

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Purification et caractérisation de l'autoantigène
Ro/SS-A humain

par

Nathalie P. Monast

Département de Biochimie

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

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

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

ISBN 0-315-93050-0

Canada

TABLE DES MATIERES

Liste des illustrations.....	VI
Liste des abréviations.....	X
Résumé.....	XII
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Système immunitaire.....	1
1.1.1 Fonction primordiale.....	1
1.1.2 Fonctionnement général du système immunitaire.....	2
1.1.2.1 Récepteurs de lymphocytes B et T...2	
1.1.2.2 Sélection clonale.....	4
1.1.2.3 Coopération des lymphocytes B et T.....	4
1.1.3 Autotolérance.....	5
1.1.4 Autoimmunité.....	6
1.1.5 Production d'autoanticorps.....	9
1.1.5.1 Définition.....	9
1.1.5.2 Mécanismes de génération des auto- anticorps.....	9
1.1.5.3 Pathogénicité.....	11
1.1.6 Maladies autoimmunes.....	12
1.1.6.1 Définition.....	12
1.1.6.2 Lupus érythémateux disséminé.....	13
1.1.6.3 Syndrome de Sjögren.....	17
1.1.6.4 Polyarthrite rhumatoïde.....	18
1.2 Propriétés moléculaires des autoantigènes Ro/SS-A et La/SS-B.....	20

1.2.1	Classes de ribonucléoprotéines reconnues par les autoanticorps.....	20
1.2.2	Caractérisation de l'autoantigène Ro/SS-A.....	23
1.2.3	Caractérisation de l'autoantigène La/SS-B.....	34
1.2.4	Intérêt de l'étude des particules ribonucléoprotéiques natives.....	41
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
2.1	Préparation de Ro/SS-A d'extrait placentaire humain.....	44
2.2	Préparation d'extrait total de cellules HeLa...	46
2.3	Préparation d'extrait total de cellules érythroï- des anucléées humaines.....	47
2.4	Sérums humains autoimmuns.....	48
2.5	Elution sur résines QMA et DEAE-cellulose.....	48
2.6	Elution sur résine DEAE 8HR (HPLC).....	49
2.7	Elution sur résine de tamis moléculaire TSK 300SW (HPLC).....	50
2.8	Gradient de sucrose.....	51
2.9	Concentration des échantillons.....	51
2.10	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant et électrotransfert.....	52
2.11	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide non-dénaturant et électrotransfert.....	54
2.12	Immunobuvardage.....	55
2.13	ELISA.....	57
2.14	Immunoprécipitation.....	58
2.15	Coloration à l'argent.....	60
2.16	Echange de composantes ARN et protéines.....	61

3.	RÉSULTATS	62
3.1	Extraits tissulaires humains.....	62
3.2	Purification des ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules humaines nucléées et anucléées.....	63
3.2.1	Composition des ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules nucléées humaines (HeLa).....	64
3.2.1.1	Utilisation des cations divalents magnésium et zinc.....	64
3.2.1.2	Essais de purification sur résine QMA.....	65
3.2.1.3	Gel de polyacrylamide 15% dénaturant.....	68
3.2.1.4	Purification sur résine DEAE-cellulose (DE-52).....	72
3.2.1.5	Purification sur résine DEAE 8HR (HPLC).....	78
3.2.1.6	Purification sur résine de tamis moléculaire TSK 300SW.....	89
3.2.2	Composition des ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules anucléées humaines (cellules érythroïdes).....	100
3.3	Effet des cations divalents sur les ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules nucléées (HeLa).....	106
3.3.1	Réassociation ARN/protéines.....	106
3.3.2	Rétention du Ro/SS-A 52 kDa dans les particules purifiées.....	107
3.3.3	Echange des composantes ARN et protéines des particules Ro/SS-A.....	113
4.	DISCUSSION	119
5.	CONCLUSION	134
6.	REMERCIEMENTS	135
7.	RÉFÉRENCES	136

8. ANNEXE.....A-1

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Tableaux:

