le TCR

du lymphocyte T helper doit lier le complexe HLA-peptide antigénique de façon spécifique. Il est important de noter que l'épitope du TCR et celui de l'IgM membranaire ne doivent pas être nécessairement les mêmes. Ainsi, l'épitope du TCR peut être n'importe où sur l'antigène (Harlow E., 1988), par contre l'épitope de l'IgM ne peut être situé que sur une partie exposée de la protéine native (Benjamin D.C. et al., 1984). La formation de ce complexe cellulaire permet l'activation maximale des lymphocytes  $\beta$  via l'Il-4 et l'Il-5. Les lymphocytes  $\beta$  peuvent également être activés indépendamment des lymphocytes T helper, par la réticulation des immunoglobulines membranaires à l'aide d'anti-IgGs ou des antigènes multivalents. Toutefois, cette réponse immunitaire est seulement de type primaire (IgM), sans différenciation des lymphocytes  $\beta$ . Contrairement au TCR des lymphocytes T, les immunoglobulines produites par un lymphocyte  $\beta$  continuent à maturer par un processus nommé mutation somatique. La mutation somatique est l'apparition de mutations ponctuelles dans les gènes d'immunoglobulines, à une fréquence beaucoup plus élevée que la normale. Ces mutations résultent en changements d'acides aminés et en maturation de l'affinité de l'anticorps pour un antigène. Par ce mécanisme, il est possible de produire des anticorps avec une affinité accrue pour leurs antigènes.

Il existe également des mécanismes de tolérance visant les lymphocytes  $\beta$  autoréactifs. Un processus de délétion clonale est effectué tôt durant le développement sur les lymphocytes  $\beta$  autoréactifs ayant lié un autoantigène. La délétion clonale est caractérisée par l'absence de cellules ayant dépassé le stade des cellules  $\beta$  immatures. Ceci a été démontré par l'absence de lymphocytes  $\beta$  matures codant pour un anticorps anti-lysozyme membranaire chez des souris transgéniques co-exprimant des Igs anti-lysozyme et le lysozyme membranaire (Goodnow C.C., 1992). Il existe aussi un processus d'anergie des lymphocytes  $\beta$  autoréactifs. Ce processus survient plus tard dans le développement des lymphocytes  $\beta$ , et bloque l'activation et la différenciation terminale en plasmocytes. Ces lymphocytes anergiques expriment beaucoup moins l'IgM membranaire, démontré par les souris double-transgéniques co-exprimant des Igs anti-lysozymes et un lysozyme



membranaire (Goodnow C.C., 1992). Par contre, il existe un phénomène qu'on nomme ignorance clonale. Il s'agit de l'expression d'un autoantigène qui n'a aucun effet sur la tolérance des lymphocytes  $\beta$ . On croit qu'il s'agit d'un effet de dosage ou d'affinité de l'autoantigène.

Il faut noter que lors de la réponse humorale, les mécanismes de tolérance visent beaucoup plus l'élimination des lymphocytes T autoréactifs que des lymphocytes  $\beta$  autoréactifs. En effet, les lymphocytes T subissent de la délétion clonale au début de leur développement et leurs TCRs ne subissent pas de mutations somatiques. Donc, le répertoire de lymphocytes T est établi tôt dans le développement et reste fixe. Les lymphocytes b peuvent également subir de la délétion clonale ou de l'anergie, mais on sait que l'anergie peut être renversée par une forte stimulation de la part des lymphocytes T helper (Goodnow C.C., 1992). Aussi, il a été décrit qu'il existe des lymphocytes  $\beta$  autoréactifs dans la circulation, présentant des IgMs membranaires (Paul W., 1989; Ohosone Y. et al., 1986; Cairns E. et al., 1986; Bell D.A. et al., 1987).

Ainsi, la revue des mécanismes de production d'un anticorps nous montre qu'il est toujours possible de produire un anticorps autoréactif, car les lymphocytes  $\beta$  autoimmuns sont toujours présents. Donc, l'activation de ces lymphocytes  $\beta$  pourrait générer une situation autoimmune. Pour obtenir une bonne réponse humorale autoimmune, il est théoriquement possible d'activer des lymphocytes T helper qui ne sont pas autoimmuns et de ce fait contourner la tolérance. Par exemple, on pourrait envisager un mécanisme d'autoimmunisation impliquant la présentation d'une protéine chimérique présentant un épitope (natif et accessible à un anticorps) d'IgG ou d'IgM "soi" et un épitope (oligopeptide présenté par un HLA) de TCR "non-soi" (Paul W.E., 1989). Par ce mécanisme hypothétique, un lymphocyte T helper non-autoimmun serait utilisé pour activer un lymphocyte  $\beta$  à produire des anticorps contre une telle protéine chimérique exogène, mais les anticorps produits s'attaqueraient du même coup à une protéine "soi" possédant un épitope d'IgG semblable (mimétisme moléculaire).

## 1.2 Les ANCAs

### 1.2.1 Définitions

#### 1.2.1.1 ANCA

Les anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (de l'anglais "anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies") sont, comme leur nom l'indique, des autoanticorps ciblant des protéines du cytoplasme des neutrophiles. Ce nom a été choisi pour faire contraste avec les "ANAs" (anti-nuclear autoantibodies), qui avaient déjà été décrits quelques années plus tôt. Le terme ANCA est resté, même si on a découvert après que les ANCAs ciblaient aussi des antigènes dans le cytoplasme des monocytes.

#### 1.2.1.2 cANCA, pANCA et aANCA

En immunofluorescence indirecte, les ANCAs donnent plusieurs types de fluorescence dans le cytoplasme des neutrophiles et des monocytes. Le premier type est la fluorescence cytoplasmique fine et granuleuse avec un renforcement interlobaire, appelée cANCA. Le deuxième type de fluorescence est périnucléaire, appelée pANCA. L'aspect périnucléaire des pANCAs est due à la migration vers le noyau d'antigènes contenus dans les granules. Elle ne se retrouve que lors de la fixation avec de l'éthanol, mais elle reste cytoplasmique lorsque l'on utilise un mélange formaline/acétone pour fixer les cellules. Le troisième type de fluorescence est aussi cytoplasmique granulaire mais concentrée dans de gros points plus épars. Elle fut décrite initialement par notre groupe ainsi que d'autres équipes et fut nommée atypique ou aANCA (voir la figure 2, page 52).

### 1.2.2 Historique

#### 1.2.2.1 Découverte par immunofluorescence indirecte

Les ANCAs ont été observés pour la première fois en 1982 (Davies D.J. et al., 1982) chez 8 patients présentant une glomérulonéphrite extra-capillaire nécrosante sans dépôts immunitaires avec des signes cliniques de vascularite systémique. En 1984, on découvrit des ANCAs chez 4 patients atteints d'une vascularite systémique, dont 3 avaient une glomérulonéphrite nécrosante (Hall J.B. et al., 1984). C'est en 1985,



lors d'une collaboration danoise/hollandaise que l'on établissait une forte corrélation entre la présence des ANCA et le diagnostic de la granulomatose de Wegener (van der Woude F.J. et al., 1985). Cette étude démontrait une forte corrélation entre l'activité de la maladie et le titre des ANCA. Ce n'est que plus tard, lors des deuxième et troisième congrès internationaux, que l'on démontrait l'existence de deux types de fluorescence: Le cANCA et le pANCA (Falk R.J. et Jennette J.C., 1988;). Plusieurs études cliniques ont établi une spécificité diagnostique du cANCA pour la granulomatose de Wegener alors que celle du pANCA s'étend à plusieurs maladies vasculitiques (Nassberger L., 1989a, Nassberger et al. 1989b et 1990) . Ce n'est que lors du quatrième congrès international sur les ANCA que l'on fit la description des aANCA chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde et de lupus érythémateux (Dalpé G. et al., 1992; Fernandes M.F. et al., 1993). A ce stade, la spécificité diagnostique des aANCA reste à être établie.

#### 1.2.2.2 Autoantigènes ciblés

##### 1.2.2.2.1 pANCA

80 à 90% des pANCA sont dirigés contre la myéloperoxydase (MPO). Les ANCA humains anti-MPO ont été détectés dans des tests d'ELISA spécifique (MPO) et les anticorps monoclonaux anti-MPO ont été utilisés pour inhiber l'immunofluorescence de pANCA (Falk R.J. et Jennette J.C., 1988; Andrassy K. et al., 1990; Cohen Tervaert J.W. et al., 1990b; Daha M.R. et al., 1990;). La MPO est contenue dans les granules azurophiles du neutrophile et est responsable de la formation de radicaux libres de l'oxygène. La MPO est une enzyme cationique; ce qui pourrait expliquer la migration périnucléaire lors de la fixation à l'éthanol dans le test de détection par immunofluorescence. Il y a aussi un faible pourcentage de pANCA qui réagissent contre d'autres constituants des granules : l'élastase des granules primaires (Gallicchio M.C. et Savige J.A., 1991; Savige J.A. et al., 1990; Nassberger L. et al., 1989c), et la lactoferrine (Lesavre P. et al., 1990).

#### 1.2.2.2.aANCA

Les aANCAs ont été décrits initialement par notre équipe et constituent un type de fluorescence rarement observé. L'antigène ciblé n'est cependant pas identifié au niveau moléculaire. Nous savons que c'est un antigène présent dans la lignée cellulaire HL60 et U937 ainsi que chez le neutrophile humain. Les sera aANCAs ne sont pas dirigés contre une protéase à serine ou la MPO. Ces autoanticorps peuvent cependant immunoprécipiter des protéines de 40 kD et de 42 kD dans les lignées HL60 et U937 respectivement (Dalpé G. et al., 1992). On retrouve aussi les aANCAs présents dans des sera contenant des cANCAs et des pANCAs.

#### 1.2.2.2.3cANCA

Il a été démontré que l'autoantigène des cANCAs était une protéase à serine de 29 kD, à cause de la liaison de l'antigène avec le diisopropylfluorophosphate, un inhibiteur synthétique et covalent des protéases à serine (Goldschmeding R. et al., 1989b). La séquence N-terminale (figure 1) et l'activité enzymatique de la protéine purifiée (Ludemann J., 1990) étaient très similaires à celles publiées par Kao sur la "Proteinase 3" (PR3), une protéase à serine capable d'induire, après injection chez le hamster, un emphysème (Kao R.C. et al., 1988). La protéine purifiée par la méthode de Kao était aussi réactive en ELISA avec la plupart des sera cANCAs (Jennette J.C. et al., 1990). Lors du troisième congrès international sur les ANCAs, on a trouvé une grande homologie (Jenne D.E. et al., 1990) entre la séquence N-terminale de la PR3, de la protéine p29b et celle déduite de l'ADNc de la myéloblastine (Mbn). La Mbn est une protéase à serine de 29 kD dont l'ADNc a été cloné à partir de cellules HL60 (Borries D. et al., 1989). Une autre équipe étudiant les protéases du neutrophile, a cloné un ADNc codant pour une protéase à serine de 29 kD, à partir d'une librairie d'expression d'ADNc de neutrophiles et d'un anticorps monoclonal anti-p29b. Ils ont trouvé une séquence très homologue à la séquence N-terminale de la PR3, de l'ADNc de la Mbn et de la séquence N-terminale de l'autoantigène purifié (Campanelli D. et al.,

1990b). Il y avait discordance entre les séquences nucléotidiques publiées sur la PR3 et la Mbn, mais il a été démontré par protection à la nucléase S1 que les deux ADNcs étaient codés par le même ARNm cellulaire (Labbaye C. et al., 1992). Donc, l'antigène des cANCA's semble être la PR3 caractérisée par Kao, mais à ce stade, il n'a pas été démontré que les ADNcs clonés par Campanelli et Borries peuvent directement exprimer l'autoantigène.



Protéines	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Antigène de 29kD	I	V	G	G	H	E	A	Q	P	H	S	R	R	Y	M	A	S	L	Q	M	R
Myéloblastine p29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-
cANCA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
p29b/AGP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-
Azurocidine	-	-	-	-	R	K	-	R	-	R	Q	F	-	F	L	-	-	I	-	N	-
Elastase	-	-	-	-	R	R	-	R	-	-	A	w	-	F	-	V	-	-	-	L	-
Cathepsin G	-	I	-	-	R	-	S	R	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	I	Q

Séquences NH<sub>2</sub>-terminale publiées de l'antigène des cANCA (antigène de 29 kD, Goldschmeding, 1992; p29, Niles et al., 1989; cANCA, Jenne et al., 1990) et d'autres protéases à sérine (myéloblastine déduite de l'ADNc, Labbaye et al., 1991; p29b, Gabay et al., 1989; AGP7, Wilde et al., 1990; azurocidine, Gabay et al., 1989; elastase, Sinha et al., 1987; cathepsin G, Salvesen et al., 1987).

- \* Le tiret signifie qu'il y a identité avec la première ligne.
- \* X signifie un acide aminé non-identifié à cette position.

**Figure 1. Homologie des séquences N-terminales des différentes protéases à sérine du neutrophile.**

### 1.2.2.3 Sources cellulaires

Comme il est mentionné précédemment, les sources cellulaires des ANCA sont principalement les neutrophiles humains et les monocytes (Goldschmeding R., 1992). Il a aussi été démontré, à l'aide d'anticorps monoclonaux et de l'immunofluorescence indirecte, que les antigènes des ANCA (PR3 et MPO) étaient présents chez des lignées cellulaires myéloïdes (Goldschmeding R., 1992). La PR3, la MPO et l'élastase ont été détectées dans la lignée promyélocytaire HL60, la lignée promonocytaire THP1, la lignée hystiocytaire U937, et dans la lignée myéloblastique ML1. La présence de la PR3 n'a pas été observée dans la lignée myéloblastique immature KG1a et la lignée érythroblastique K562. L'expression de la PR3 ainsi que celle de la MPO et celle de l'élastase, semblent être restreintes à des stades de différenciation promyélocytaire et promonocytaire chez les lignées myéloïdes humaines.

Des inducteurs de différenciation monocytaire, le TPA et la vitamine D, ont fait chuter les niveaux de PR3 dans les quatre lignées cellulaires où l'antigène était présent. Des inducteurs de différenciation granulocytaire, le DMSO et la vitamine A, ont diminué les quantités de PR3 dans les lignées HL60, THP1 et U937. Par contre, le traitement des cellules HL60 avec de la cytosine-arabinozide a fait augmenter l'expression de la MPO, alors que l'expression de PR3 et de l'élastase a diminué (Goldschmeding R., 1992). Donc, il apparaît que la régulation de l'expression de la MPO est découplée de celle de la PR3 et de l'élastase. Si l'expression de la PR3 et celle de l'élastase sont liées par un même mécanisme de régulation, cette relation reste à établir.

#### 1.2.2.4 Les immunoglobulines ANCA:

Les ANCA sont des immunoglobulines de type IgG, donc représentant une réponse mature du système immunitaire pour la production d'un anticorps. Les immunoglobulines de types IgG1 et IgG4 sont prédominantes, alors que les IgG3 sont plutôt associées à des signes d'évolutivité dans la maladie ou à une atteinte rénale (Daha M.R. et al., 1990; Brouwer E. et al., 1991a; Jayne R.R.W. et al., 1991). Exceptionnellement, des IgA ont été détectées chez des patients atteints de néphropathies à dépôts mésangiaux d'IgA (Van Den Wall Bake A.W.L. et al., 1989). Tel que déjà mentionné, le titre des cANCA peut varier en fonction de l'activité de la maladie (la granulomatose de Wegener), et ils sont devenus un critère de présomption pour cette maladie (Cohen Tervaert J.W. et al., 1989; van der Woude F.J. et al., 1985). Cette très bonne corrélation entre le titre des cANCA et l'évolution de la maladie suggère un rôle pathogénique des cANCA dans les vascularites. Une corrélation entre le titre des ANCA (cytoplasmique ou périnucléaire) et d'autres maladies reste à établir.

### 1.3 Rôle pathogénique des autoanticorps.

Les autoanticorps pourraient théoriquement avoir un rôle pathogénique lorsqu'ils sont en interaction avec leurs antigènes, en inhibant l'activité de l'antigène. Même si un



autoanticorps a une affinité pour un autoantigène donné, il n'est pas assuré que les deux protéines peuvent se lier *in vivo*, notamment à cause de la localisation intracellulaire de nombreux autoantigènes. Il est biochimiquement improbable que l'autoanticorps puisse pénétrer une cellule vivante pour lier l'antigène, quoique ce mécanisme a été suggéré pour des anticorps anti-RNP (Alarcon-Segocia D. et al., 1979). On peut alors envisager que l'antigène doit être exprimé à la surface membranaire (récepteur, affinité avec protéine de surface, ...); que l'antigène doit être excrété de la cellule par des stimulations spécifiques ou qu'il doit être libéré lors de la mort cellulaire. La libération de l'antigène dans la circulation pourrait favoriser la formation de complexes immuns dans le sérum (activant la cascade du complément) ou directement dans les tissus. Ce mécanisme a été suggéré dans les systèmes anti-ADN de la néphrite lupique (Koffler D. et al., 1974).

#### 1.4 Rôle pathogénique des ANCA.

##### 1.4.1 Un modèle *in vitro*.

Il a été initialement observé que les cANCA pouvaient s'associer à leurs antigènes du neutrophile, par phagocytose *in vitro* des IgGs cANCA (van der Woude F.J. et al., 1985). Le neutrophile peut absorber des IgGs et des complexes immuns comme dans le lupus érythémateux, suggérant que ce mécanisme seul, ne pourrait expliquer la pathogénèse d'une vascularite qui est très différente de celle du lupus. Il a été récemment décrit que les ANCA pouvaient activer la dégranulation des neutrophiles de façon spécifique (Falk R.J. et Jennette J.C., 1990). Ils ont observé, avec une analyse par cytofluorométrie, que l'expression de surface de la MPO (l'antigène des pANCA) augmentait quand les neutrophiles étaient stimulés par une dose minimale de cytokine comme le TNF $\alpha$ . Ces neutrophiles préstimulés par le TNF $\alpha$  peuvent alors activer un processus de dégranulation dont l'élément déclencheur est la liaison des ANCA à leurs antigènes. Cette dégranulation est spécifique aux IgGs ANCA (périnucléaires ou cytoplasmiques) ou à leur partie F(ab)'<sub>2</sub>. Cette dégranulation libère des enzymes comme la

MPO, capable de catalyser la formation de radicaux libres de l'oxygène. Ce mécanisme *in vitro*, pourrait hypothétiquement expliquer *in vivo*, les dommages observés sur les vaisseaux sanguins de patients ayant une vascularite avec des ANCA dans leur circulation. Le mécanisme proposé est, de plus, beaucoup plus valable que celui impliquant des complexes immuns se déposant dans les tissus cibles, car peu de dépôts immuns sont observés dans les tissus enflammés des patients atteints de vascularites. Il y a activation des neutrophiles par les ANCA, même si les cellules ne sont pas préincubées avec une cytokine, mais l'activation est alors plus faible. Cette étude montre donc qu' *in vitro*, les ANCA sont capables d'une interaction avec leurs antigènes exprimés à la surface membranaire. Le mécanisme d'activation reste cependant confus, car la partie F(ab)<sub>2</sub> est aussi capable d'activer les cellules, excluant un mécanisme impliquant une interaction entre la partie Fc de l'Ig et le récepteur Fc du neutrophile. La liaison biochimique liant les antigènes des ANCA à la surface membranaire est, elle aussi, inconnue. Dans ce modèle, on doit considérer que seul la MPO pourrait être l'enzyme dommageable car, les IgG cANCA et l'α<sub>1</sub>AT inactivent efficacement l'activité enzymatique *in vitro* de la myéloblastine (voir le paragraphe 1.6.3).

#### 1.4.2 Un modèle animal.

Beaucoup de systèmes autoimmuns sont associés de façon spécifique avec une maladie correspondante. Toutefois, pour qu'une corrélation de cause à effet soit établie, il faut appliquer les critères suivant: 1) une reproduction de la lésion par injection de l'autoanticorps chez un animal normal, 2) une induction de la lésion par immunisation d'un animal normal avec l'autoantigène purifié, 3) une simulation *in vitro* de la lésion, ou 4) l'isolation de l'autoanticorps de la lésion et une corrélation entre le titre de l'anticorps et l'activité de la maladie.

Le fait que le titre des cANCA correspond à l'activité de la maladie suggère qu'ils sont peut-être pathogéniques. Il existe un modèle *in vitro* où les ANCA sont capables de provoquer la dégranulation des neutrophiles et il manque l'application de ce modèle chez un



animal. Pour vérifier l'hypothèse de la dégranulation *in vivo*, une équipe a immunisé des rats (Brown-Norway) avec de la MPO humaine purifiée et ils ont obtenu une production d'anticorps anti-MPO de rats (Brouwer E. et al., 1993). Les IgGs anti-MPO étaient localisées sur la membrane basale du glomérule et les rats manifestaient des signes d'inflammation du glomérule après perfusion de peroxyde d'hydrogène. Ces rats avaient aussi des glomérulonéphrites avec rupture de la capsule de Bowman, une inflammation périglomérulaire granulomateuse et la formation de cellules géantes. Finalement, les symptômes manifestés par les rats sont semblables à ceux rencontrés chez les humains atteints d'une glomérulonéphrite associée à des anti-MPO (pANCA).

Ce modèle animal est le premier à décrire *in vivo* ce que pourrait être la pathogénèse par des pANCAs, d'une maladie vasculitique. Mais il manque toujours un modèle *in vitro* et *in vivo* de la granulomatose de Wegener, dans lequel les cANCAs seraient pathogéniques. Or, c'est avec la granulomatose de Wegener que l'activité de la maladie corrèle le mieux avec le titre des cANCAs. Il faut aussi mentionner qu'aucun modèle n'a été proposé pour expliquer l'apparition des pANCAs et des cANCAs (soit des anti-MPO et anti-Mbn) dans la circulation. Ces modèles doivent aussi considérer qu'il y a sans doute plusieurs épitopes ciblés par les ANCAs sur la MPO et la Mbn. Est-ce que différents clones d'IgGs de pANCAs et de cANCAs sont également pathogéniques? Finalement, quel est le mécanisme moléculaire de dégranulation des globules blancs? Donc, il reste de nombreuses questions à répondre quant à l'apparition des ANCAs et à la pathogénèse par les ANCAs.

## 1.5 Différenciation cellulaire myéloïde.

### 1.5.1 Modèle de différenciation des promyélocytes.

La lignée cellulaire HL60 est utilisée en hématopoïèse comme modèle de différenciation promyélocytaire. La culture des HL60 avec des inducteurs tels le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou l'acide rétinoïque (RA) provoque la différenciation granulocytaire de cette lignée. Par contre, la 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> et le phorbol 12-

myristate 13-acetate (PMA) induisent la différenciation monocyttaire des cellules HL60. Un effet commun à tous ces inducteurs de différenciation est qu'ils arrêtent la division cellulaire et les cellules entrent dans une phase de différenciation terminale. Durant la différenciation des HL60, la régulation de plusieurs gènes a été caractérisée: 1) c-fms est induit quand les cellules se différencient en monocytes (Sariban E. et al., 1985), 2) c-fos est rapidement induit par le PMA mais pas par la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, ni le DMSO et le RA (Muller R. et al., 1985; Mitchell R. et al., 1985.), 3) c-myc devient silencieux sous l'action du PMA, de la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, du DMSO et du RA (Einat M. et al., 1985; Reitsma P.H. et al., 1983; Westin E.H. et al., 1982).

#### 1.5.2 Clonage de l'ADNc de la myéloblastine.

L'équipe du Dr. Cayre a isolé un dérivé clonal de la lignée HL60, la lignée 1F10, qui leur permettait d'étudier les étapes intermédiaires de la différenciation. La lignée 1F10 résiste à l'induction par le PMA ou la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> seul. Par contre, ces cellules peuvent se différencier en monocyte par l'ajout séquentiel de la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, suivie du PMA. Donc, le PMA induit un événement chez la lignée 1F10 qui permet à la cellule d'entrer dans un processus de différenciation terminale (Cayre Y. et al., 1987). Ils ont donc utilisé la technique de soustraction d'ADNc au système 1F10 pour déterminer quelle protéine est impliquée à cette étape de différenciation. Par cette méthode, ils ont isolé un ADNc codant pour une protéase à sérine, la myéloblastine (Borries D. et al., 1989). L'ARNm de cet enzyme diminue rapidement dans les cellules HL60 sous l'action du DMSO, du RA, du PMA et de la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. L'ARNm est exprimé aussi dans les U937 et disparaît sous l'action du PMA. L'ARNm n'est pas exprimé dans des lignées cellulaires myéloïdes immatures comme les cellules KG1, ni dans la lignée érythrocytaire K562. De plus, ils ont démontré, à l'aide d'incubation d'oligodéoxynucléotides anti-sens de l'ARNm de Mbn, que l'inhibition de l'expression de la Mbn provoque la différenciation spontanée des cellules HL60 en monocytes.



## 1.6 La myéloblastine: Aspects moléculaires.

### 1.6.1 Clonage du gène.

Dans le but de connaître le mode de régulation de la Mbn, le gène codant pour cette protéase a été cloné à partir d'une librairie de cosmides, d'une sonde d'ADN générée par PCR, et de la séquence publiée de l'ADNc. Un clone unique contenant un insert de 6.98 kb a été isolé de la librairie (Sturrock A.B. et al., 1993). Le gène comprend 5 exons et 4 introns. La séquence des exons du gène correspondait à la séquence de l'ADNc de la Mbn. Le gène de la Mbn a beaucoup d'homologie avec les protéases à sérine hématopoiétiques telles les granzymes B et H; les granzymes murins B, C et F; la cathepsine G; l'élastase de neutrophile humain; Les chymases 1 et 2 des mastocytes de rat; l'adipsine; et la chymase humaine. Toutes ces protéases à sérine ont un site catalytique composé de trois acides aminés discontinus sur la séquence primaire, mais rapprochés par la structure tertiaire de la protéine. Les trois acides aminés formant la triade catalytique de la Mbn, un aspartate<sup>118</sup>, une histidine<sup>71</sup> et une sérine<sup>203</sup>, sont situés sur des exons différents, les exons 3, 2 et 5 respectivement.

La séquence 5' du gène contient une boîte TATA à la position 379, mais pas de boîte CAAT (Sturrock A.B. et al., 1993). Elle ne contient pas les éléments cis suivants: AP-1, AP-2, cAMP, aucun élément de réponse au sérum de veau foetal, SP-1, séquences octamères, l'élément de réponse au glucocorticoïde, ni l'élément de réponse à l'acide rétinoïque. Donc il semble que même si l'ARNm de la Mbn est régulé par le sérum de veau foetal ainsi que par l'acide rétinoïque, ces facteurs de différenciation n'affectent pas le gène de la Mbn directement. Ils doivent plutôt affecter un autre facteur en amont de la cascade d'événements conduisant à la différenciation des promyélocytes ou simplement affecter la stabilité de l'ARNm.

La présence d'une copie unique du gène a été détectée sur le chromosome 19, par une méthode d'amplification par PCR d'un fragment de Mbn sur des cellules hybrides humain/hamster. Il est connu que la Mbn est directement impliquée dans le contrôle de la

différenciation cellulaire myéloïde (Borries D. et al., 1989). Il est ainsi concevable que la Mbn puisse avoir un rôle à jouer dans le processus de formation des leucémies myéloïdes. Le gène de la Mbn possède dans son intron 4, une région de purine-pyrimidine qui pourrait être liée à une instabilité chromosomique menant à une délétion, une translocation ou un réarrangement (Sturrock A.B. et al., 1993). Il est connu que 18% des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë ont une trisomie du chromosome 19. Nous savons aussi qu'une translocation du chromosome 19 a été observée chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (Sturrock A.B. et al., 1993). Il a été rapporté que l'ARNm de la Mbn est surexprimé dans les cellules de moelle osseuse d'un patient atteint de leucémie myéloïde aiguë (Musette P. et al., 1991). Donc, il existe certaines évidences suggérant que la surexpression de Mbn dans des cellules myéloïdes immatures pourrait activer la division cellulaire et même empêcher l'arrêt de croissance associé à la différenciation.

#### 1.6.2 Expression du gène.

Récemment, il a été démontré que l'expression de la Mbn dépendait en partie de la stabilité de son ARNm. Les auteurs (Labbaye C. et al., 1993) ont utilisé les cellules HL60 et les cellules NB4, toutes deux isolées de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë. Les cellules NB4 ont subi une translocation chromosomique t(15;17) qui crée une fusion du récepteur de l'acide rétinoïque  $\alpha$  avec le nouveau locus, qui lui code pour un facteur de transcription créant un récepteur chimérique aux propriétés altérées (Kakizuka A. et al., 1991; de The H. et al., 1991). L'ARNm de la Mbn est régulé négativement par l'acide rétinoïque dans les cellules HL60 après deux heures, mais est régulé positivement dans les cellules NB4 après 24 heures pour ensuite disparaître lui aussi après 4 jours. Des transcriptions "Run-on" ont permis la démonstration qu'il s'agissait d'un phénomène post-transcriptionnel. La cycloheximide qui est un inhibiteur de la synthèse protéique augmente la quantité d'ARNm dans les cellules HL60 et les cellules NB4. L'actinomycine D reproduit ces effets dans les deux lignées cellulaires, démontrant que l'effet est post-transcriptionnel et qu'il y a inhibition de la transcription d'un facteur



négatif influençant la stabilité de l'ARNm de la Mbn. L'identité de ce facteur négatif est inconnu en ce moment, mais la transcription de ce facteur semble être régulée de façon différente dans les HL60 et les NB4, peut-être à cause de la translocation t(15;17).

### 1.6.3 Substrat de la protéase.

La Mbn/PR3 est une protéase à sérine des neutrophiles et des monocytes. Cela signifie que la protéolyse est catalysée par l'attaque du groupement sérine sur l'atome de carbone du carbonyle formant le lien peptidique. La Mbn est une protéase neutre dont l'activité protéolytique maximum est à pH 6.5 (Kao R.C. et al., 1988). La Mbn dégrade une variété de substrats protéiques naturels comme l'élastine de ligament, l'azocaséine, et l'hémoglobine. La Mbn dégrade une série de protéines de la matrice cellulaire: la fibronectine, la laminine, la vitronectine et le collagène de type IV, mais pas le collagène de type I et III (Rao N.V. et al., 1991). Cet enzyme est aussi inhibé par des inhibiteurs synthétiques spécifiques aux protéases à sérine, comme le DFP (lie la sérine catalytique de façon covalente) et le PMSF (lie l'histidine catalytique de façon covalente).

Une étude sur une variété de substrats synthétiques a été faite dans le but de définir un substrat spécifique: le Boc-Ala-Ala-Nva-SBzl avec une valeur  $K_{cat}/K_m$  de  $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  est le meilleur substrat trouvé pour la Mbn alors que d'autres comme le Boc-Ala-Ala-AA-SBzl (AA= Val, Ala ou Met) sont tous de bons substrats mais avec une moins bonne activité ( $1-4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ). Le meilleur inhibiteur synthétique de la Mbn est le 7-amino-4-chloro-3-(2-bromoethoxy) isocoumarin et le 3,4-dichloroisocoumarin avec des valeurs  $K_{obs}/(I)$  de 4700 et de  $2600 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  respectivement. La comparaison de l'activité enzymatique entre la Mbn et l'élastase sur les différents substrats synthétiques utilisés dans cette étude, démontre une différence importante entre ces deux enzymes pour la liaison du substrat: le site S4 est plus polaire sur la Mbn alors que le site S1 et le site S' sont plus restrictifs par rapport à l'élastase (Kam C.M. et al., 1992).

La Mbn est aussi inhibée par une série d'inhibiteurs protéiques spécifiques aux protéases à sérine. L'inhibition de l'activité enzymatique par l' $\alpha$ -1-antitrypsin ( $\alpha_1$ AT) et

$\alpha_2$ -macroglobuline ( $\alpha_2M$ ), a été calculée sur le substrat Boc-Ala-ONp. L' $\alpha_1AT$  et l' $\alpha_2M$  inhibent l'activité avec une valeur de  $k_i = 8.1 \times 10^{-6}$  M et  $k_i = 1.1 \times 10^{-7}$  M respectivement. Contrairement à l'élastase humaine de neutrophile, la Mbn ne semble pas être inhibée par les inhibiteurs de chymotrypsine et est faiblement inhibée par l'égline c ( $k_i = 4.2 \times 10^{-4}$  M), suggérant une différence du site de liaison du substrat et des inhibiteurs (Rao N.V. et al., 1991).

Est-ce que la liaison de l'IgG cANCA à la Mbn peut inhiber l'activité enzymatique de l'enzyme? Il a été démontré que l'activité de dégradation de l'élastine est inhibé à 84.2% (une moyenne de plusieurs sera) par des IgGs purifiées de cANCA. L'hydrolyse d'un substrat spécifique comme le MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA est inhibé à 63.3% par des IgGs cANCA par rapport à des IgGs témoins (van de Wiel B.A. et al., 1992). Les auteurs ont aussi montré que les cANCAs inhibaient de 44.8% (par rapport au groupe d'IgGs témoins), la formation du complexe avec l' $\alpha_1AT$ , l'inhibiteur naturel de la Mbn. Les données sont présentées en % d'inhibition car les réactifs utilisés sont des anticorps polyclonaux: les cANCAs ne représentent pas une population pure d'inhibiteurs. Cela explique pourquoi les auteurs ne peuvent atteindre 100% d'inhibition. Ces données suggèrent donc que le site actif de la Mbn est la cible de la plupart des cANCAs et que ces derniers peuvent agir comme de très forts inhibiteurs de l'activité protéolytique de la Mbn. Il est aussi probable que cette situation soit reproduite *in vivo* car, la proportion d'IgGs cANCAs disponibles dans un sérum à haut titre semble être très élevée.

#### 1.6.4 Activité microbicide

Il est généralement accepté que la Mbn a une activité microbicide (Campanelli D. et al., 1990a et 1991). Une protéase à sérine nommée p29b a été purifiée des granules azurophiles du neutrophile et séquencée à l'extrémité N-terminale. La séquence N-terminale de l'enzyme purifiée a une homologie parfaite sur 20 acides aminés sauf un (Campanelli D. et al., 1991) avec la Mbn, et montre une activité microbicide sur E.coli, S. faecalis et C.albicans (Gabay J.E. et al., 1989; Campanelli D. et al., 1990a). On



sait que dans le cas de la cathepsine G et de l'azurocidine, l'activité microbicide est indépendante de l'activité protéolytique car, la cathepsin G inhibé par le DFP et l'azurocidine qui n'a pas d'activité protéolytique, sont tous deux microbicides (Bangalore N. et al., 1990; Campanelli D. et al., 1990a). Des peptides obtenus de la digestion de la cathepsin G par la clostripaïne, soit IIGGR et HPQYNQR (séquence 1-5 et 77-83), sont capables d'une activité microbicide (Bangalore N. et al., 1990), suggérant un mécanisme découplé de la protéolyse et impliquant ces séquences. La Mbn possède une séquence homologue, soit IIGGH, à l'extrémité N-terminale (résidu 1-5 du N-terminal de la protéine mature) mais ne possède pas d'homologie avec le deuxième domaine de la cathepsin G. De plus la Mbn n'a aucune homologie caractéristique avec d'autres protéines microbicides. L'ADNc de la PR3 a été cloné à partir d'une librairie d'expression dans lambda gt11 avec l'aide d'un anticorps monoclonal anti-p29b. Cet ADNc a une homologie de 99.9% avec l'ADNc de la Mbn, donc il est presque certain qu'elle est une protéine microbicide. Étant donné que la Mbn possède une activité microbicide, il faut prévoir qu'il sera difficile de l'exprimer dans un vecteur d'expression chez E.coli, à moins d'inhiber cette activité par une fusion d'un peptide à l'extrémité N-terminale de l'enzyme. A ce propos, il est intéressant de noter qu'en effet, certains groupes ont beaucoup de difficulté à exprimer la PR3/Mbn dans E.coli (Dr. Goldschmeding, communication personnelle), et que la seule équipe ayant exprimée la protéine, l'a fait avec une protéine de fusion (Bini P. et al., 1992).

#### 1.6.5 Translocation de la protéase à la surface membranaire.

Les premières études de localisation intracellulaire ont démontré que l'autoantigène des cANCA est situé dans les granules azurophiles des neutrophiles, et que l'enzyme se retrouvait uniquement dans la partie soluble d'une extraction par KCl/Urée (Goldschmeding R. et al., 1989b). Une étude (Csernok E. et al., 1990) a démontré, à l'aide de l'immunomicroscopie électronique, que l'antigène est principalement exprimé dans les granules primaires du neutrophile contenant la MPO, ainsi que dans les petits granules des monocytes. Cette étude montre aussi qu'une faible fraction de la Mbn est aussi

exprimée à la membrane plasmique du neutrophile et des monocytes. La portion de Mbn des granules semble être localisée sur la membrane intérieure et dans la lumière du granule. La technique d'immunomicroscopie électronique utilise cependant des sections de cellules fixées par de la glutaraldéhyde 1.5% ou de la paraformaldéhyde 2%; ainsi, il n'est pas assuré que la présence de l'enzyme associée à la membrane soit le reflet de la localisation cellulaire réelle plutôt qu'une interaction due à la fixation des cellules. Aussi, il a été démontré que des IgGs entières ainsi que la portion F(ab)<sub>2</sub> des cANCA, peuvent activer la dégranulation des neutrophiles *in vitro* (Falk R.J. et Jennette J.C., 1990). Ce mécanisme de dégranulation semble être spécifique aux ANCA et est entièrement basé sur le fait que l'antigène est exprimé à la surface de la cellule. Il semble donc qu'une faible portion de la Mbn soit associée à la membrane plasmique, suggérant qu'une dégranulation partielle pourrait augmenter la quantité d'antigène exprimé à la surface. La liaison biochimique entre l'antigène et la membrane cellulaire n'est pas caractérisée, mais elle rend possible l'élaboration d'un modèle de pathogénèse *in vivo* où l'antigène est accessible à l'anticorps.

#### 1.6.6 Homologie avec des protéines procaryotes.

A l'aide de la séquence primaire des acides aminés de la Mbn (Labbaye C. et al., 1991) et du dictionnaire de motifs protéiques PROSITE (Devereux J. et al., 1984), notre équipe a localisé un domaine de phosphorylation des histidines, utilisé principalement chez les procaryotes. Cette séquence, VPHGT, comprend les acides aminés 146 à 150 de la myéloblastine. Cette séquence est très conservée (L-I-V-M)-P-H-G-T parmi les protéines impliquées dans le transport des sucres à l'intérieur de bactéries (Meadow N.D. et al., 1990). Ces protéines phosphorylent le sucre venant du milieu de culture, favorisant son transport à l'intérieur de la bactérie. Cette réaction se fait selon un mécanisme généralisé chez tous ces enzymes: un groupement phosphate est transféré du phosphoenol pyruvate sur un enzyme E-I qui transfère son phosphate sur une protéine navette (HPr). La protéine phospho-HPr transfère son phosphate à une perméase membranaire, spécifique à un sucre, composée de trois domaines distincts (IIA, IIB et IIC) qui peuvent exister en un seul



polypeptide ou par une combinaison de deux ou trois oligomères. Le premier domaine (IIA) est phosphorylé par HPr sur une histidine, alors que le deuxième est phosphorylé par IIA sur une cystéine ou une histidine. Finalement, le groupement phosphate est transféré du domaine IIB au sucre dans un processus catalysé par le domaine IIC. Le domaine détecté sur la Mbn est présent chez E.coli IIA ( $\beta$ -glucoside), E.coli IIA (mannitol), S.aureus et S.carnosus IIA (mannitol), et S.typhimurium (IIA fructose). La perméase du mannitol de E.coli est composé des trois domaines (IIA, IIB et IIC) fusionnés dans un seul polypeptide, alors que le domaine IIA de S.aureus a un poids moléculaire de 15 kD et que les autres domaines sont sur un polypeptide de 35-40 kD (Meadow N.D. et al., 1990; Reiche B. et al., 1988). Il a été mentionné au 4e congrès international sur les ANCA (Stegeman C.A. et al., 1992), que 70% des patients atteints de la granulomatose de Wegener et ayant des séra cANCA, ont une infection nasale de S.aureus précédant l'augmentation du titre des cANCA.

Donc, ces données nous indiquent qu'il existe une très grande homologie de structure entre le domaine VPHGT de la Mbn et des protéines procaryotes impliquées dans le transport transmembranaire des sucres, en particulier du mannitol (IIA mannitol de E.coli, de S.carnosus et de S.aureus). Le fait que l'apparition de cANCA chez des patients atteints de la granulomatose de Wegener, soit précédée par une infection de S.aureus exprimant IIA mannitol, nous suggère qu'il pourrait y avoir une production d'anticorps contre le domaine VPHGT de IIA mannitol et peut-être par mimétisme moléculaire, contre le même domaine sur la Mbn. Ceci pourrait constituer une immunisation pouvant briser la barrière de la tolérance et expliquer la présence d'IgGs cANCA dans les séra de ces patients.

## **Matériels et méthodes**



## 2.1 Liste du matériel et des fournisseurs

* Sérum de veau foetal	Hyclone (Logan, Utah)
* RPMI 1640	Gibco (Burlington, Canada)
* $^{32}\text{P}$ -orthophosphate	Amersham Canada Ltd (Oakville, Canada)
* $^{35}\text{S}$ -méthionine	Amersham Canada Ltd (Oakville, Canada)
* $^{35}\text{S}$ -cystéine	Amersham Canada Ltd (Oakville, Canada)
* $^3\text{H}$ -diisopropylfluorophosphate	NEN Dupont (Mississauga, Canada)
* Acrylamide et le bis-acrylamide	Bio-Rad (Melville, NY)
* Phosphatase alcaline	Sigma (St-Louis, MO)
* $\text{TNF}\alpha$ humain recombinant	Sigma (St-Louis, MO)
* Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma (St-Louis, MO)
* Phospholipase D	Sigma (St-Louis, MO)
* Protein G Sepharose fast flow	Pharmacia (Montréal, Canada)
* Protein A Sepharose Cl-4b	Pharmacia (Montréal, Canada)
* myéloperoxydase humaine	Calbiochem (La Jolla, CA)

**2.2 Sera.** Les sera de patients atteints de la granulomatose de Wegener (WG) ont été obtenus de notre banque de sera congelés. Ces sera avaient les caractéristiques immunologiques suivantes: une fluorescence cytoplasmique (cANCA) par le test de l'immunofluorescence indirecte sur des neutrophiles fixées à l'éthanol et un test d'ELISA négatif pour lamyéloperoxydase humaine purifiée. Trois autres réactifs sont les dons du Dr. R. Goldschmeding (Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam, The Netherlands): un sera cANCA humain de référence qui est capable d'immunoprécipiter la bande de 29-32 kD des granules primaires de HL60; une préparation d'anticorps monoclonaux de souris anti-PR3 spécifiques à l'autoantigène de la WG (mAb 12.8), ainsi qu'une préparation d'anticorps monoclonaux de souris anti-

glycophorine A (AME-1), un antigène du neutrophile qui n'est pas associé au système. L'anticorps 12.8 peut être utilisé dans un test d'ELISA "sandwich" avec des sera cANCA humains, suggérant qu'il cible un épitope différent de ceux ciblés par les sera humains. Ces deux anticorps sont d'isotype IgG1. Un anticorps anti-IgG + IgM de souris conjugué à une molécule de fluorescéine ("FITC"), ainsi qu'un anticorps anti-CD4 de souris sont les dons du Dr. C.M. Dubois (CHUS, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada).