Tableau 1:	Lupus érythémateux disséminé: nature des autoantigènes et prévalence des autoanticorps.....	15
Tableau 2:	Particules de ribonucléoprotéines reconnues par les autoanticorps.....	22
Tableau 3:	Conditions d'élution des ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules HeLa sur les résines DEAE-cellulose et QMA.....	66
Tableau 4:	Fractionnement de particules Ro ^h Y ⁵ d'un extrait total et d'un extrait semi-purifié de cellules HeLa sur un gradient de sucrose.....	76
Tableau 5:	Essais de conditions pouvant mener à la réassociation des composantes ARN et protéines Ro/SS-A dissociées en milieu salin concentré.....	108

Figures:

- Figure 1: Structure secondaire des ARN Ro/SS-A humains.....27
- Figure 2: Localisation des divers épitopes de la protéine La/SS-B mis en évidence par différents groupes.....39
- Figure 3: Immunobuvardages comparatifs de gels de polyacrylamide dénaturants 10% et 15%.....70
- Figure 4: Identification des protéines Ro/SS-A et La/SS-B associées aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées d'un extrait total de cellules HeLa sur DEAE-cellulose.....73
- Figure 5: Identification par test ELISA des ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules HeLa purifiées sur DEAE 8HR (HPLC).....79
- Figure 6: Détection des ARN Ro/SS-A de cellules HeLa dans les fractions purifiées sur DEAE 8HR (HPLC).....81

- Figure 7: Identification des protéines Ro/SS-A et La/SS-B associées aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées à partir d'un extrait de cellules HeLa sur DEAE-cellulose et DEAE 8HR (HPLC).....84
- Figure 8: Caractérisation des composantes protéiques associées à la particule RohY5 purifiée sur DEAE 8HR (HPLC) par immunobuvardage sous conditions non-dénaturantes.....87
- Figure 9: Profil d'élution des protéines de référence sur la colonne de tamis moléculaire TSK 300SW.....90
- Figure 10: Courbe de calibration de la colonne de tamis moléculaire TSK 300SW.....92
- Figure 11: Profil d'élution de la ribonucléoprotéine RohY5 par tamis moléculaire.....94
- Figure 12: Profil d'élution de la ribonucléoprotéine RohY4 par tamis moléculaire.....96
- Figure 13: Profil d'élution des ribonucléoprotéines RohY1-hY3 par tamis moléculaire.....98

- Figure 14: Détection des ARN Ro/SS-A de cellules érythroïdes anucléées dans des fractions chromatographiques d'une colonne de DEAE 8HR (HPLC).....102
- Figure 15: Détection des protéines Ro/SS-A et La/SS-B associées aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A des cellules érythroïdes anucléées suite à la purification sur DEAE 8HR (HPLC).....104
- Figure 16: Rétention du Ro/SS-A 52 kDa dans les ribonucléoprotéines Ro/SS-A des cellules HeLa en présence d'ions magnésium.....111
- Figure 17: Analyse de l'effet des ions magnésium et zinc sur la présence de la protéine Ro/SS-A 52 kDa dans les ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées à partir de cellules HeLa.....114
- Figure 18: Analyse de l'effet des ions magnésium et zinc sur la stabilité des particules RohY5 de cellules HeLa.....117

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAN:	Anticorps anti-nucléaire
ADCC:	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
cADN:	Acide déoxyribonucléique complémentaire
gADN:	Acide déoxyribonucléique génomique
APC:	Cellule présentatrice de l'antigène
APS:	Persulfate d'ammonium
rARN:	Acide ribonucléique ribosomal
mARN:	Acide ribonucléique messenger
tARN:	Acide ribonucléique de transfert
scARN:	Petit acide ribonucléique cytoplasmique
snARN:	Petit acide ribonucléique nucléaire
(d)ATP:	(déoxy) adénosine triphosphate
BCIP:	5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate
BSA:	albumine bovine sérique
CDC:	Center for Diseases Control, Atlanta, GA
Ci:	Curie
CMC:	Carboxyméthyl-cellulose
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
DEAE:	Diéthylaminoéthyl
DTT:	Dithiothréitol
EBV:	Virus Epstein-Barr
EDTA:	Ethylène diamino tétraacétate disodique
ELISA:	«Enzyme-linked immunosorbent assay»
ENA:	Antigène nucléaire soluble
FR:	Facteur rhumatoïde
HPLC:	«high performance liquid chromatography»