**2.3 Culture de cellules et préparation des extraits cellulaires.** Les neutrophiles ainsi que les cellules mononucléées sont isolés du sang périphérique (Borregaard N., 1983). La lignée cellulaire HL60 (ATCC CCL 240, Rockville, MD) est cultivée dans un milieu RPMI 1640 contenant du sérum de veau foetal (FBS) à 10% ainsi que de la garamycin (20 ug/ml). La lignée cellulaire HeLa (ATCC CCL 2, Rockville, MD) est cultivée dans un milieu RPMI 1640 contenant du FBS à 5% ainsi que 100U/ml de pénicilline et de streptomycine. Toutes les cellules sont maintenues sous une atmosphère de CO<sub>2</sub> 5% à 37°C. Toutes les cellules ont été lavées 2 fois dans du PBS et brisées dans du PBS contenant le détergeant NP40 1.0%. Les cellules ont été soniquées et le matériel insoluble centrifugé pour 15 minutes à 13 000g. Le surnageant est utilisé comme préparation d'antigène en immunoprécipitation. Les protéines solubles des granules azurophiles des neutrophiles ainsi que les granules primaires des cellules HL60 sont préparés selon la méthode de Borregaard (Borregaard N. et al., 1983).

**2.4 Immunofluorescence indirecte.** Des neutrophiles et des cellules HL60 ont été lavés 2 fois dans du PBS et 100 000 cellules centrifugées à 500 RPM pendant 10 minutes sur une lame de microscope dans une cytocentrifugeuse. Les lames ont été séchées à l'air pendant 10 minutes et puis plongées dans un bain d'éthanol 100% à -20°C pour 10 minutes. Les lames sont séchées à l'air, et les sera humain dilués 1/20 dans du PBS sont incubés sur les lames pendant 30 minutes. Les lames sont lavées et un anticorps anti-humain couplé à la

fluorescéine ("FITC") dilué 1/1000 est incubé 30 minutes sur les cellules. Les lames sont lavées et incubées 5 minutes avec une solution de bromure d'éthidium à 100 ug/ml. Les lames sont lavées et l'on ajoute un lamelle de verre avec une goutte de glycérol-octane. La fluorescence des cellules est observée à l'aide d'un microscope à épifluorescence muni des filtres appropriés (Fernandes M.F. et al., 1993).

**2.5 Technique d'électrophorèse des protéines.** L'analyse des protéines par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été faite comme décrit (Laemmli U.K., 1970). L'appareil utilisé est de type "mini-protein II" de Bio-Rad et les gels avaient une épaisseur de 1 mm. Les protéines ont été détectées soit par la fluorographie, l'autoradiographie, ou la coloration à l'argent. Les protéines des gels ont été fixées dans méthanol 50% pendant une heure minimum. Pour l'autoradiographie, les gels ont été séchés et mis en contact avec un film Kodak XP-OMAT AR. La technique de fluorographie est identique, sauf qu'on doit faire tremper les gels au préalable, dans une solution de salicylate 1M (pH 6.0) pendant 30 minutes (Sambrook J. et al., 1988). La technique de coloration à l'argent est essentiellement celle décrite par Boire (Boire G., 1990).

**2.6 Marquage de cellules HL60 avec de la  $^{35}\text{S}$ -méthionine et de la  $^{35}\text{S}$ -cystéine.** Des cellules HL60 ont été lavées 2 fois dans du PBS stérile et maintenues pour 6 heures (Harlow E., 1988) dans un milieu RPMI 1640 sans méthionine ni cystéine, en présence de 10% FBS et de 250 uCi de  $^{35}\text{S}$ -méthionine (1000 Ci/mmol) et de 100 uCi de  $^{35}\text{S}$ -cystéine (1000 Ci/mmol). Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois et resuspendues dans du PBS contenant du NP40 1.0%. Les cellules ont été soniquées, centrifugées à 13 000g pour 20 minutes à 4°C, et le surnageant utilisé en immunoprécipitation avec des sera humains (Harlow E., 1988).



**2.7 Immunoprécipitation à partir d'extraits cellulaires.**  $10^7$  neutrophiles isolés sont traités pour 30 minutes à 37°C avec du PMA à 0.1 ou 1.0 ug/ml, du TNF $\alpha$  humain à 10 ng/ml ou laissées au repos dans un volume final de 500 ul de PBS (Falk R.J., 1990). Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 500g, le surnageant des cellules est radio-marqué à l'aide de 5 uCi de  $^3\text{H}$ -DFP pour 30 minutes à la température de la pièce, et utilisé comme antigène en immunoprécipitation. Les cellules sont resuspendues dans du PBS contenant du NP40 1.0%, et soniquées. Le matériel insoluble est centrifugé pendant 10 minutes à 13 000g et le surnageant est radio-marqué avec 5 uCi de  $^3\text{H}$ -DFP (Goldschmeding R. et al., 1989), et utilisé comme source d'antigènes en immunoprécipitation. Brièvement, 200 ul du surnageant des cellules ou des extraits totaux de cellules radio-marquées sont ajoutés aux IgGs (de 20 ul de sera humain) immobilisées sur des billes de protéine A-Sepharose (5 mg) resuspendues dans le tampon d'immunoprécipitation (Tris 0.1 M, NaCl 0.5M, NP40 0.05%) (Boire G., 1990). L'antigène est incubé pour 30 minutes et les billes sont lavées 7 fois à l'aide de 800 ul de PBS contenant du Tween 20 0.5%. Du tampon d'échantillon pour "SDS-PAGE" est ajouté aux billes et les protéines radio-marquées avec le  $^3\text{H}$ -DFP sont séparées sur un gel de polyacrylamide 12% (SDS-PAGE).

**2.8 Immunodéplétion de la myéloblastine d'un extrait de neutrophiles.** Un extrait (20 ul) de neutrophiles ( $2 \times 10^8$  cellules/ml) radio-marqué avec du  $^3\text{H}$ -DFP a été complètement immunodéplété de l'autoantigène des cANCA en l'incubant sur de la protéine A-Sepharose liée à un sérum cANCA (20 ul sur 5 mg de billes). L'extrait d'antigènes a été incubé 10 minutes en présence des billes, ces dernières centrifugées et le surnageant réincubé avec d'autres billes liées au même sérum cANCA. L'immunodéplétion de l'extrait a été recommencée 5 fois. Les billes de protéine A-Sepharose ayant servi à l'immunodéplétion ont été lavé 7 fois et ont été resuspendues dans le tampon d'échantillon de SDS-PAGE pour analyser l'épuisement de l'extrait d'antigènes. La quantité d'antigène



immunoprécipité lors des 5 étapes a été comptée en coup par minutes (CPM) à l'aide d'un compteur à scintillation, pour déterminer la quantité totale de l'antigène dans un extrait de 20 ul. La quantité totale de protéase à sérine dans l'extrait de 20 ul a été déterminée en récupérant les protéines précipitées au TCA sur un filtre, suivi par le comptage des CPM sur le filtre.

**2.9 Analyse des protéines de surface.** Des neutrophiles humains isolés du sang périphérique (Borregaard N. et al., 1983) ont été traités pour 30 minutes à 37°C avec du TNF $\alpha$  humain à la concentration de 10 ng/ml, du PMA à 1.0 et 0.1 ug/ml, ou laissé au repos dans du PBS. La même expérience a été effectuée sur des cellules HL60 en ajoutant le TNF $\alpha$  et le PMA dans le milieu de culture pendant 45 minutes à 37°C. Un million de cellules ont été lavées 2 fois dans le PBS et ont été incubées 30 minutes sur glace avec l'anticorps monoclonal anti-PR3 12.8 dilué 1/50 dans 100 ul de PBS contenant 1% de lait en poudre. Les cellules ont été lavées 2 fois dans du PBS et incubées 30 minutes avec un anti-IgG de souris couplé à la fluorescéine ("FITC") dilué 1/200. Après 2 lavages avec du PBS, la fluorescence de surface est quantifiée à l'aide d'un "Beckton Dickinson Flow cytometry analyser", en comptant 2200 événements. Pour évaluer le bruit de fond (fluorescence négative) sur les cellules HL60, un anticorps anti-CD4 de souris dilué 1/10 a été utilisé. Sur tous les traitements de cellules, une expérience témoin qui consiste à seulement incuber l'anticorps secondaire a été effectuée. Les expériences sur les neutrophiles et les cellules HL60 ont été faites en duplicata et les résultats sont exprimés en % de fluorescence positive.

**2.10 Marquage des cellules HL60 avec du  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate.**  $2 \times 10^8$  cellules HL60 ont été maintenues toute une nuit dans un milieu RPMI 1640 sans phosphate, contenant du FBS dialysé à 10 ou 20%, et en présence de 500 uCi de  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate (Boire G., 1990). Une partie des cellules a été traitée avec du PMA à la

concentration finale de 107 nM, ou du cycloheximide à 10 ug/ml, les deux en présence de FBS dialysé à 10%. Les cellules ont été lavées 2 fois dans du PBS et brisées avec du PBS contenant du NP40 1.0%. Le matériel soluble a été utilisé en immunoprécipitation avec un sérum cANCA humain comme décrit.

**2.11 Traitement de la myéloblastine à la phosphatase alcaline (PA).** Un extrait de protéines provenant de  $10^7$  neutrophiles a été radio-marqué avec du  $^3\text{H}$ -DFP et immunoprécipité comme décrit à l'aide d'un sérum cANCA humain. Les billes ont été lavées et resuspendues pour 60 minutes dans le tampon de la phosphatase alcaline (ethanolamine 1M,  $\text{MgCl}_2$  1.0 mM) à pH 10.0, avec ou sans 80 U de phosphatase alcaline. Comme témoin de la réaction, la même quantité d'enzyme a été incubée dans le même tampon à pH 7.4. Les billes ont été lavées 3 fois dans du PBS avant d'être bouillies dans le tampon d'échantillon de "SDS-PAGE". Les protéines radio-marquées au  $^3\text{H}$ -DFP ont été séparées sur un gel de polyacrylamide 12% (SDS-PAGE).

**2.12 Immunoprécipitation de petits polypeptides de la myéloblastine par un sérum cANCA.** Les protéines du neutrophile ont été extraites dans un tampon RIPA (PBS contenant du déoxycholate 0.5%, NP40 1%, SDS 0.1%) et radio-marquées avec 5 uCi de  $^3\text{H}$ -DFP. Une partie des cellules a servi à extraire les protéines en brisant les cellules avec du PBS (NP 40 1.0%). Ces protéines ont été immunoprécipitées avec un sérum cANCA.

**2.13 Immunoprécipitation d'une phosphoprotéine de 15 kD induite par le mannitol dans les bactéries Straphylococcus aureus.** Une souche de S.aureus a été obtenue du département de microbiologie (CHUS). Les bactéries ont été amplifiées dans un milieu LB à 37°C, puis lavées deux fois dans la solution saline M9. Les bactéries ont été induites dans un milieu M9 supplémenté par différentes sources de sucres pendant 4

heures. Le milieu minimum a été renouvelé et supplémenté avec 250 uCi de  $^{35}\text{S}$ -méthionine (Harlow E., 1988). Les protéines ont été extraites par une lyse au lysozyme et par une sonication de deux minutes à 45 Hz. Le surnageant clarifié a été utilisé en immunoprécipitation avec un sérum cANCA. Différents sucres (concentration finale 1%) ont été utilisés pour l'induction et le marquage: le mannitol seul, le mannitol + glucose, le glucose seul, le glycerol seul, et le milieu minimum seul. Un radio-marquage avec du  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate a été fait avec des bactéries induites avec le mannitol pendant 4 heures et ensuite repassées dans un milieu minimum M9 tamponé avec du Tris (pH7.4) au lieu du phosphate, contenant différents sucres, et supplémenté avec du  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate (500 uCi), pendant 1 heure. Les protéines ont été extraites et immunoprécipitées à l'aide d'un sérum cANCA.

Pour vérifier qu'il y a réaction croisée entre les antigènes des cellules HL60 et ceux de S.aureus, l'immunoprécipitation des protéines de S.aureus phosphorylées (marquage glucose-mannitol) a été inhibée par une préincubation des IgGs avec des protéines extraites des granules primaires des cellules HL60. Des volumes de 50, 25, 10, et 0  $\mu\text{l}$  d'une préparation de granules primaires de cellules HL60 ( $2 \times 10^8$  cellules/ml) ont été préincubés en duplicata sur les IgGs immobilisées d'un sérum cANCA et l'excès d'antigène lavé. Les protéines bactériennes radio-phosphorylées ont été incubées 2 heures et les billes ont été lavées dans du PBS (Tween 20 0,5%). Le résultat de l'immunoprécipitation a été analysé sur un gel de polyacrylamide (SDS) de 15%.



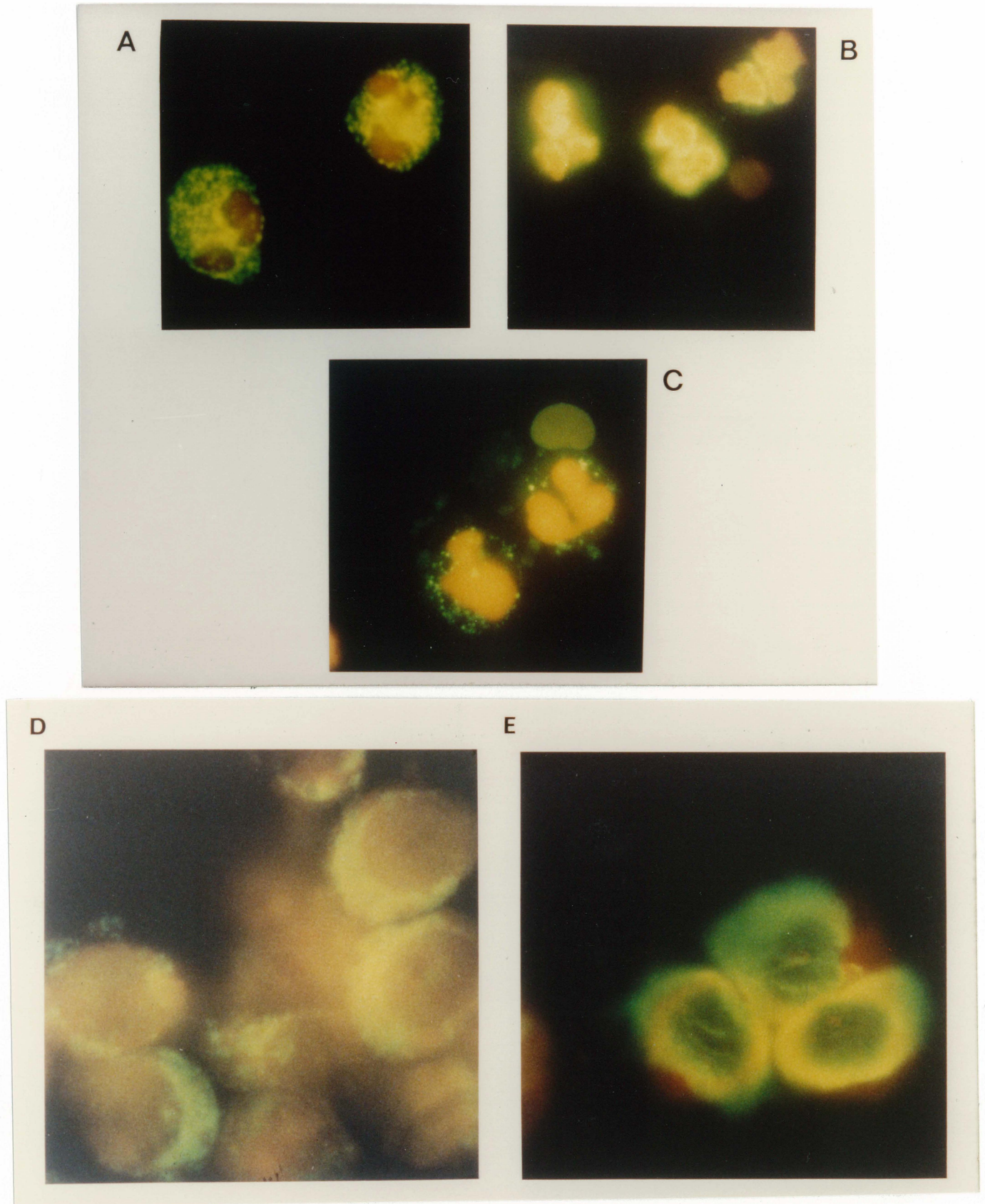
## Résultats

Les résultats seront présentés en deux parties: les données sur la caractérisation de l'autoantigène seront décrites en premier et la caractérisation de(s) l'épitope(s) ciblé(s) par un sérum cANCA d'une patiente suivra.

### **Immunofluorescence indirecte et immunoprécipitation des autoantigènes ciblés par les différents types d'ANCAs.**

Les ANCAs ont été découverts par la technique d'immunofluorescence indirecte (IIF) sur des neutrophiles fixés à l'éthanol. A partir de cette technique, plusieurs types de fluorescence ont été observés. Tous les sera cANCAs que j'ai utilisé au cours de ma maîtrise ont été confirmés comme tel par cette technique. A la Figure 2, on peut observer un exemple en A et D, de la fluorescence émise par un sérum cANCA sur des neutrophiles et des cellules HL60. En B et E, on observe que la fluorescence des sera pANCAs sur les neutrophiles et les cellules HL60 est différente et centrée autour du noyau, ou périnucléaire. En C, une fluorescence atypique est émise par un sérum aANCA.

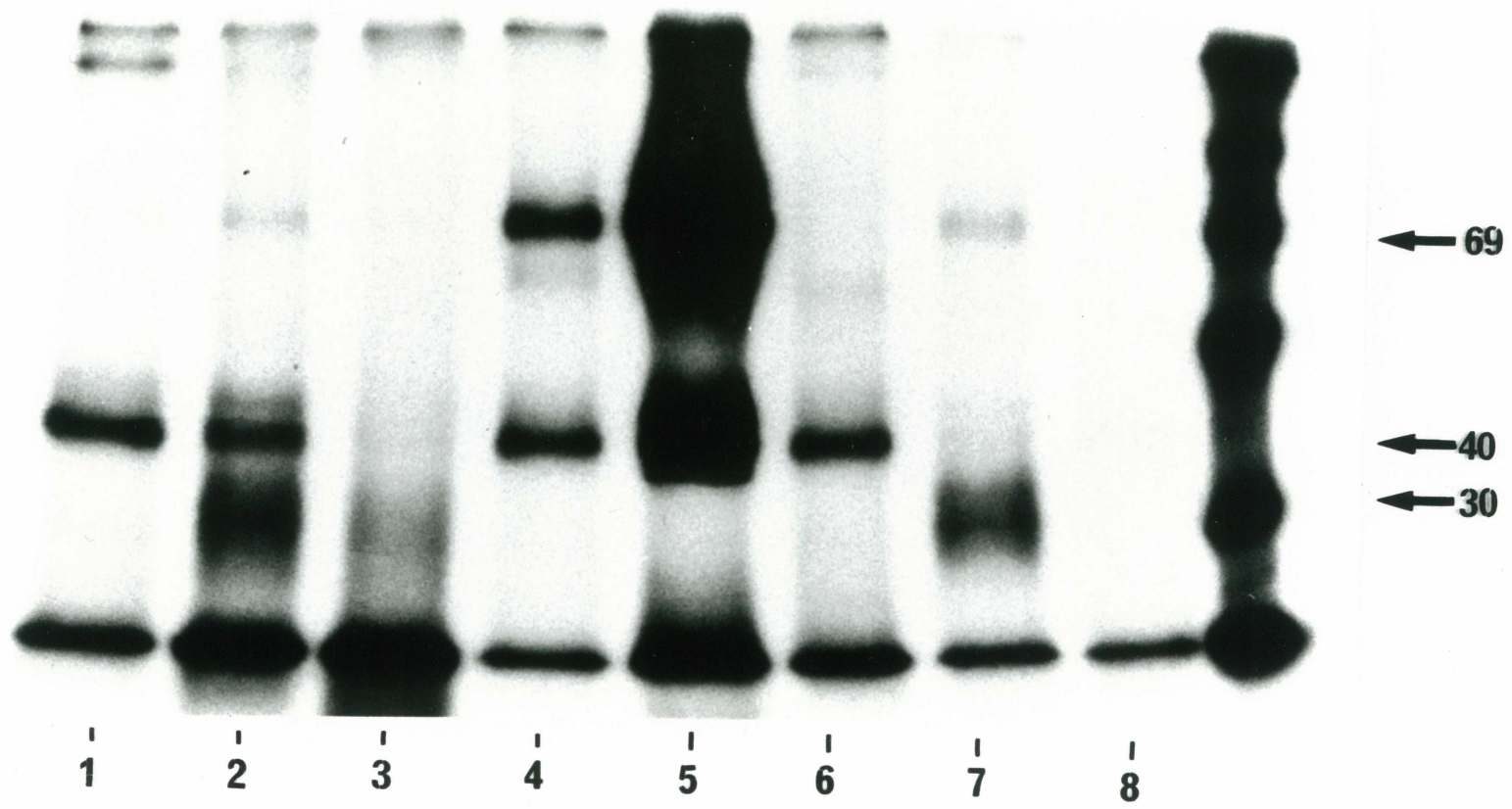
Nous avons tenté, par la technique du Western blot d'identifier les protéines ciblées par ces différents types d'ANCAs. D'autres équipes, comme nous, n'ont pu détecter les antigènes par le Western blot. Dans cette technique, l'antigène présenté aux anticorps est dénaturé par la chaleur, le SDS et le  $\beta$ -mercaptoéthanol: donc les épitopes conformationnels sont perdus. Nous avons donc utilisé l'immunoprécipitation, dans laquelle l'anticorps est mis en contact avec un antigène radioactif mais de conformation native. Des cellules HL60 ont été radio-marquées *in vivo* à l'aide de la  $^{35}\text{S}$ -méthionine et de la  $^{35}\text{S}$ -cystéine, et les protéines solubles ont été immunoprécipitées par les différents types de sera ANCAs. On peut observer à la Figure 3, que les sera ANCAs immunoprécipitent tous des protéines spécifiques lorsqu'on compare avec le résultat d'un sérum d'humain normal (figure 3; piste 8). Les sera cANCAs



**Figure 2.** Immunofluorescence indirecte sur neutrophiles (A à C) et cellules HL60 (D et E) des différents types d'ANCAs. Des sera cANCA (A et D), des sera pANCA (B et E) et un sérum aANCA (C) sont représentés. La fluorescence rouge vient de la contre-coloration du noyau avec du bromure d'éthidium.



**Figure 3. Immunoprécipitations d'extraits de cellules HL60 radio-marquées *in vivo* à l'aide de la  $^{35}\text{S}$ -méthionine et de la  $^{35}\text{S}$ -cystéine.** Les pistes 2, 3, et 7 représentent des immunoprécipitations avec des sera cANCA's humains, alors que la piste 8 montre la réactivité d'un sérum d'humain normal. Les pistes 1 et 6 sont des immunoprécipitations avec des sera aANCA's. Les pistes 4 et 5 sont des immunoprécipitations avec des sera pANCA's caractérisés anti-MPO par ELISA. La protéine de 30 kD qui correspond à l'autoantigène des cANCA's, la protéine de 40 kD qui est retrouvée plus fréquemment chez les aANCA's, et la protéine de 69 kD correspondant à la MPO, sont toutes indiquées à droite sur la photo.



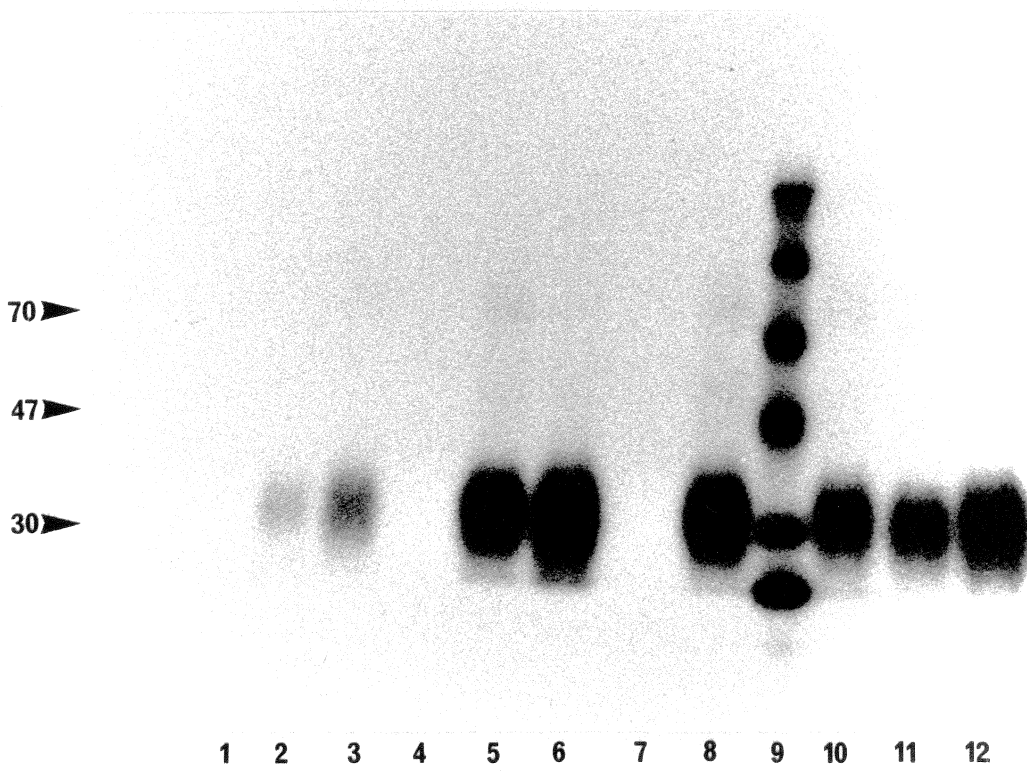
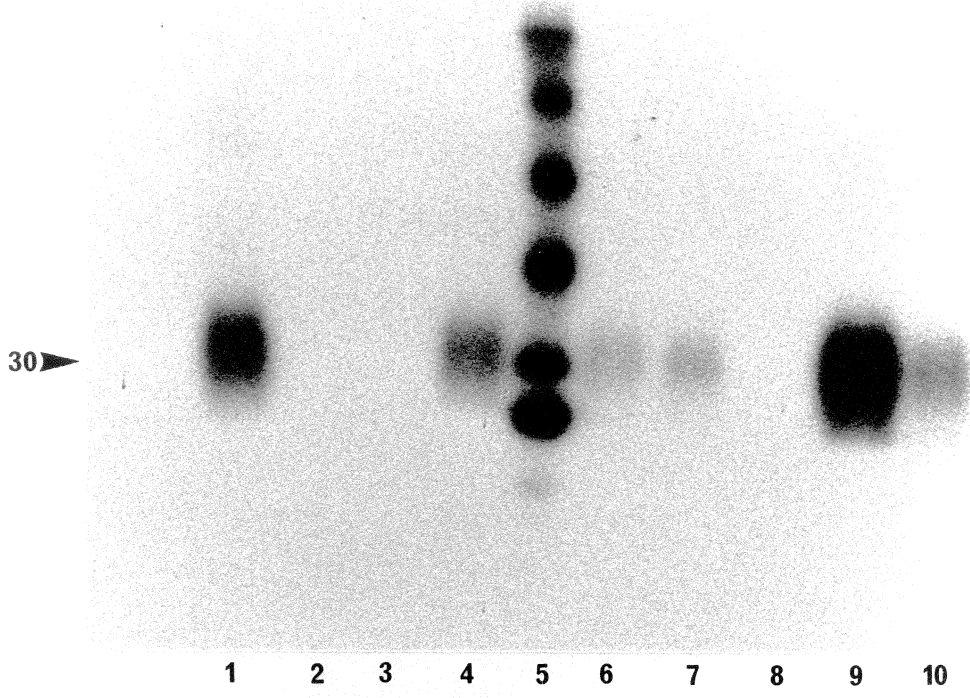
(pistes 2-3, 7) immunoprécipitent une bande large à 30 kD, ce qui rend la détermination du poids moléculaire difficile. Les sera pANCA (pistes 4-5) immunoprécipitent une protéine de 69 kD, représentant le poids moléculaire de la chaîne lourde lamyéloperoxydase (MPO). Les sera aANCA (pistes 1, 6) peuvent immunoprécipiter une protéine de 40 kD qui peut aussi être observée en même temps que les protéines immunoprécipitées par les sera cANCA (pistes 2) et les sera pANCA (pistes 4-5). La nature de cette protéine de 40 kD reste cependant à établir (Dalpé G. et al., 1992).

### **Immunoprécipitation d'une protéase à sérine d'environ 30 kD, en plus d'une protéase de 47 et 70 kD avec des sera cANCA dans les cellules HL60.**

Il a été décrit que la cible des cANCA est une protéase à sérine de 29 kD du neutrophile et des monocytes (Goldschmeding R. et al., 1989b; Niles J.L. et al., 1989). Les protéases à sérine lient de façon covalente à la sérine catalytique, un inhibiteur synthétique nommé le diisopropylfluorophosphate (DFP). Une autre équipe (Goldschmeding R. et al., 1989b) et nous-même avons utilisé cette propriété pour radio-marquer spécifiquement un extrait de cellules HL60 ( $^3\text{H}$ -DFP). Les extraits radio-marqués avec ce ligand radioactif ont été utilisés pour une immunoprécipitation avec des sera cANCA. La plupart des sera cANCA sont capables d'immunoprécipiter de façon très spécifique une protéine large d'environ 30 kD (figure 4). Dans les cellules HL60, la largeur de la bande est une caractéristique reproductible qui est unique à cette cellule. Cette bande large n'est pas le résultat d'une surexposition du film, car de très courtes expositions donnent le même aspect. Nous croyons plutôt qu'il s'agit d'une modification post-traductionnelle prenant place dans cette cellule, et pouvant modifier la migration en gel de polyacrylamide (SDS). Les sera qui étaient négatifs par cette technique avaient un résultat négatif en IIF (pistes 2, 3, 8 sur le gel du haut; pistes 1, 4, 7 sur le gel du bas).



**Figure 4. Immunoprécipitations d'extraits de cellules HL60 radio-marquées à l'aide du  $^3\text{H}$ -DFP.** Des sera de patients atteints de la granulomatose de Wegener (sera cANCA, pANCA, négatif en ANCA) ont été utilisés en immunoprécipitation (gel du haut; pistes 1-4, 6-10, gel du bas; pistes 2-8 et 10-12). Sur la photo du bas, la piste 1 représente la réactivité d'un sérum humain normal, alors que la piste 10 représente un la réactivity d'un sérum cANCA à haut titre. La piste 5 sur le gel du haut et la piste 9 sur le gel du bas représentent des marqueurs de poids moléculaires radiomarqués (Amersham). Tous les sera négatifs en immunoprécipitation d'une protéase à sérine de 27-32 kD, le sont également en immunofluorescence indirecte sur neutrophiles ou possèdent des anticorps anti-MPO (résultats non présentés). D'une façon générale, seuls les sera cANCA immunoprécipitent une protéase. Chez les sera à hauts titres, on peut observer faiblement des bandes de protéases à 47 et 70 kD.

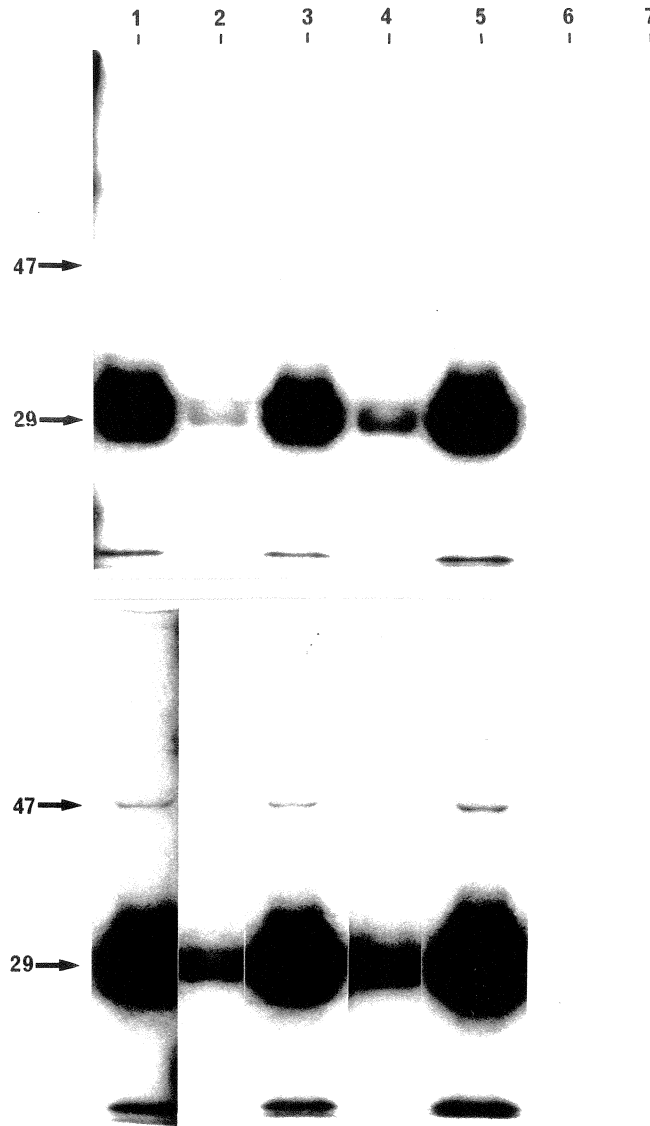


Nous avons aussi observé des protéines immunoprécipitées avec des poids moléculaires de 47 et 70 kD (pistes 5, 6, 8). L'intensité de ces protéines liant le  $^3\text{H}$ -DFP est très faible, et leur observation nécessite une longue exposition du film. La nature de ces protéases très faiblement immunoprécipitées sera discutée dans ce mémoire.

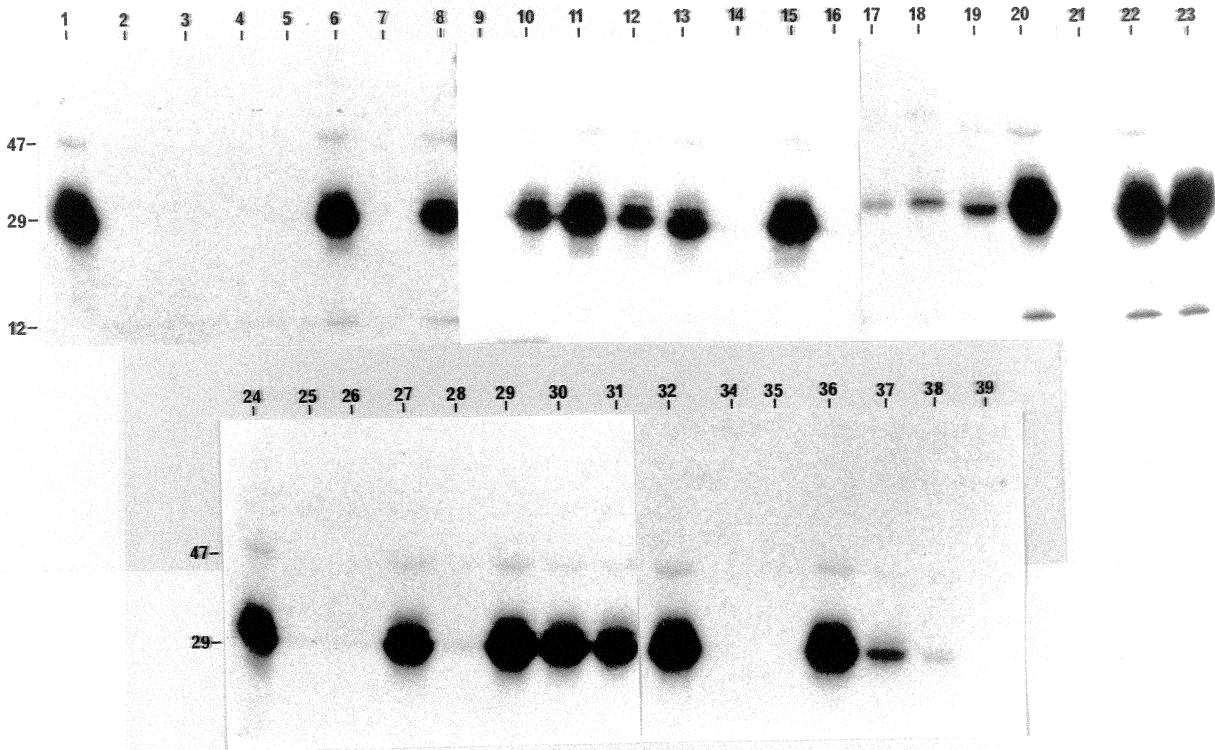
**Immunoprécipitation d'un triplet de protéases à sérine de 27, 29, et 30 kD, en plus d'une protéase de 47 kD chez les neutrophiles et les cellules mononucléées du sang périphérique.**

Nous avons également utilisé des neutrophiles et des cellules mononucléées du sang périphérique comme source d'antigènes radio-marqués avec le  $^3\text{H}$ -DFP. Pour établir s'il s'agissait d'une protéase pouvant être excrétée du neutrophile par le peptide chemoattractant fMLP (Goldschmeding R. et al., 1989b), nous avons traité une partie des neutrophiles avec de la cytochalasineB et une autre partie avec de la cytochalasineB en plus du peptide fMLP. Les surnageants des cellules ont été radio-marqués au  $^3\text{H}$ -DFP et immunoprécipités. Les cANCA's ciblent une protéase à sérine de 29 kD qui est excrétée par l'addition du peptide fMLP (figure 5A, pistes 2 et 4). Les protéines ont été extraites des cellules traitées, radio-marquées par le  $^3\text{H}$ -DFP, pour être ensuite immunoprécipitées. On peut observer après une longue exposition des autoradiogrammes une protéine de 47 kD en plus d'une protéine majeure de 29 kD (pistes 1 et 3). Les deux protéines de 29 et 47 kD peuvent être également détectées chez les cellules mononucléées (piste 5). De très longues expositions des autoradiogrammes n'ont pu permettre la détection de la protéine de 47 kD dans le surnageant des cellules (pistes 2, 4), ni dans les protéines des cellules traitées comme en 1 et 5 mais immunoprécipitées avec un sérum d'humain normal (piste 6, 7). Aucune protéine de 70 kD n'a été observée comme dans les cellules HL60.





**Figure 5A.** Immunoprécipitations d'une protéase à sérine de 29 kD et d'une composante mineure de 47 kD dans les neutrophiles et les cellules mononucléées. Des neutrophiles ont été traités avec de la cytochalasineB seulement (pistes 1, 2, 6) et avec de la cytochlasin B supplémentée du peptide chemoattractant fMLP (pistes 3, 4). Les surnageants (pistes 2, 4) des cellules ont été recueillis et les fractions de cellules extraites de leurs protéines (pistes 1, 3, 6). Un extrait de cellules mononucléées a aussi été utilisé (pistes 5, 7). Ces sources d'antigènes ont été radio-marquées au  $^3\text{H}$ -DFP et immunoprécipitées avec un sérum cANCA humain (pistes 1-5) et un sérum d'humain normal (pistes 6-7). La photo du haut représente l'autoradiogramme après 5 jours d'exposition alors que celle du bas représente une exposition de 12 jours.



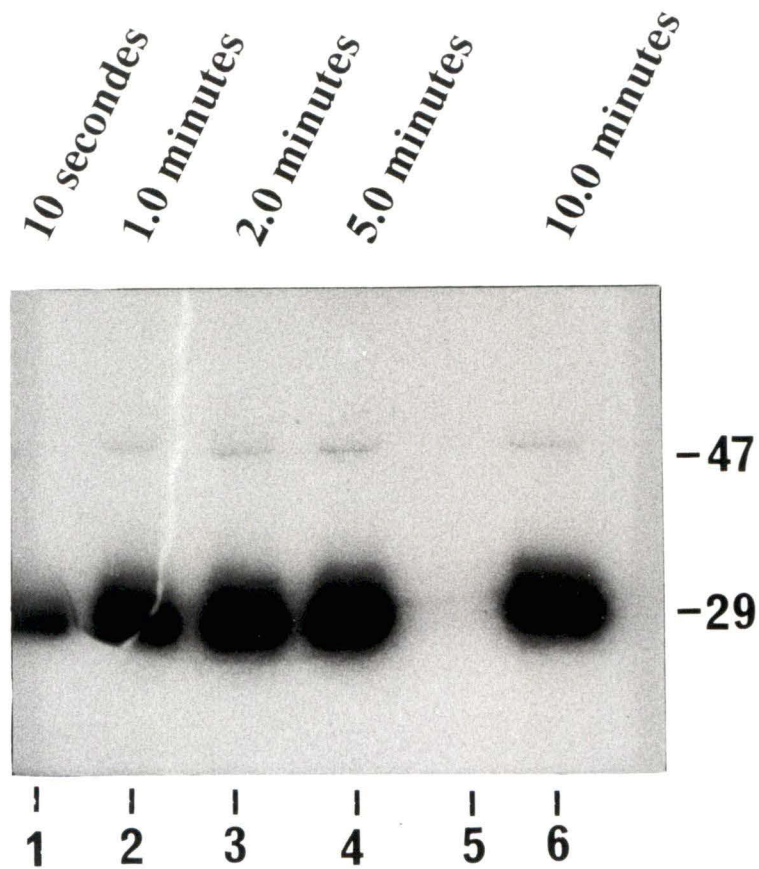
**Figure 5B.** Immunoprécipitations des protéases à sérine de 29 et 47 kD avec les sera de 36 patients atteints de la granulomatose de Wegener ainsi qu'avec un anticorps monoclonal anti-myéloblastine (12.8). Les sera de 36 patients (sous traitement ou non) ont été utilisés pour immunoprécipiter un extrait de neutrophiles radio-marqué au  $^3\text{H}$ -DFP. Le poids moléculaire des protéines immunoprécipitées sont indiqués à gauche. L'anticorps monoclonal 12.8 a été utilisé pour immunoprécipiter une protéine dénaturée avec du SDS 1% (piste 17) ou native (piste 18). Un sérum d'humain normal est représenté à la piste 39.