IgG:	Immunoglobuline de classe G
IgM:	Immunoglobuline de classe M
IPP:	Immunoprécipitation
kDa:	KiloDalton
LED:	Lupus érythémateux disséminé
NBT:	«Nitroblue tetrazolium»
OPD:	Orthophénylène diamine
PBS:	Saline tamponnée avec du phosphate
PCA:	Phénol-chloroforme-alcool isoamylique
PMSF:	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PR:	Polyarthrite rhumatoïde
QMA:	«Quaternary methylamine»
mRNP:	Ribonucléoprotéine messenger
hnRNP:	Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire
scrNP:	Petite ribonucléoprotéine cytoplasmique
snRNP:	Petite ribonucléoprotéine nucléaire
rpm:	Révolutions par minute
SDS:	Dodécyl sulfate de sodium
SNH:	Sérum normal humain
SS:	Syndrome de Sjögren
TBE:	Tris-borate-EDTA
TBS:	Saline tamponnée avec du Tris
Tc:	Lymphocyte T cytotoxique
TCA:	Acide trichloroacétique
TCR:	Récepteur du lymphocyte T
TEMED:	N,N,N',N'-tétraméthylènediamine

Th: Lymphocyte T facilitateur

Ts: Lymphocyte T supprimeur

UV: Ultraviolet

RÉSUMÉ

Purification et caractérisation de l'autoantigène Ro/SS-A humain

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

Les ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules nucléées (cellules HeLa en culture) et anucléées (cellules érythroïdes humaines) ont été purifiées et caractérisées au niveau de leur composantes ARN et protéines. Une attention particulière a été portée aux conditions de purification qui ont permis d'isoler les particules Ro/SS-A sous forme intacte. La caractérisation des ribonucléoprotéines RohY5, RohY4 et RohY1-hY3 des cellules nucléées a démontré que les polypeptides Ro/SS-A 60 kDa et La/SS-B sont des constituents stables de toutes les populations de particules isolées, alors que le polypeptide Ro/SS-A 52 kDa serait un constituant mineur des ribonucléoprotéines Ro/SS-A puisqu'il serait retrouvé majoritairement sous forme libre, c'est-à-dire hors du complexe ribonucléoprotéique, seul ou en association avec le polypeptide Ro/SS-A 60 kDa. Le fractionnement par tamis moléculaire des 3 populations de particules Ro/SS-A isolées a permis de déterminer leur masse moléculaire, soit environ 300 à 350 kDa pour RohY5 et RohY1-hY3 et environ 230 kDa pour RohY4. Ces données sont

compatibles avec l'idée que ces particules seraient constituées d'un ARN et de plusieurs polypeptides et que les variations observées proviendraient d'une hétérogénéité de la composition protéique. La caractérisation des ribonucléoprotéines RohY1 et RohY4 des cellules anucléées a confirmé ce qui avait été observé chez les cellules HeLa puisque le polypeptide Ro/SS-A 54 kDa existerait majoritairement ou complètement à l'extérieur des ribonucléoprotéines Ro/SS-A, seul et en association avec le polypeptide Ro/SS-A 60 kDa. Par contre, le polypeptide La/SS-B semble être peu abondant dans les cellules érythroïdes anucléées. En parallèle, une influence potentielle des cations magnésium et zinc a été étudiée au niveau de la préservation de la structure native des particules Ro/SS-A isolées. Le cation magnésium semble démontrer un rôle déstabilisateur des interactions ARN/protéines dans les particules Ro/SS-A et il ne participerait pas à la rétention du polypeptide Ro/SS-A 52 kDa dans le complexe en cours de purification. Des actions similaires du cation zinc n'ont pas pu être identifiées. L'observation de l'association d'autoantigènes en complexes macromoléculaires générant la production de groupes d'autoanticorps supporte l'hypothèse que la particule native stimule directement le système immunitaire et justifie l'intérêt de l'étude des particules Ro/SS-A natives.