La totalité des sera cANCA de patients atteints de la granulomatose de Wegener (36 patients différents) ont servi à l'immunoprécipitation d'un extrait de neutrophiles radio-marqué avec du  $^3\text{H}$ -DFP. La grande majorité des sera positifs en IIF sur neutrophiles, le sont également en immunoprécipitation (figure 5B). On peut observer que, par rapport aux cellules HL60, desquelles on peut immunoprécipiter un bande large aux environs de 30 kD, les neutrophiles permettent d'immunoprécipiter un triplet de bande protéique définie de 27 kD, 29 kD, et de 30 kD (Goldschmeding R. et al., 1989b; Rao N.V. et al., 1990). Les protéines de ces deux types de cellules sont extraites de la même manière (voir méthodes), suggérant une modification unique de la protéine dans les cellules HL60. Tous les sera forts en immunoprécipitation du triplet de protéines à 29 kD, sont capables d'immunoprécipiter une protéine liant le  $^3\text{H}$ -DFP à 47 kD, incluant l'anticorps monoclonal 12.8. Nous avons également observé que certains sera sont capables d'immunoprécipiter un antigène présumément dégradé, migrant à 12 kD. Finalement, on peut observer que la préparation d'anticorps monoclonaux 12.8 n'immunoprécipite pas la forme de 27 kD (pistes 17-18) qui au contraire, est la forme que les sera cANCA humains reconnaissent le plus. Finalement, l'anticorps monoclonal reconnaît bien une myéloblastine qui a été dénaturée dans du SDS 1% (piste 17), suggérant qu'il cible un déterminant linéaire.

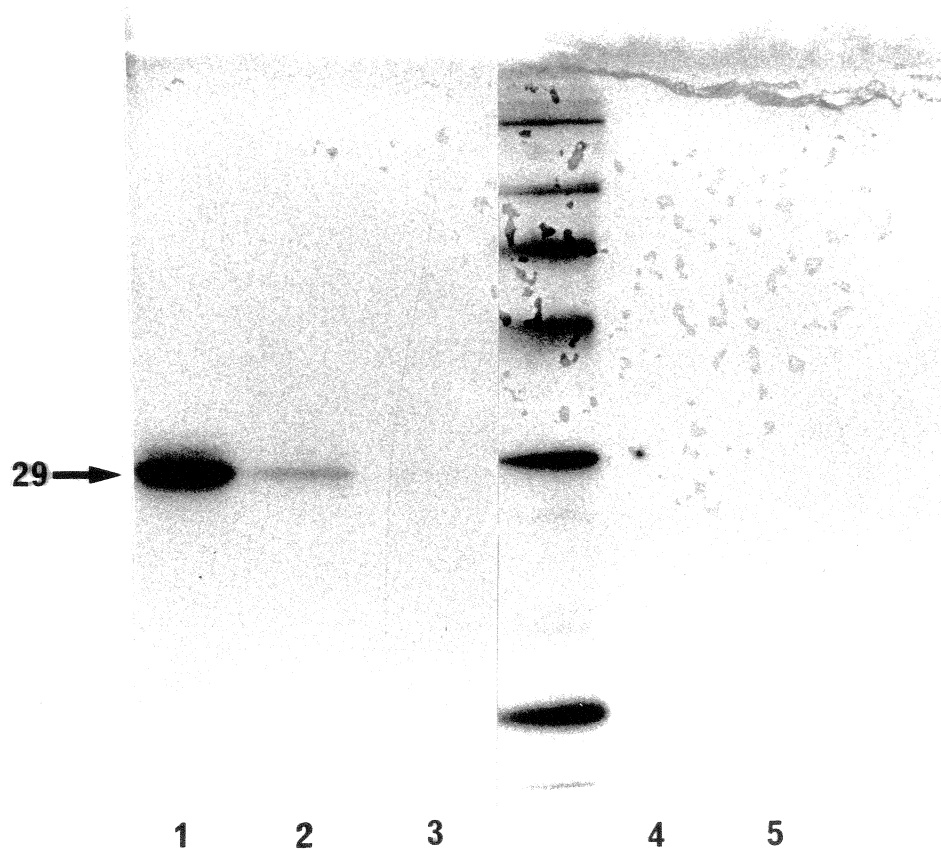
**Les IgGs cANCA ciblent avec une très bonne affinité apparente, une protéase à sérine majeure des neutrophiles.**

Afin d'évaluer l'affinité apparente des IgGs cANCA pour leurs antigènes de 29 et 47 kD, nous avons décidé d'incuber un excès d'antigènes à des temps différents, variant de 10 secondes à 10 minutes. La figure 6 nous montre qu'il est encore possible d'immunoprécipiter l'antigène à des temps aussi petits que 10 secondes. Le but de cette expérience n'est pas de déterminer une constante d'affinité mais plutôt d'établir une affinité apparente de(s) l'anticorps pour un excès d'antigènes. A l'aide d'une longue exposition de





**Figure 6. Rapidité de l'immunoprécipitation avec un sérum cANCA humain.** Une immunoprécipitation a été faite avec un sérum cANCA humain et l'antigène (extrait de neutrophiles radio-marqué au  $^3\text{H}$ -DFP) a été incubé à différents temps pour déterminer la rapidité de liaison d'un excès d'antigène. Les pistes 1 à 4 montrent une incubation de 0.1, 1.0, 2.0 et 5.0 minutes avec un sérum cANCA. Les pistes 5 et 6 montrent une incubation de 10 minutes avec un sérum d'humain normal et un sérum cANCA. La position des antigènes est indiquée à droite.



**Figure 7. Immunodéplétion de l'autoantigène des cANCAs d'un extrait de neutrophiles** Un extrait de  $4 \cdot 10^6$  neutrophiles, radio-marqué au  $^3\text{H}$ -DFP, a été complètement immunodéplété de l'antigène ciblé par les cANCAs. Les billes ayant servi à l'immunodéplétion ont été lavées et comptées pour évaluer la quantité d'antigène dans l'extrait de protéases à sérine. Les pistes de 1 à 5 représentent l'antigène immunoprécipité à partir de l'extrait, à chaque étape de l'immunodéplétion. Les comptes obtenus de chaque immunoprécipitation totalisent 25 000 CPM. Les comptes d'une précipitation au TCA totalisent 75 000 CPM. On peut calculer que l'antigène constitue 33% des protéases à sérine du neutrophile.

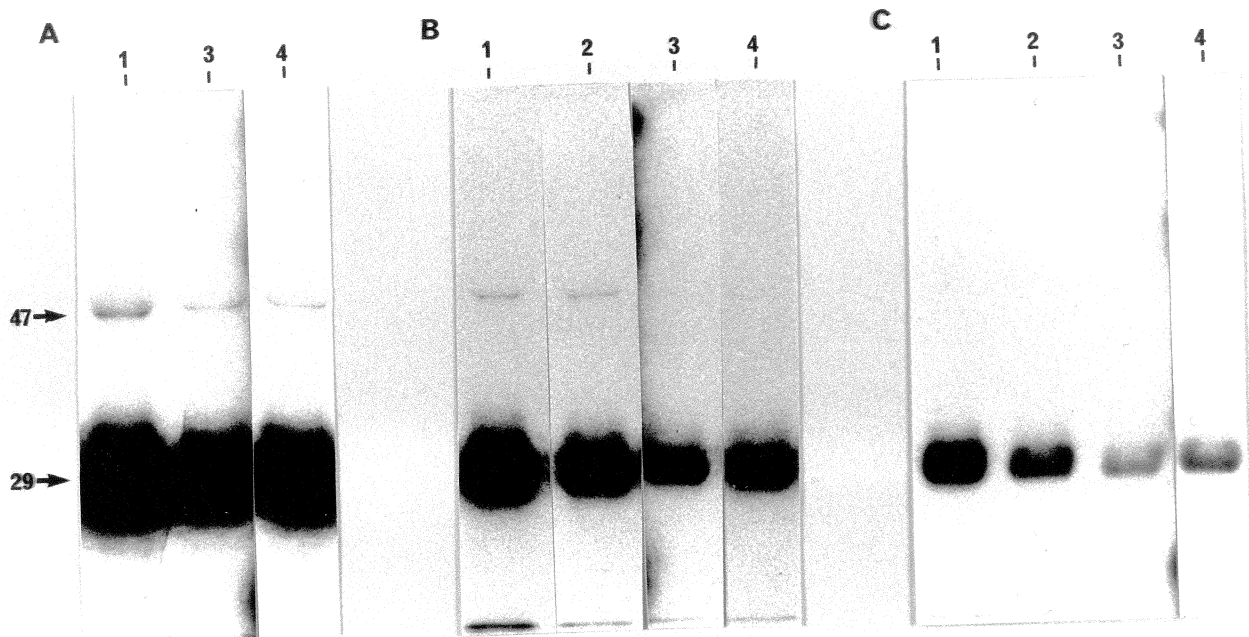
l'autoradiogramme, nous avons aussi détecté l'antigène de 47 kD, à des temps d'incubation de 1.0 minute et plus.

Les neutrophiles sont une source de protéases à sérine connues, soit la cathepsine G (PR1), l'élastase (PR2) et l'antigène des cANCA (PR3) (Goldschmeding R. et al., 1989b). En utilisant le DFP qui peut uniquement se lier aux protéases à sérine, nous avons complètement immunodéplété à l'aide d'un sérum cANCA, un extrait de neutrophiles radio-marqués au  $^3\text{H}$ -DFP, dans le but d'évaluer la quantité d'antigène recueillie lors de l'épuisement de l'extrait. La Figure 7 nous montre que l'immunodéplétion de l'antigène des cANCA dans l'extrait est complète, parce qu'il devient impossible d'immunoprécipiter l'antigène (figure 7, pistes 4-5). La quantité de radioactivité spécifique recueillie par les sera cANCA lors de l'immunodéplétion a été mesurée. Nous avons obtenu 25 000 CPM pour l'antigène par rapport à 75 000 CPM précipitées au TCA dans l'extrait initial. Chaque protéase ne pouvant lier qu'une molécule de DFP, nous en déduisons que 33% des protéases à sérine du neutrophile constituent l'antigène des cANCA.

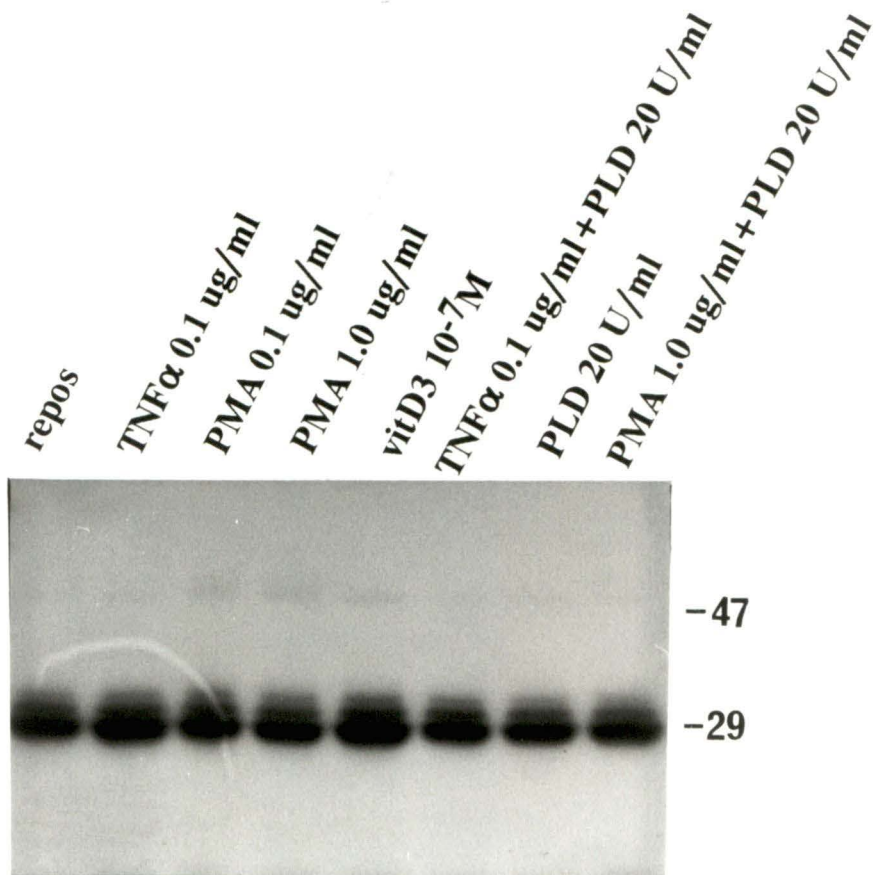
### **Régulation cellulaire de la forme p47 de la myéloblastine.**

Des neutrophiles traités avec du  $\text{TNF}\alpha$  ou du PMA vident le contenu de leur granules dans le surnageant cellulaire. Nous avons voulu déterminer si une excrétion de neutrophiles ou de cellules mononucléées pouvait entraîner les deux formes de la Mbn, soit celle de 29 kD et de 47 kD. Des cellules ont été traitées avec du PMA et du  $\text{TNF}\alpha$  à des doses connues pour activer les cellules (Falk R.J. et al., 1990). Les extraits de cellules et les surnageants cellulaires ont été radio-marqués au  $^3\text{H}$ -DFP et immunoprécipités à l'aide d'un sérum cANCA humain. La figure 11 nous montre en B et C que le PMA (pistes 1-2) et le  $\text{TNF}\alpha$  (piste 4) induisent l'excrétion dans le surnageant d'une forme libre de 29 kD. Cependant, le PMA induit aussi l'apparition de la forme de 47 kD, cet effet n'étant pas reproduit par le  $\text{TNF}\alpha$ . Les extraits cellulaires (A) montrent le même phénomène, c'est à dire que le PMA





**Figure 8. Régulation cellulaire de la formation de la myéloblastine de 47 kD chez les neutrophiles.** Immunoprécipitations de l'autoantigène des cANCA dans les neutrophiles (A) ou dans les surnageants cellulaires de neutrophiles (B et C) à l'aide d'un sérum cANCA humain et d'un radio-marquage des protéases avec le  $^3\text{H}$ -DFP. Les autoradiogrammes ont été développés après 12 (A et B) ou 5 jours (C). Les neutrophiles ont été traités avec du PMA à 1.0 ug/ml (piste 1) ou 0.1 ug/ml (piste 2), laissés au repos dans le PBS (piste 3), ou activés avec du TNF $\alpha$  à 10 ng/ml (piste 4).



**Figure 9. Inhibition de l'induction de p47 par le PMA, à l'aide d'une phospholipase D exogène.** Des neutrophiles ont été traités à l'aide des réactifs suivants pendant 15 minutes à 37°C. Les protéines extraites de ces cellules ont été radiomarquées à l'aide du <sup>3</sup>H-DFP et immunoprécipitées avec un sérum cANCA humain. Les protéases à sérine de 29 et 47 kD sont indiquées à droite.

(piste 1) induit de façon préférentielle la formation de la forme de 47 kD au niveau cellulaire. Ces expériences suggèrent que la protéine de 47 kD, comme celle de 29 kD, est relâchée dans le surnageant lors de la dégranulation. Aussi, seulement le PMA semble induire au niveau cellulaire la formation de la forme de 47 kD.

Nous avons voulu vérifier si l'addition d'une phospholipase D (PLD) exogène pouvait inhiber la formation de la protéine p47 kD, normalement activée par le PMA. L'objectif était de déterminer si la formation de la protéine de 47 kD, ainsi que l'activation par le PMA sont régulées par un événement membranaire impliquant des phospholipides sur le feuillet extérieur de la membrane. Nous avons observé que l'addition de PLD empêchait la formation de la protéine de 47 kD, normalement induite lors d'une induction au PMA (figure 9). Nous avons également noté que l'activation des cellules est bloquée par ce prétraitement (pas de dégranulation, résultats absents).

#### **Analyse des protéines de surface.**

A l'aide de l'immunomicroscopie électronique, il a été suggéré qu'une partie de la Mbn cellulaire était exprimée à la surface des neutrophiles et des monocytes (Csernok E. et al., 1990). Pour ce faire, il faudrait que cette protéine soit modifiée post-traductionnellement car sa séquence polypeptidique ne code pas pour une région transmembranaire pouvant expliquer son ancrage dans la membrane. Nous avons donc voulu faire la démonstration en utilisant la cytofluorométrie et l'anticorps monoclonal 12.8 qu'il y avait vraiment expression à la surface. La figure 14 nous permet d'observer qu'il y a une fluorescence positive émise par l'anticorps 12.8 à la surface des neutrophiles et des cellules HL60 (B et D).

Nous avons voulu ensuite étudier la régulation de cette expression de surface à l'aide de cytokine et du PMA, deux agents contrôlant la dégranulation des neutrophiles (Falk R.J. et Jennette J.C., 1990). Le tableau 1 nous montre les résultats d'expression de

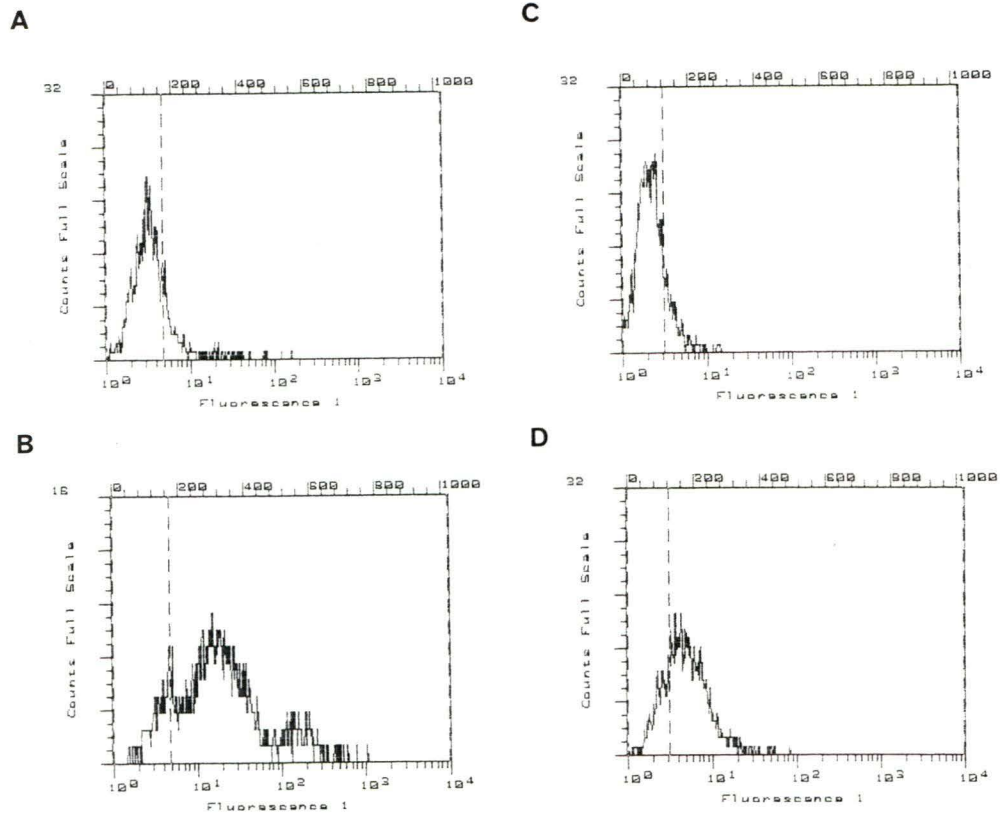


surface obtenus après les différents traitements des cellules. L'expression basale de la Mbn peut être augmentée par un traitement au  $TNF\alpha$ , suggérant qu'une dégranulation entraîne une plus grande quantité de la protéine à la surface cellulaire. Ceci est une indication que la protéine est exprimée à la surface intérieure des granules azurophiles. Chez la cellule HL60, le PMA reproduit le même phénomène, alors que sur le neutrophile, il entraîne une diminution de l'expression de surface. Pourtant, les expériences d'immunoprécipitation des surnageants des neutrophiles nous montrent qu'il y a une très forte activation par le PMA (figure 8C, pistes 1-2). Cette expérience ayant été répétée à deux reprises avec le même résultat, nous en concluons que le PMA induit un phénomène rapide (traitement de 15 minutes) de diminution de l'expression de surface chez le neutrophile. Ce phénomène peut être expliqué par une internalisation de la protéine ou par le relâchement d'une forme tronquée de la protéine membranaire.

#### **Immunoprécipitation de protéines phosphorylées dans les cellules HL60 avec un sérum cANCA.**

Les données accumulées sur les modifications de la Mbn nous laissent conclure que cette protéine est exprimée à la surface des cellules. Pour ce faire, elle doit subir une modification post-traductionnelle, car sa séquence primaire ne contient pas de domaine transmembranaire. D'une part, nous avons observé une forme de Mbn de 47 kD induite par le PMA, et d'autre part qu'une préincubation des cellules avec de la phospholipase D inhibe l'activation par le PMA ainsi que l'apparition de la forme de 47 kD, suggérant un événement membranaire dans la formation de cette protéine de 47 kD. De plus on peut retrouver cette forme de 47 kD dans le surnageant cellulaire, suggérant que cette forme est relâchée par la cellule. Or, le PMA induit chez le neutrophile, la disparition de la protéine à la membrane des neutrophiles. Il a été récemment décrit qu'un nombre croissant de protéines sont ancrées dans la membrane grâce à l'addition d'un groupement glycosyl-

phosphoinositol ou GPI (Cross G.A.M. et al., 1987; Ferguson M.A.J. et al., 1988; Low M.G. et Saliel A.R., 1988).



**Figure 10. Démonstration de l'expression de surface de la myéloblastine sur les cellules HL60 et les neutrophiles.** Des neutrophiles (A et B) ou des cellules HL60 (C et D) ont été utilisés pour une expérience de cytofluorométrie. Les images A et C représentent deux expériences témoins sans l'anticorps primaire, alors que les images B et D montrent la fluorescence émise des cellules incubées avec l'anticorps primaire 12.8. En C et D, des cellules HL60 traitées avec du rTNF $\alpha$  (10 ng/ml) sont représentées, pour clairement démontrer la fluorescence positive, alors que des neutrophiles au repos sont montrés en A et B.



Traitements des cellules	% de fluorescence positive
1) Neutrophiles au repos	62.3
2) Neutrophiles + TNF $\alpha$ à 10 ng/ml	85.7
3) Neutrophiles + PMA à 0.1 ug/ml	38.7
4) Neutrophiles + PMA à 1.0 ug/ml	36.8
5) HL60 au repos	28.0
6) HL60 + TNF $\alpha$ à 10ng/ml	60.0
7) HL60 + TNF $\alpha$ à 100 ng/ml	57.6
8) HL60 + PMA à 0.1 ug/ml	59.4
9) HL60 + PMA à 1.0 ug/ml	57.7

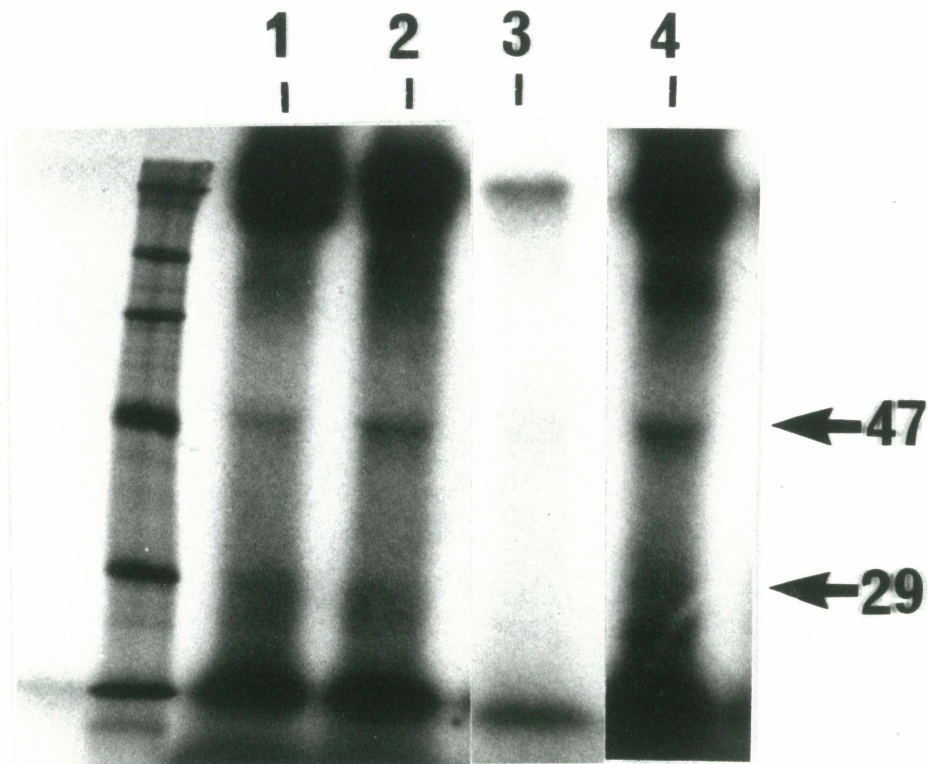
**Tableau 1. Régulation de l'expression de surface de la myéloblastine.** Des neutrophiles et des cellules HL60 ont été traités comme décrit dans le tableau, et analysés pour l'expression de surface de la myéloblastine à l'aide de la technique de cytofluorométrie et de l'anticorps monoclonal 12.8. Les résultats sont exprimés en % de fluorescence positive, et représentent la fluorescence de l'anticorps 12.8 dont on a soustrait la fluorescence de l'expérience témoin.

1988). Une caractéristique de ces protéines est que leur forme membranaire et que leur forme tronquée (via une hydrolyse par la PLC) ont une molécule de phosphate intégrée (Low M.G. et Saltiel A.R., 1988).

Pour déterminer si la Mbn partage cette caractéristique de structure avec ces protéines de surface, nous avons radio-marqué des cellules HL60 avec du  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate et nous avons immunoprécipité les phosphoprotéines à l'aide d'un sérum cANCA. La figure 11 nous permet d'observer des protéines de 29 kD et de 47 kD immunoprécipitées (piste 1). De plus, un marquage en présence de PMA semble augmenter la présence de la protéine de 47 kD (piste 2), alors que le cycloheximide bloque l'addition de phosphate radioactif à la Mbn (piste 3). Un marquage en présence de FBS à 20% augmente le marquage des deux formes (piste 4) par rapport au marquage avec du FBS à 10%. Ces résultats suggèrent que les formes de Mbn de 29 kD et de 47 kD, peuvent intégrer du phosphate, comme les protéines liées à des groupements GPI.

#### **Traitement de la myéloblastine avec de la phosphatase alcaline.**

Pour déterminer si la migration à 47 kD pouvait être due à une molécule de phosphate libre, nous avons traité une préparation de Mbn immunoprécipitée avec de la phosphatase alcaline. Sur la figure 12, on peut observer que le traitement à la phosphatase alcaline élimine la bande de 47 kD (piste 2) par rapport à la Mbn non-traitée (piste 3). Ce traitement suggère que la forme de 47 kD pourrait contenir un ester de phosphate monovalent responsable de la migration apparente à 47 kD.



**Figure 11.** Immunoprécipitation à l'aide d'un sérum cANCA d'extraits de cellules HL60 radio-marquées avec du  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate. Des cellules HL60 ont été radio-marquées *in vivo* à l'aide du  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate et les protéines solubles immunoprécipitées avec un sérum cANCA humain. Les cellules ont été radio-marquées en présence de FBS à 10% (pistes 1-3), de PMA 107 nM (pistes 2-3), de cycloheximide 10 ug/ml (piste 3), et de FBS à 20% (piste 4). Les protéines immunoprécipitées ont un poids moléculaire de 29 et 47 kD.

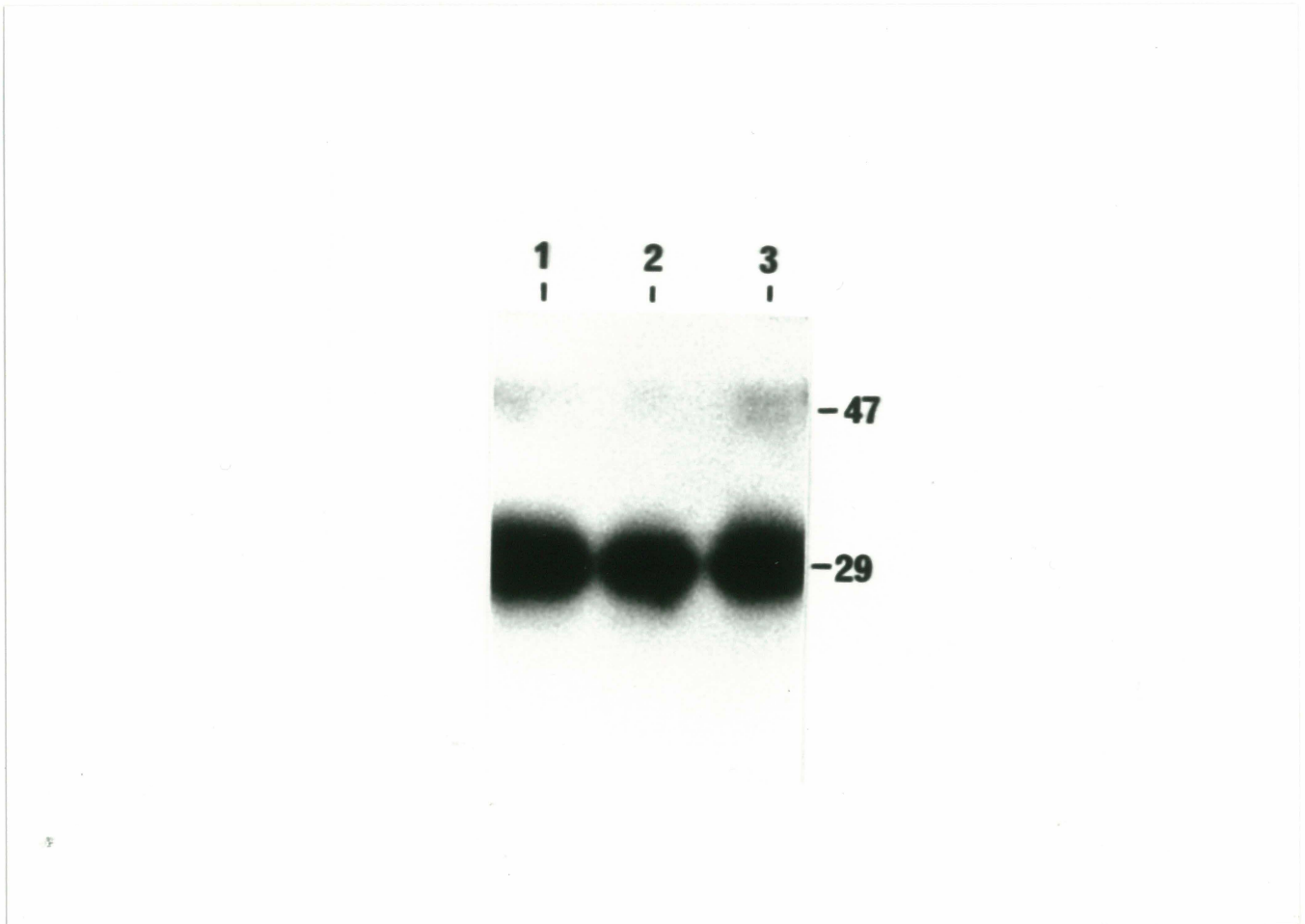


**Immunoprécipitations de la myéloblastine avec 29 sera d'une patiente, accumulés sur une période de deux ans.**

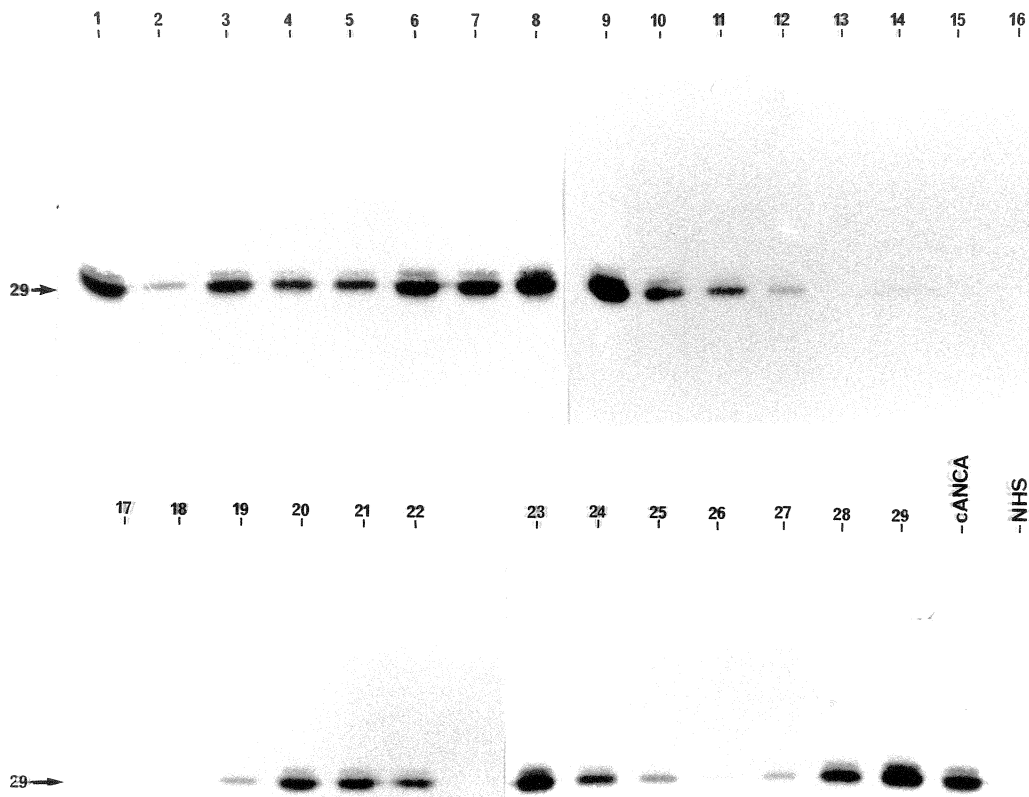
Les 29 sera accumulés d'une patiente ont été utilisés en immunoprécipitation d'un extrait de neutrophiles radio-marqué à l'aide du  $^3\text{H}$ -DFP. La figure 13 nous montre que le titre des anticorps anti-myéloblastine des 29 sera accumulés à des intervalles réguliers sur une période de 2 ans, peut diminuer en fonction du traitement subi par la patiente (pistes 2, 12-18, 25-26) et augmenter pour des raisons inconnues (pistes 3-9, 20-23, 27-29).

**Immunoprécipitations de petits polypeptides liant le DFP à l'aide d'une sérum cANCA.**

Le sérum no.1 sur la figure 13 est capable d'immunoprécipiter des polypeptides de 12 et 7.5 kD (figure 14). Les immunoprécipitations de ces polypeptides semblent être spécifiques (pistes 5-8) parce qu'un sérum d'humain normal ne les ciblent pas (pistes 1-4). Ces petits polypeptides sont présumément de la myéloblastine dégradée, car ce sérum réagit uniquement contre la Mbn en immunoprécipitation de protéines radiomarquées à la méthionine- $^{35}\text{S}$  et n'a pas d'anticorps anti-élastase. L'immunoprécipitation de ces petits polypeptides semble être favorisée par la présence de détergents forts utilisés lors de l'extraction des protéines (déoxycholate à 0.5%, le NP40 à 1.0%, et le SDS à 0.1%) (pistes 6, 8).

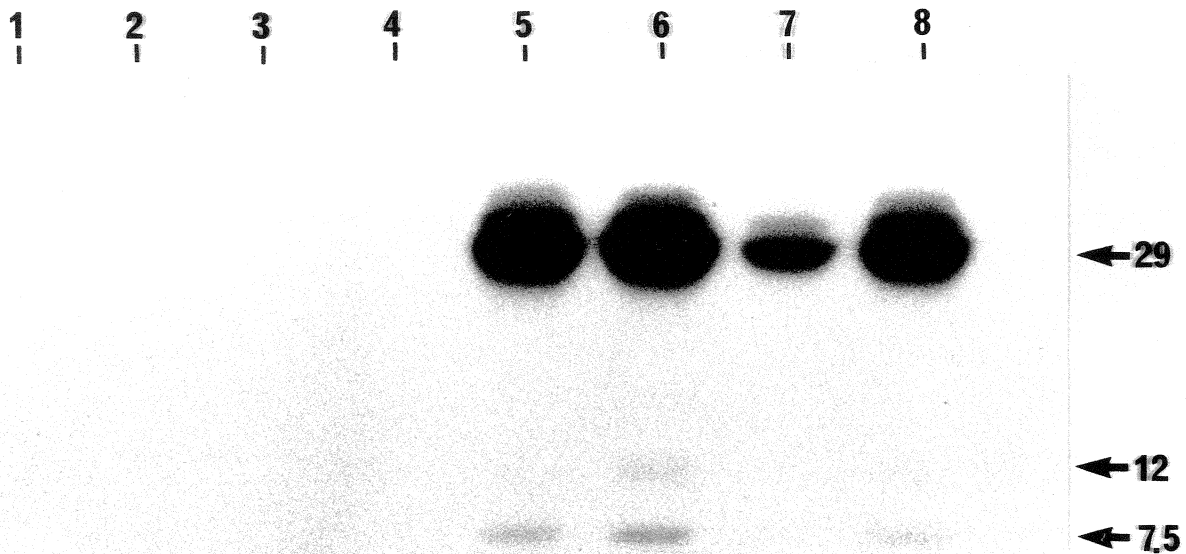


**Figure 12.** Élimination de la protéine p47 kD par un traitement à la phosphatase alcaline. Une immunoprécipitation avec un sérum cANCA humain d'un extrait de neutrophiles radio-marqué avec le  $^3\text{H}$ -DFP, a été traité à la phosphatase alcaline dans un tampon à pH 7.4 (piste 1), pH 10.0 (piste 2) ou sans phosphatase alcaline mais à pH 10.0 (piste 3). Les protéines ont été analysées sur un gel de polyacrylamide (SDS) de 12%.



**Figure 13.** Variation du titre des anticorps anti-myéloblastine d'une patiente atteinte de la granulomatose de Wegener, au cours d'une période de 2 ans. Les 29 sera accumulés de cette patiente (S.O.) ont été utilisés pour immunoprécipiter un extrait de neutrophiles radio-marqué à l'aide du  $^3\text{H}$ -DFP. La protéine de 29 kD est indiquée à gauche de l'image. Des immunoprécipitations à l'aide d'un sérum cANCA caractérisé et d'un sérum d'humain normal (NHS) sont montrées sur la photo du bas.

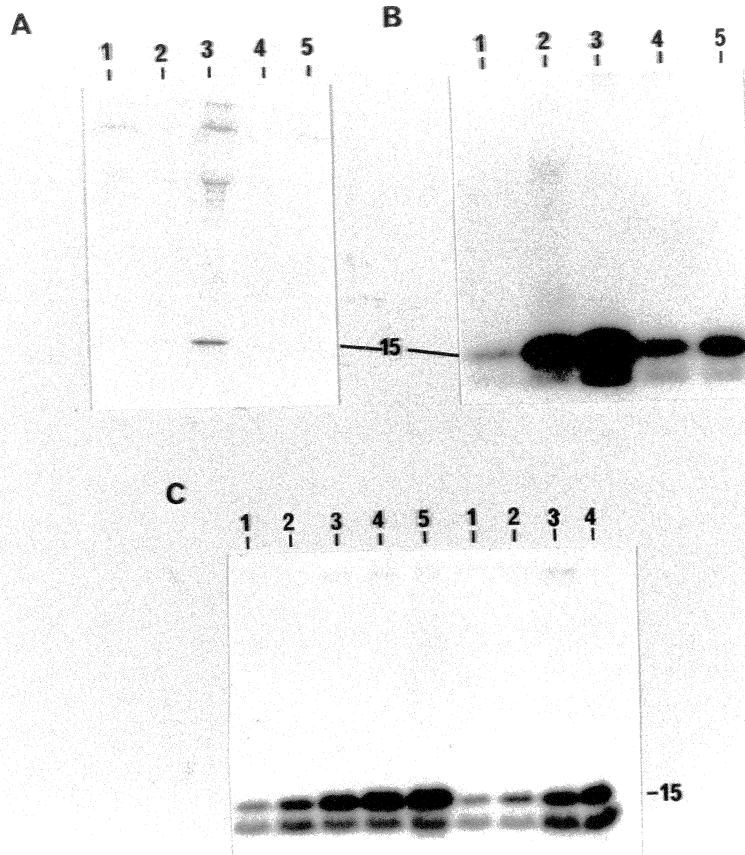




**Figure 14.** Immunoprécipitation par un sérum cANCA (S.O.) de petits polypeptides de la myéloblastine. Des extraits de cellules mononucléées (pistes 1-2, 5-6) et de neutrophiles (pistes 3-4, 7-8) ont été radio-marqués avec le  $^3\text{H}$ -DFP et immunoprécipités à l'aide d'un sérum d'humain normal (pistes 1-4) et du sérum cANCA de S.O. (pistes 5-8). Une partie des antigènes a été traitée avec un cocktail de détergents (pistes 2, 4, 6, 8) et l'autre sans détergents (pistes 1, 3, 5, 7). Des polypeptides de 7.5 kD et de 12.0 kD, liés au  $^3\text{H}$ -DFP, sont immunoprécipités en plus de la protéine de 29 kD.

## **Caractérisation d'une phosphoprotéine de Staphylococcus aureus immunoprécipitée par un sérum cANCA.**

Le sérum no. 1 de la figure 13, qui est capable d'immunoprécipiter un antigène dégradé de 7.5 kD (figure 14), est aussi capable d'identifier une protéine de 15 kD de S.aureus. Les bactéries ont été traitées par différents sucres, radio-marquées par la  $^{35}\text{S}$ -méthionine, et les protéines immunoprécipitées. Cette protéine semble être spécifiquement exprimée lorsqu'il y a induction par le mannitol (figure 15A, piste 3). La même protéine de 15 kD semble être également phosphorylée, car un radio-marquage des bactéries avec du  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate, suivie d'une immunoprécipitation des protéines phosphorylées, nous permet d'observer la même protéine. La phosphorylation de cette protéine semble être à son maximum dans un milieu contenant du glucose et du glucose-mannitol. Pour déterminer si l'anticorps immunoprécipitant cette protéine, est un anticorps anti-myéloblastine, nous avons inhibé l'immunoprécipitation de la phosphoprotéine de 15 kD en préincubant les anticorps avec un extrait de granules de cellules HL60. le sérum utilisé a été caractérisé comme n'ayant que des anticorps anti-myéloblastine (monospécifique anti-Mbn) et aucun autre anticorps contre d'autres protéines de cette cellule (voir figure 3, piste 7). Sur la figure 15, la piste 5 représente l'immunoprécipitation non-inhibée de la phosphoprotéine, alors que les pistes 2-4 montrent les résultats de l'inhibition avec 50, 25 et 10 ul de la préparation de de myéloblastine semi-purifiée. Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-myéloblastine de ce sérum sont capables d'immunoprécipiter par réaction croisée une phosphoprotéine de 15 kD, induite par le mannitol chez S.aureus.



**Figure 15. Caractérisation d'une phosphoprotéine de 15 kD de *Staphylococcus aureus*, induite par le mannitol et immunoprécipitée par un sérum cANCA de S.O.** En A, les bactéries *S.aureus* ont été induites par différents sucres (concentration finale 1%) avant d'être radio-marquées avec de la  $^{35}\text{S}$ -méthionine. Les bactéries ont été induites par le glucose (piste 1), le glycérol (piste 2), le mannitol (piste 3), le mannitol-glycérol (piste 4), et le mannitol-glucose (piste 5). Les protéines extraites ont été immunoprécipitées par un sérum cANCA de S.O. En B, les bactéries ont été induites avec le mannitol et radio-marquées avec du  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate. Le radio-marquage a été fait avec un milieu minimum sans sucres (piste 1), ou contenant du glucose (piste 2), du glucose-mannitol (piste 3), du mannitol (piste 4), et du glycérol (piste 5). Les protéines extraites ont été immunoprécipitées. En C, les IgGs immobilisées sur les billes ont été préincubées avec des extraits de granules primaires non-radioactifs de cellules HL60 avant d'être incubées avec les antigènes phosphorylés (induction avec le glucose-mannitol) de *S.aureus*. En piste 5, on montre la réactivité d'un sérum sans inhibiteurs par rapports à un sérum d'humain normal (pistes 1). Dans les pistes 2-4 (duplicata), nous montrons l'inhibition obtenue avec 50, 25, et 10 ul de la préparation de granules primaires de cellules HL60.



## Discussion

Les ANCAs sont des anticorps ciblant des constituants du cytoplasme des neutrophiles, des monocytes, et des cellules HL60. Ces différents types d'anticorps, découverts par l'immunofluorescence indirecte, peuvent donner un type de fluorescence spécifique à l'observation d'un antigène donné. C'est ainsi qu'avec un sérum cANCA, on peut détecter une fluorescence cytoplasmique, alors qu'on détecte une fluorescence périnucléaire avec un sérum pANCA. Les aANCAs ont été découverts par leur fluorescence différente ou dite atypique.

**Les ANCAs sont différents types d'anticorps ciblant des protéines du cytoplasme des neutrophiles et des cellules HL60.**

Afin de déterminer quels sont les protéines ciblées par ces anticorps, des immunoprécipitations ont été faites en utilisant ces séras et des protéines radio-marquées métaboliquement par de la méthionine et de la cystéine radioactive. Les cANCAs semblent cibler davantage une protéine de 30 kD des cellules HL60, alors que les pANCAs ciblent une protéine de 69 kD et de 40 kD, que l'on associe au poids moléculaire de la myéloperoxydase dans cette lignée cellulaire. Les aANCAs ciblent une protéine de 40 kD seulement, quoique l'immunoprécipitation de cette protéine peut être observée en même temps que celle de 30 kD ou de 40 kD. La nature des antigènes des aANCAs reste à être élucidée. Ces résultats impliquent qu'il peut y avoir plusieurs autoanticorps ANCAs dans un même sérum. Mon projet de maîtrise étant axé sur l'antigène des cANCAs de 30 kD, j'ai tenté de trouver un sérum monospécifique avec un anticorps anti-protéine de 30 kD. La figure 3 (piste 7) montre un exemple d'un sérum cANCA ne pouvant immunoprécipiter qu'une protéine de 30 kD.

**Les IgGs de sera cANCA ciblent chez les cellules HL60, les neutrophiles et les cellules mononucléées, une protéase à sérine de 29 kD en plus d'une protéase de 47 kD.**

Nous avons mis au point une technique d'immunoprécipitation qui nous permet de détecter facilement et de façon très sensible des autoanticorps ciblant une protéase à sérine des cellules HL60, des neutrophiles, et des cellules mononucléées. Il s'agit de radio-marquer seulement les protéases à sérine avec un inhibiteur tritié et d'immunoprécipiter ces protéases avec des sera cANCA. Cette technique est très sensible car, quelques sera qui étaient négatifs par la technique d'immunofluorescence indirecte, ont pu être confirmés comme étant des cANCA (un anticorps contre une protéase de 29 kD) à l'aide de l'immunoprécipitation. Cette technique nous a permis de confirmer l'effet de facteurs pouvant provoquer l'excrétion de l'antigène dans le surnageant cellulaire des neutrophiles, comme le peptide fMLP, le  $TNF\alpha$ , et le PMA (Goldschmeding R., 1992; Falk R.J. et Jennette J.C., 1990). Nous avons aussi pu mettre au point des conditions d'immunoprécipitation permettant d'observer les aspects semi-quantitatifs de ces activations.

A l'aide de très longues expositions des autoradiogrammes (de 5 à 12 jours), nous avons détecté une protéine immunoprécipitée, liant le  $^3H$ -DFP, et avec un poids moléculaire apparent de 47 kD. Cette protéase de 47 kD a été détectée dans les cellules HL60, mais en très faible quantité. Les principales sources de cette protéase de 47 kD sont les neutrophiles et les cellules mononucléées, où l'on peut l'observer plus rapidement. L'on détecte très faiblement une protéase avec un poids moléculaire de 70 kD par immunoprécipitation dans les cellules HL60, cependant cette observation est demeurée unique à ces cellules et la quantité de cette protéine semble très faible. Donc, nous n'avons pu caractériser cet antigène.



Les données publiées sur l'identification de l'autoantigène des cANCA nous révèlent qu'il possède une séquence N-terminale presque identique à celle de la myéloblastine (voir figure 1). Le gène de la myéloblastine code pour une protéase à sérine de 29 kD, qui est régulée de façon identique avec l'antigène des cANCA. Ceci nous confirme que l'antigène des cANCA, aussi nommé la protéinase 3, est la myéloblastine. Un problème reste à expliquer: quel est la protéine de 47 kD? Le seul fait que tous les sera cANCA avec de hauts titres des patients atteints de la granulomatose de Wegener ciblent cette protéine de 47 kD, suggère que cette protéine est la Mbn. De plus, cette protéine lie le <sup>3</sup>H-DFP et est reconnue par l'anticorps monoclonal anti-PR3/Mbn. Donc, cette protéine possède plusieurs caractéristique de la Mbn.

Le gène de la myéloblastine code pour une protéine dont le poids moléculaire prédit est de 27 kD. Il est cependant connu que cette protéine possède des sites de glycosylation et que la protéine est sensible à la N-glycanase; donc, c'est par la glycosylation qu'on explique le poids moléculaire de 29 kD. Toutefois, il n'y a pas d'explications pour expliquer un poids moléculaire apparent de 47 kD. A partir des faits connus, je propose deux hypothèses expliquant une forme de 47 kD: par la modification du messager ou du polypeptide de la Mbn. Ainsi, il pourrait y avoir un ou plusieurs exons supplémentaires qui feraient partie d'un transcrit plus rare (la forme de 47 kD est beaucoup plus rare que celle de 29 kD). La traduction de ces exons supplémentaires pourrait augmenter le poids moléculaire, coder pour un domaine liant le phosphate et permettre la liaison de l'enzyme à la membrane. Il est possible qu'un transcrit rare comportant ces exons n'est pas été détecté par clonage de l'ADNc. Toutefois, il serait possible de le détecter par la technique de RACE (rapid amplification of cDNA end) et/ou de RT-PCR. Ces techniques sont basées sur la sensibilité du PCR, et pourraient permettre d'amplifier de nouveaux exons ou de nouvelles extrémités sur l'ADNc de la myéloblastine. Les résultats que je présente dans ce mémoire suggèrent également que la protéine (codée par l'ADNc publié de la Mbn) pourrait subir des modifications post-traductionnelles: une association covalente avec une protéine

membranaire ou une modification permettant un ancrage dans la membrane plasmique. Cette modification permettrait également la liaison d'un groupement phosphate sur le polypeptide. Les résultats présentés dans ce mémoire ne permettent pas de distinguer par quel mécanisme se fait la modification vers une protéine de 47 kD. Toutefois, je présente des données expérimentales qui suggèrent fortement que la protéine de 47 kD possède une activité enzymatique et des déterminants immunologiques semblables à l'antigène de 29 kD. Donc, cette protéine serait une forme modifiée de la Mbn.

### **Le PMA favorise la formation de la forme p47 chez les neutrophiles.**

Au niveau cellulaire, nous avons également observé que le PMA peut augmenter la quantité de p47 (forme de 47 kD de la Mbn) immunoprécipitée, par rapport à un traitement des cellules au TNF $\alpha$  ou des cellules au repos. Lorsque les cellules sont activées au PMA, cette protéine se retrouve libre dans le surnageant cellulaire avec la forme de 29 kD, suggérant que p47 est une forme libre, non associée à la membrane. De plus, nous avons remarqué qu'un pré-traitement des cellules à la phospholipase D (PLD) inhibe l'activation des neutrophiles et la formation de p47 activée par le PMA. Ces expériences suggèrent que l'apparition de p47 requiert des modifications des phospholipides membranaires du feuillet extérieur de la membrane, rendant la détection de p47 sensible à la PLD. Nous croyons que le mécanisme d'inhibition par la PLD se situe au niveau pharmacologique (e.g. effet de PMA bloqué) car, ces cellules prétraitées n'étaient pas activées par le PMA (pas de dégranulation; non présenté).

**La myéloblastine est exprimée à la surface des cellules HL60 et des neutrophiles.**

Nous avons démontré, par la technique de cytofluorométrie, que la myéloblastine est exprimée à la membrane des cellules HL60 et des neutrophiles. Cette expression de surface peut augmenter par un traitement avec du TNF $\alpha$  à faible concentration. Le TNF $\alpha$  provoque une dégranulation partielle (Falk R.J. et Jennette J.C., 1990) du neutrophile. Ainsi, la myéloblastine membranaire doit être exprimée sur la membrane du granule, la protéine orientée vers la lumière du granule, pour que nous puissions observer une augmentation à la surface quand les cellules sont activées. Le PMA reproduit le même phénomène sur les cellules HL60, mais module négativement l'expression de surface sur les neutrophiles. Le PMA provoque aussi la dégranulation des neutrophiles et la libération de la myéloblastine des granules (figure 8B et C). Ainsi, s'il y a diminution spécifique de l'expression de myéloblastine membranaire chez les neutrophiles activés par le PMA (dégranulation activée), nous croyons qu'un mécanisme libérant la protéine de la membrane reste la meilleure hypothèse.

**Les formes de 29 kD et de 47 kD de la myéloblastine peuvent incorporer du  $^{32}\text{P}$ -phosphate.**

Cette expression de surface n'est pas expliquée par la séquence primaire prédite à partir de l'ADNc de la protéase, qui ne code pas pour une région transmembranaire prédite (segment continu d'acides aminés hydrophobes). De plus, la génération de la forme p47 semble impliquer une activation cellulaire par la voie de la protéine kinase C (PKC) et des phospholipides sur le côté extérieur de la membrane plasmique (inhibition par la PLD). Il a été décrit qu'un certain nombre de protéines membranaires (N-Cam, CD14, phosphatase alcaline du placenta, DAF sur les érythrocytes; voir article de revue de Low M.G. et Saltiel



A.R., 1988) sont exprimées à la surface grâce à l'addition en bloc d'un groupement glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) au COOH terminal de la protéine à la fin de la synthèse protéique dans le réticulum endoplasmique. Cette addition est bloquée par la cycloheximide, et augmentée par le FBS dans des cultures de cellules car, le FBS augmente le renouvellement des lipides. Une caractéristique particulière de ces protéines, est qu'un signal extracellulaire peut théoriquement induire (par la phospholipase C ?) une coupure du phospholipide et générer une protéine libre qui possède un phosphate, dans le surnageant extracellulaire.

Afin de déterminer s'il peut y avoir une corrélation avec un tel mécanisme, nous avons tenté l'immunoprécipitation de l'antigène des cANCA radio-marqué au  $^{32}\text{P}$ -phosphate. Nous avons réussi à immunoprécipiter une protéine de 29 kD et de 47 kD. De plus, à partir des cellules traitées au PMA, nous avons immunoprécipité davantage de la forme p47. Un marquage des cellules en présence de cycloheximide bloque l'addition de phosphate à la Mbn. Finalement, le FBS à 20% dans le milieu de culture augmente le marquage de la myéloblastine de 29 et 47 kD par rapport à 10%.

Ayant observé que le PMA induit une diminution de la Mbn à la membrane plasmique et qu'il induit l'augmentation de p47 dans le surnageant cellulaire, il est donc très probable que la forme p47 de la Mbn soit un résidu tronqué de la forme membranaire, expliquant l'effet rapide du PMA sur p47, l'effet rapide de la PLD, et la faible quantité de p47 observée lorsque nous immunoprécipitons en conditions normales. Si la forme p47 est le résultat d'une coupure sur le groupement GPI, la forme tronquée doit contenir un ester de phosphate monovalent couplé à une structure de sucre pouvant potentiellement modifier sa migration: la migration de la forme p47 devrait être sensible à l'action d'une phosphatase alcaline. Or, un traitement de la Mbn à la phosphatase alcaline a éliminé la forme p47 radio-marquée au  $^3\text{H}$ -DFP. Même s'il a été rapporté que l'addition de phosphate à une protéine peut retarder sa migration dans un gel SDS-PAGE, je ne crois pas que l'action seul de la phosphatase ait changé la migration. La préparation de phosphatase alcaline pouvait

contenir une activité enzymatique contaminante (e.g. une protéase), pouvant générer une forme tronquée de la Mbn membranaire.

Compte tenu du fait que la myéloblastine est exprimée à la surface, qu'elle peut incorporer à sa structure du phosphate, que la séquence primaire connue ne contient pas de motif de phosphorylation, et que l'enzyme est compartimentée dans un granule après sa synthèse (lui empêchant l'accès à des protéines kinase cytoplasmiques), nous croyons que le transcrit ou le polypeptide de la Mbn est modifié. Parmi les modifications possible, il y a l'ajout de nouveaux exons codant pour un domaine d'ancrage dans la membrane plasmique et permettant la liaison de phosphate. Il est toujours possible que la protéine soit associé de façon covalente avec une autre protéine membranaire ou qu'elle subisse une "glypiation". Aussi, l'érythrocyte ainsi que le neutrophile et le monocyte sont capables de modifier le DAF (decay accelerating factor) par une glypiation (Cross G.A.M. et al., 1987), suggérant que la même modification est possible pour la Mbn. De plus cette même modification est probablement responsable de l'expression de surface de nombreux antigènes du neutrophile comme la glycophorin A (Goldschmeding R, 1992), et entre autre la myéloperoxydase (autoantigène des pANCAs) dont le mode d'ancrage membranaire est inconnu (Falk R.J. et Jennette J.C., 1990).

### **Le titre des anticorps anti-myéloblastine d'une patiente atteinte de la granulomatose de Wegener peut osciller en fonction du temps.**

Nous avons déterminé que la réactivité des sera contenant des anticorps anti-Mbn peut osciller en fonction du temps chez une patiente. Cette fluctuation est en partie dépendante des traitements subis par la patiente (plasmaphérèse, immunosuppresseurs, ...). Le titre des anticorps corrèle l'activité de la maladie. C'est en partie pour cette raison que la patiente a subi un traitement d'immunosuppresseurs et des plasmaphérèse: dans le but d'éliminer des autoanticorps possiblement pathogène. Pour certaines raisons

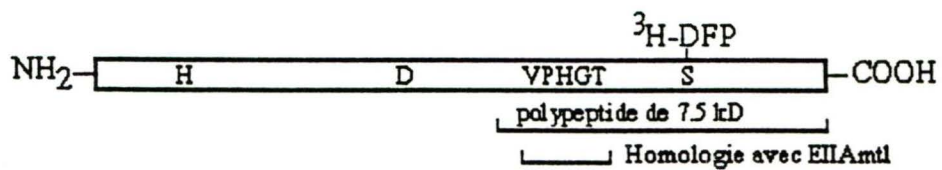


inconnues, la réactivité des sera de la patiente traitée est passée de négative à très positive à deux reprises. Certaines études suggèrent que les infections jouent un rôle dans la granulomatose de Wegener (Pinching a.J. et al., 1980; DeRemee R.A. et al., 1985; West B.C. et al., 1987; Durand J.M. et al., 1993). Nous avons tenté d'étudier si les cANCA et les infection bactériennes sont reliés par un mécanisme de mimétisme moléculaire des antigènes. Il a été mentionné dans un congrès international que la reprise de l'activité de la maladie est associée à une infection nasale de Staphylococcus aureus (S.aureus) précédant l'augmentation du titre des cANCA (Stegeman et al., 1992). Y a-t'il une réaction croisée des sera cANCA pour une protéine de S.aureus?

**Un sérum contenant des anticorps anti-myéloblastine peut immunoprécipiter des peptides de 12 et 7.5 kD liant le DFP.**

Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser l'épitope reconnu par un sérum cANCA. Nous avons remarqué que certains sera sont capables d'immunoprécipiter des polypeptides de 12 kD, liant le DFP. Nous avons tenté de voir si ces sera pouvaient immunoprécipiter de plus petits polypeptides et si la présence d'un détergent ne pouvait pas révéler la présence de ces petits fragments. Nous avons déterminé que chez le neutrophile et les cellules mononucléées, il était possible d'immunoprécipiter un peptide de 7.5 kD liant le DFP. Ces fragments représentent présumément des résidus d'une dégradation par une protéase. Cette expérience nous révèle qu'il y a un épitope ciblé dans la région du site de liaison du DFP, c'est à dire sur la sérine 203. A partir de ce site, l'épitope ciblé ne peut être qu'à une distance de 7.5 kD de chaque coté (voir figure 20). Il est vraisemblable que le déterminant reconnu soit de type linéaire car, la perte de la moitié de la protéine et les conditions d'immunoprécipitation en présence de détergents forts ne semblent pas affecter la reconnaissance au point de l'éliminer.





E(71), D(118), S(183) = triade catalytique

VPHGT = site procaryotique de phosphorylation sur une histidine

**Figure 21.** Carte du polypeptide de la myeloblastine et de l'épitope ciblé par l'IgG cANCA de S.O.

**Caractérisation d'une phosphoprotéine de Staphylococcus aureus immunoprécipitée par des anticorps anti-myéloblastine d'une patiente atteinte de la granulomatose de Wegener.**

Ce sérum qui cible de petits fragments de Mbn peut également immunoprécipiter une protéine de 15 kD de S.aureus. Nous avons étudié la régulation de l'expression de cette protéine par l'induction avec différents sucres. Les bactéries induites ont été radio-marquées métaboliquement à l'aide de méthionine radioactive, et les protéines immunoprécipitées avec un sérum cANCA. Nous avons déterminé que la protéine de 15 kD est induite par le mannitol. Nous avons également observé que la protéine immunoprécipitée est phosphorylée en présence de glucose et plus fortement en présence de glucose-mannitol. Ces données suggèrent fortement qu'il s'agit d'une phosphoprotéine faisant partie de l'opéron mannitol. Pour s'assurer que la protéine est immunoprécipitée par des anticorps anti-myéloblastine, nous avons tenté une inhibition de l'immunoprécipitation de la phosphoprotéine avec une préparation de Mbn semi-purifiée. Les Igs préalablement incubées avec la préparation de myéloblastine ont ensuite servies à l'immunoprécipitation de la phosphoprotéine bactérienne. Nous avons observé une inhibition qui est fonction de la quantité d'inhibiteur. Contre les protéines de la cellule HL60, le sérum utilisé ne contient seulement que des anticorps anti-Mbn. Ces données nous indiquent qu'un anticorps anti-myéloblastine peut immunoprécipiter une phosphoprotéine de 15 kD, induite par le mannitol. Cette protéine de S.aureus est très semblable au produit du gène EIIA<sub>mtl</sub> purifié dans S.aureus (Reiche B et al., 1988). La protéine EIIA<sub>mtl</sub> fait partie de l'opéron mannitol et se comporte biochimiquement comme celle immunoprécipitée. De plus, une séquence partielle de cette protéine a été publiée, et l'on trouve que ces deux protéines partagent un domaine de phosphorylation sur les histidines, VPHGT. Une recherche de ce motif dans la banque de gène EMBL nous indique que la myéloblastine est la seule protéine eucaryote décrite possédant ce motif. Nous avons mentionné dans l'introduction qu'il était toujours

possible de produire des anticorps autoimmuns, en autant que l'autoimmunisation se fasse avec une protéine chimérique exogène présentant un déterminant présent sur une protéine "soi" à l'anticorps membranaire du lymphocyte  $\beta$  et surtout un déterminant non-soi au TCR des lymphocytes T helper. Nous croyons que le produit du gène EIIAmtl est un très bon candidat comme agent immunogénique.

Cette hypothèse brute suggère que toutes les infections avec S.aureus pourraient mener à la production de cANCAs (anticorps anti-Mbn). Or, de telles infections sont courantes alors que la granulomatose de Wegener est une maladie très rare. Nous émettons alors l'hypothèse que les patients atteints de la granulomatose de Wegener pourraient posséder des complexe majeurs d'histocompatibilité (MHC) spécialisés dans la présentation de peptides de la protéine EIIAmtl. La granulomatose de Wegener pourrait résulter d'une infection spécifique dans un contexte génétique particulier: TCR ou MHC. Il faut alors mentionner que des études faites sur une association possible entre la granulomatose de Wegener et des MHCs spécifiques, suggèrent une association possible avec les HLA-B8 (Barret T.G. et al., 1993) et les HLA-DR2 (Elkon K. et al., 1983).

Les résultats présentés dans ce mémoire confirment que l'antigène des autoanticorps cANCAs est une protéase à sérine de 29 kD connue sous le nom de myéloblastine ou de protéinase 3. Nous introduisons la donnée nouvelle que la myéloblastine peut adopter deux formes, soit une forme soluble et libre dans les granules et une forme liée à la membrane cytoplasmique et granulaire. Nous avons également observé que la myéloblastine peut adopter un poids moléculaire apparent de 47 kD, suggérant une modification du transcrit ou du polypeptide. Il reste maintenant à déterminer quel type de modification subie la Mbn pour comprendre la relation entre la forme membranaire et la forme de 47 kD. Finalement, nous avons découvert un sérum cANCA contenant des anticorps anti-myéloblastine capables d'immunoprécipiter des petits fragments de l'autoantigène, liant le DFP, et aussi capables d'immunoprécipiter une phosphoprotéine de 15 kD que l'on croit être le produit



du gène EIIAmtl. Donc ce sérum contient des anticorps anti-myéloblastine ciblant la portion COOH-terminale de la protéine. Nous émettons l'hypothèse originale que la protéine procaryotique ciblée partage un déterminant immunologique entièrement conservé avec la myéloblastine; ce déterminant pourrait être à l'origine du bris de la tolérance que représente les cANCAs, par un mécanisme de mimétisme moléculaire.

## Remerciements

Je tiens à remercier le Dr. Henri-André Ménard et son équipe pour leur accueil dans le laboratoire. Je tiens également à remercier le Dr. Claire M. Dubois et le Dr. Benoit Chabot pour les bons conseils qu'il m'ont donnés. Je remercie mes camarades de laboratoire pour leurs dévouements et leur entraide tout au long de ces deux années.

Je veux également remercier la Société d'Arthrite pour son soutien financier durant les deux années de ma maîtrise.

Aussi, un remerciement spécial au Dr. Ménard pour m'avoir permis de participer à plusieurs congrès internationaux, qui ont définitivement pu aider à ma formation scientifique.

Je remercie Christine Girard pour m'avoir aidé à la correction de ce mémoire.

## Liste des résumés et des congrès

- 1) **Dalpe G.**, Boire G., Ménard H.A. Proteinase 3/myéloblastine cDNA encodes 29 kD and 46-50 kD serine proteinases targeted by cANCA sera. *Arthritis and Rheumatism* 36 (suppl. 9):A53, sept. 1993. 57th ACR annual scientific meeting, 7-11 novembre 1993, San Antonio.
- 2) **Dalpe G.**, Boire G., Ménard H.A. Immunological identity of myeloblastin and Wegener's granulomatosis autoantigen. Evidence that human autoantibodies recognize conformational determinants situated at or near the catalytic domain of myeloblastin. A) *Clinical and investigative medicine*, vol. 16; 4: 824, 1993. Réunion annuelle du Collège royal des médecins et chirurgiens du Canada, 9-13 septembre 1993. B) *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 93 (suppl.1):21, septembre 1993. 5th international workshop on ANCA, 31 août au 3 septembre 1993, Cambridge, Angleterre. C) *Molecular and cell biology of autoantibodies and autoimmunity*, p.29. 30 juin-3 juillet 1993, Schloss Elmau.
- 3) Dagenais P., **Dalpe G.**, Fernandes M.F., Boire G., Keystone E.C., Gross W.L., Weyand M.C., Ménard H.A. Ancas in patients with Takayasu's arteritis. A) *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 93 (suppl.1):34, septembre 1993. 5th International ANCA Workshop, Cambridge, 31 août au 3 septembre 1993. B) *Clinical and investigative medicine*, vol. 16; 4: 820, 1993. Réunion annuelle du Collège royal des médecins et chirurgiens du Canada, 9-13 septembre 1993.

## Liste des publications

- 1) **Dalpe G.**, Béliveau A., Ménard H.A. 1993. Cross-reactivity of an anti-proteinase 3 antibody to elastase. *Autoimmunity* (sous presse).
- 2) **Dalpe G.**, Fernandes F., Richard C., Boire G., Ménard H.A. 1993. Heterogeneity of ANCA sera showing atypical, peripheral and classical cytoplasmic immunofluorescence patterns. *Advances in experimental medicine and biology* (sous presse).
- 3) **Dalpe G.**, Ménard H.A. 1994. Proteinase 3/myéloblastine cDNA encodes 29 kD and 46-50 kD serine proteinases targeted by cANCA sera. (soumis)



## Références

1. Andrassy K., Koderisch J., Schafer A., Waldheer R. 1990. Idiopathic rapidly progressive (crescentic) glomerulonephritis with myeloperoxidase antibodies. A new entity linked to female sex? *Nephron* 56; 99-100.
2. 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.
3. Baggiolini, M., U. Bretz, B. Dewalk, and M.E. Feigenson. 1978. The polymorphonuclear leukocyte. *Agents Actions.* 8:3-11.
4. Bangalore N., Travis J., Onunka V.C., Pohl J., Shafer W. 1990. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G. *JBC* 265; 13584-13588.
5. Barlow D.J. Edwards M.S., Thornton J.M. 1986. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 322; 747-748.
6. Barrett T.G., Taylor C.M., Thomasson P. 1993. Environmental trigger for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies? *The lancet* 342; 369-370.
7. Beatty K. Bieth J., Travis J. 1980. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor and  $\alpha$ -1-antichymotrypsin. *JBC* 255; 3931-3934.

8. Bell D.A., Cairns E., Cikalo K., Ly V., Block J., Pruzanski W. 1987. Antinucleic acid autoantibody responses of normal human origin: antigen specificity anti idiotypic characteristics compared to patients with systemic lupus erythematosus and patients with monclonal IgM. *J. Rheumatol.* 14 (suppl. 13); 127-131.
9. Bini P., Gabay J.E., Teitel A., Melchior M., Zhou J.L., Elkon K.B. 1992. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in Wegener's granulomatosis recognize conformational epitope(s) on proteinase 3. *J. Immunol.* 149; 1409-1415.
10. Boire G. 1990. Caractérisation et immunogénicité de l'autoantigène Ro et signification clinique des autoanticorps anti-Ro. Mémoire, faculté de médecine, Université de Sherbrooke.
11. Borregaard, N., J.M. Heiple, E.R. Simons, and R.A. Clark. 1983. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.* 97:52-61.
12. Borries D., Raynal M.C., Solomon D.H., Darzynkiewicz Z., Cayre Y.E. 1989. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell* 59; 959-968.
13. Brouwer E., Cohen-tervaert J.W., Horst G. 1991. Predominance of IgG1 and IgG4 subclasses of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in patients with Wegener's granulomatosis and clinically related disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 83; 379-386.

14. Brouwer E., Huitema M.G., Klok P.A., de Weerd H., Cohen Tervaert J.W., Weening J.J., Kallenberg C.G.M. 1993. Antimyeloperoxidase-associated proliferative glomerulonephritis: an animal model. *J. Exp. Med.* 177;905-914.
15. 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.
16. Campanelli D., Detmers P.A. Nathan C.F., Gabay J.E. 1990a. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential anticicrobial and proteolytic properties. *J. Clin. Invest.* 85; 904-915.
17. Campanelli D., Melchior M., Fu Y., Nakata M., Shuman H., Nathan C., Gabay J.E. 1990b. Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils. *J. Exp. Med.* 172; 1709-1715.
18. Cayre Y., Raynal M.C., Darzynkiewicz Z., Dorner M.H. 1987. Model for intermediate steps in monocytic differentiation: c-myc, c-fms, and ferritin as markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84; 7616-7623.
19. Charles, L.A., R.J. Falk, and J.C. Jennette. 1989. Reactivity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with HL-60 cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 53:243-253.
20. Charles, L.A., R.J. Falk, and J.C. Jennette. 1991. The role of HL60 cells in the detection of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *J. Rheumatol.* 18:491-494.



21. Chevailler A., Renier G., Subra J.F. 1991. anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles et maladies associées. *Ann. Med. Interne* 142; 530-542.
22. Cohen Tervaert J.W., van der Woude F.J., Fauci A.S. 1989. Association between active Wegener's granulomatosis and anti-cytoplasmic antibodies. *Arch. Intern. Med.* 149; 2461-2465.
23. Cohen Tervaert J.W.(a), Goldschmeding R., Elema J.D. 1990 (a). Autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 37;799-806.
24. Cohen Tervaert J.W.(b), Goldschmeding R., Elema J.D. 1990(b). Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different forms of vasculitis. *Arthritis and Rheum.* 33; 1264-1272.
25. Coremans I.E.M., Hagen E.C., Daha M.R., van der Woude F.J., van der Voort E.A.M., van der Keur C.K., Breedveld F.C. 1992. Antilactoferrin antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with vasculitis. *Arth. Rheum.* 35; 1466-1475.
26. Cross G.A.M. 1987. Eukaryotic protein modification and membrane attachment via phosphatidylinositol. *Cell* 48; 179-181.
27. Csernok E., Ludemann J., Gross W.L, Bainton D. 1990. Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. *Am. J. pathol.* 137; 1113-1120.

28. Daha M.R., Falk R.J. 1990. Ig-class specificity of ANCA. *Neth. J. Med.* 36; 126-127. 1990. Anti-myeloperoxidase antibodies and clinical associations. *Neth. J. Med.* 36;152-153.
29. Dalpé, G., M.F. Fernandes, C. Richard, G. Boire, and H.A. Ménard. 1993. Heterogeneity of cytoplasmic, perinuclear and atypical ANCA *in* ANCA Associated Vasculitides: Immunodiagnostic and Pathogenic Value of Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies. W. L. Gross, editor. Plenum Publishing Corporation. New York. *Adv. Exp. Med. Biol.* In press.
30. Davies DJ, Moran JE, Niall JF. 1982. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology? *Br Med J* 285:606.
31. DeRemee R.A., McDonald T.J., Weilan L.H. 1985. Wegener's granulomatosis: observations on treatment with antimicrobial agents. *Mayo Clin. Proc.* 60;27-32.
32. deThe H., Lavau C., Marchio A., Chomienne C., Degos L., Dejean A. 1991. The PML-RAR $\alpha$  fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66; 675.
33. Devereux J., Haeberli P., Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Research* 1984; 1: 387-395.
34. Durand J.M., Mege J.L., Velut J.G., Escallier J.C., Kapanski G., Quiles N., Bongrand P., Soubeyrand J. 1993. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and infection. *Autoimmunity* 15; 81-83.

35. Einat M., Resnitzky D., Kimchi A. 1985. Close link between reduction of c-myc expression by interferon and G0/G1 arrest. *Nature* 313; 597-600.
36. Elkon K.B., Sutherland D.C., Rees A.J., Hughes R.V., Batchelor J.R. 1983. HLA antigen frequencies in systemic vasculitis: increase in HLA-DR2 in Wegener's granulomatosis. *Arth. Rheum.* 26; 102-105.
37. Falk RJ, Jennette JC. 1988. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J med* 318:1651-1657.
38. Falk R.J., Jennette J.C. 1989. Immunofluorescence and ELISA determination of ANCA with description of a sub-class with anti-myeloperoxidase activity. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 97(suppl.); 45.
39. Falk R.J., Terrell R.S., Charles L.A., Jennette J.C. 1990. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87; 4115-4119.
40. Ferguson M.A.J., Williams A.F. 1988. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* 57; 285-320.
41. Fernandes, M.F., N. Duhaime, C. Richard, G. Boire, and H.A. Ménard. 1993. Anticorps anticytoplasme de neutrophiles et pathologies humaines. *Union. Méd. Canada.* 122:In press.



42. Gabay J.E., Scott R.W., Campanelli D., Griffith J., Wilde C., Marra M.N., Seeger M., Nathan C.F. 1989. Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86; 5610-5614.
43. Gallicchio M.C., Savage J.A. 1991. Detection of anti-myeloperoxidase and anti-elastase antibodies in vasculitides and infections. *Clin. Exp. Immunol.* 84; 232-237.
44. Goldschmeding R., C.E. van der Schoot, M.A. van der Snoek, A.E.G.Kr von dem Borne. 1989 (a). A monoclonal antibody against the 29-kD ANCA autoantigen: application in a sandwich ELISA for ANCA detection. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 97:Suppl.6:47.
45. Goldschmeding R., van der Schoot C.E., ten bokkel Huinink D., Hack C.E., van den Ende M.E., Kallenberg C.G.M., von dem Borne A.E.G.Kr. 1989(b). Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84; 1577-1587.
46. Goldschmeding R., Cohen Tercaert J.W., van der Schoot A.E.G.K. 1989(c). ANCA, anti-myeloperoxidase, and anti-elastase: three members of a novel class of autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 97(suppl.); 48.
47. Goldschmeding R. 1992. Target antigens of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Ph.D. thesis, department of Immunohaematology, University of Amsterdam.
48. Goodnow C.C. 1992. Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 10;489-518.

49. Hall JB, Wadham BMcN, Wook CJ. 1984. Vasculitis and glomerulonephritis: a subgroup with an antineutrophil cytoplasmic antibody. *Aust NZ J Med* 14:277-278.
50. Harlow E., Lane D. 1988. *Antibodies. A laboratory manual*. First edition. Cold Spring Harbor Laboratory.
51. Hemdan E.S., Zhao Y.J., Sulkowski E., Porath J. 1989. Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86; 1811-1815.
52. Jayne E.R.W., Weetman A.P., Looockwood C.M. 1991. IgG subclass distribution of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigen in systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 84; 476-481.
53. Jenne D.E., Tschopp J., Ludemann J., Utecht B., Gross W.L. 1990. Wegener's autoantigen decoded. *Nature* 346; 520.
54. Jennette J.C., Hoidal J.R., Falk R.J. 1990. Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3. *Blood* 75; 2263-2264.
55. Kakizuka A., Miller W.H.Jr., Umesono K., Warrell R.P.Jr., Frankel S.R., Murty V.V.V.S., Dmitrovsky E., Evans R.M. 1991. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAT $\alpha$  with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66; 1.
56. Kao R.C., Wehner N.G., Skubitz K.M., Gray B.H., Hoidal J.R. 1988. Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J. Clin. Invest.* 82; 1963-1973.

57. Kam C.M., Kerrigan J.E., Dolman K.M., Goldschmeding R., von dem Borne A.E.G.Kr., Powers J.C. 1992. Substrate and inhibitor studies on proteinase 3. FEBS 297; 119-123.
58. 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.
59. Labbaye C., Musette P., Cayre Y.E. 1991. Wegener autantigen and myeloblastin are encoded by a single mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88; 9253-9256.
60. Labbaye C., Zhag J., Casanova J.L., Lanotte M., Teng J., Miller W.H., Cayre Y.E. 1993. Regulation of myeloblastin messenger RNA expression in myeloid leukemia cells treated with all-trans retinoic acid. Blood 81; 475-481.
61. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Lond.). 227:680-685.
62. Lee W.H., Shew J.Y., Hong F.D., Sery T.W., Donoso L.A., Young L.H., Bookstein R., Lee E.Y.H. 1987. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. Nature 329; 642-645.
63. Lesavre P., Chen N., Nusbaum P., Mecarelli L., Noel L.H. 1990. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) with anti-lactoferrin activity in vasculitis (abstr). Kidney Int. 37; 442.



64. Lesavre P., Noel L.H., Halbwachs-Mecarelli L., Nusbaum P., Geffriaud C., Chauveau D., Grunfeld J.P. 1992. Les auto-anticorps anticytoplasme des neutrophiles (ANCA): un élément nouveau dans la compréhension des vascularites. *Médecine/Sciences* 8; 827-837.
65. Low M.G., Saltiel A.R. 1988. Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes. *Science* 239; 268-275.
66. Ludemann G., Gross W.L. 1987. Autoantibodies against cytoplasmic structures of neutrophil granulocytes in Wegener's granulomatosis. *Clin. Exp. Immunol.* 69; 350-357.
67. Ludemann J., Utecht B., Gross W.L. 1990. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J. Exp. Med.* 171; 357-362.
68. Meadow N.D., Fox D.K., Roseman S. 1990. The bacterial phosphoenol-pyruvate: glycolate phosphotransferase system. *Annu. Rev. Biochem.* 59;497-542.
69. Mitchell R.L., Zokas L., Schreiber R.D., Verma I.M. 1985. Rapid induction of the expression of proto-oncogene fos during human monocytic differentiation. *Cell* 40; 209-217.
70. Muller R., Curran T., Muller K., Guilbert L. 1985. Induction of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation. *Nature* 314;546-548.
71. Musette P., Casanova J.L., Labbaye C., Dorner M.H., Kourilsky P., Cayre Y.E. 1991. Wegener's autoantigen and leukemia. *Blood* 77; 1398-1399.

72. Nassberger L. 1989(a). Circulating anti-neutrophil cytoplasm antibodies in patients with rapidly progressive glomerulonephritis and extracapillary proliferation. *J Intern Med* 225:191-196. 1990. Antimyeloperoxidase antibodies in patients with extracapillary glomerulonephritis. *Nephron* 56:152-156.
73. Nassberger L., Sjöholm A.G., Bygren P. 1989(b). Circulating anti-neutrophil cytoplasm antibodies in patients with rapidly progressive glomerulonephritis and extracapillary proliferation. *J.intern. Med.* 225; 191-196.
74. Nassberger L., Jonsson H., Sjöholm A.G., Strufelt G., Herberner A. 1989(c). Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1; 509.
75. Nassberger L., Sjöholm A.G., Thysell H. 1990. Antimyeloperoxidase antibodies in patients with extracapillary glomerulonephritis. *Nephron* 56; 152-156.
76. Niles J.L., McCluskey R.T., Ahmad M.F., Arnaout M.A. 1989. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood* 74; 1888-1893.
77. Okano K., Aoki Y., Shimizu H., Naruto M. Functional expression of human leukocyte elastase (HLE)/medullasin in eukaryotic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 167: 1326-1332.
78. Ohosone 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.

79. Paul W.E. *Fundamental Immunology*. 1989. Second edition, Raven Press Ltd, New York.
80. Pinching A.J., Rees A.J., Pussell B.A., Lockwood C.M., Mitchinson R.S., Peters D.K. 1980. Relapses in Wegener's granulomatosis: the role of infection. *Br. Med. J.* 281; 836-838.
81. Rao N.V., Wehner N.G., Marshall B.C., Gray W.R., Gray B.H., Hoidal J.R. 1990. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. *JBC* 266; 9540-9548.
82. Reiche B. Frank R., Deutscher J., Meyer N., Hengstenberg W. 1988. Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: purification and characterization of the mannitol-specific enzyme IImtl of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus carnosus* and homology with the Enzyme IImtl of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 27; 6512-6516.
83. Reitsma P.H., Rothberg P.G. Astrin S.M., Trial J., Bar-Shavit Z., Hall A., teitelbaum S.L., Kahn A.J. 1983. Regulation of myc gene expression in HL60 leukaemia cells by a vitamin D metabolite. *Nature* 306; 492-494.
84. Salvesen G.S., Farley D., Shuman J., Przybyla A., Reilly C., Travis J. Molecular cloning of human cathepsin G: structural similarity to mast cell and cytotoxic T Lymphocyte proteinases. *Biochemistry* 1987; 26: 2289-2293.
85. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory. 1320 pp.



86. Sariban E., Mitchell T., Kufe D. 1985. Expression of the c-fms proto-oncogene during human monocytic differentiation. *Nature* 316;64-66.
87. Savige J.A., Gallicchio M., Georgiou T., Davies D.J. 1990. Diverse target antigens recognized by circulating antibodies in anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated renal vasculitides. *Clin. Exp. Immunol.* 82; 238-243.
88. Sinha S., Watorek W., Karr S., Giles J., Bode W., Travis J. 1987. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84; 2228.
89. Stegeman C.A., Cohen Tervaert J.W., Manson W.L., Kallenberg C.G.M. 1992. Persistent nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and relapse rate of Wegener's granulomatosis. Résumé de "the 4th international workshop on ANCA", 28-30 Mai 1992, Lübeck, Allemagne, page 16.
90. Sturrock A.B., Franklin K.F., Rao G., Marshall B.C., Rebentisch M.B., Lemons R.S., Hoidal J.R. 1992. Structure, chromosomal assignment, and expression of the gene for proteinase-3. *JBC* 267; 21193-21199.
91. Takahashi H., Nukiwa T., Basset P., Crystal R.G. 1988. Myelomonocytic cell lineage expression of the neutrophil elastase gene. *JBC* 263; 2543-2547.
92. van der Woude F.J., Rasmussen N., Lobatto S., Wiik A., Permin H., van Es L.A., van der Giessen M., van der Hem G.K., The T.H. 1985. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *The Lancet* i; 425-429.

93. van de Wiel B.A., Dolman K.M., van der Meer-Gerritsen C.H., Hack C.E., von dem Borne A.E.G.Kr., Goldschmeding R. 1992. Interference of Wegener's granulomatosis autoantibodies with neutrophil proteinase 3 activity. *Clin. Exp. Immunol* 90; 409-414.
94. van den Wall Bake A.W.L., Daha M.R., van der Woude F.J., Halma C., Schrama C., van Es L.A. 1989. IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (IgA-ANCA) in primary IgA nephropathy. *Acta pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 97 (suppl); 25-26.
95. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S. 1985. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1:425-429.
96. West B.C., Todd J.R., King J.W. 1987. Wegener's granulomatosis and trimethoprim-sulfamethoxazole: complete remission after a twenty-year course. *Ann. Intern. Med.* 106; 840-842.
97. Westin E.H., Wong-Staal F., Gelmann E.P., Dalla Favera R., Papas T.S., Lautenberger J.A., Eva A., Reddy E., Tronick S.R., Aaronson S.A., Gallo R.C. 1982. Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79; 2490-2494.
98. Wiik, A. 1989. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 97:Suppl.6:12-13.

99. Wilde C.G., Snable J.L., Griffith J.E., Scott R.W. 1990. Characterization of two azurophil granule proteases with active-site homology to neutrophil elastase. JBC 265; 2038-2041.