1. INTRODUCTION

1.1 SYSTEME IMMUNITAIRE

1.1.1 FONCTION PRIMORDIALE

La fonction normale du système immunitaire consiste en un rejet efficace de substances étrangères, soit des cellules et antigènes étrangers, des bactéries, des greffes, des tumeurs ou des cellules autologues infectées par un virus, qui peuvent être à l'origine de désordres pathologiques variés si rien ne s'oppose à leur prolifération.

D'après la description originale de «l'horror autotoxicus» par Paul Ehrlich au début du siècle, le dogme central de l'immunité stipule que le système immunitaire ne réagit pas aux composants du soi. Le système immunitaire est donc régi par une exigence de sélectivité (postulat d'autotolérance) en 2 points:

1. Le système immunitaire réagit contre toute substance étrangère, c'est-à-dire qu'un individu a la capacité de produire des anticorps spécifiques contre tous les déterminants antigéniques existants.

2. Le système immunitaire présente une réactivité minimale ou une absence de réactivité contre les «antigènes» soi. Néanmoins, il est maintenant connu que des réponses autoimmunes ne sont pas rares et que toutes ne sont pas préjudiciables à l'organisme. Cependant, dans des circonstances peu claires, un phénomène d'autoimmunité,

défini comme un état dans lequel la tolérance est interrompue, s'installe et se traduit par une production d'anticorps et de lymphocytes autoréactifs, menant à une pathologie autoimmune (THEOFILOPOULOS, 1987).

1.1.2 FONCTIONNEMENT GÉNÉRAL DU SYSTEME IMMUNITAIRE

1.1.2.1 RÉCEPTEURS DE LYMPHOCYTES B ET T

Les lymphocytes B et T possèdent des récepteurs qui sont des molécules membranaires liant un antigène spécifique. Les lymphocytes B portent en surface un récepteur de l'antigène qui est une immunoglobuline IgM surtout (monomérique) ou IgD (BACH et LESAVRE, 1982). La grande diversité de ces immunoglobulines membranaires est générée à partir d'une molécule d'immunoglobuline propre à chaque cellule par la recombinaison des régions variables des chaînes lourdes et légères. Ces régions variables résultent d'une série de recombinaisons somatiques de minigènes germinaux V (variables), D (diversité) et J (jonction) (TONEGAWA, 1983). Un plus haut niveau de variabilité est obtenu à cause du phénomène de mutation somatique des régions variables. Le récepteur des lymphocytes T (TCR) présente une importante homologie de structure primaire et secondaire avec les immunoglobulines. Cet hétérodimère est composé d'une chaîne α de 43-49 kDa et d'une chaîne β de 40-43 kDa. Au niveau du TCR, la diversité est introduite par le phénomène de recombinaison, mais contrairement aux lymphocytes B, le

processus de mutation somatique joue un rôle très limité ou même inexistant (THEOFILOPOULOS, 1987).

Les lymphocytes B reconnaissent l'antigène libre (déterminant antigénique conformationnel) par association avec leurs immunoglobulines membranaires tandis que les lymphocytes T ont une réponse très restreinte face à l'antigène libre; celui-ci doit être présenté au lymphocyte T par une autre cellule en association avec une molécule CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Ces cellules effectuent une dégradation intracellulaire de l'antigène qui mène à la production de fragments peptidiques s'associant à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de l'APC. Ce complexe transporté à la surface de l'APC est reconnu par un seul site récepteur du TCR, spécifique pour le néoantigène formé par association du peptide antigénique et de l'antigène d'histocompatibilité de l'APC (LORENZ et ALLEN, 1988). Les antigènes d'histocompatibilité de classe I (présents à la surface de toutes les cellules) sont impliqués, par association avec des antigènes intracellulaires, dans l'activation de lymphocytes T cytotoxiques (Tc) spécifiques à ces déterminants antigéniques.

Les antigènes CMH de classe II (présents chez les cellules APC surtout) agissent au niveau de la reconnaissance des antigènes conventionnels par les lymphocytes Th («helper»). (PAUL, 1984).

1.1.2.2 SÉLECTION CLONALE

Burnet (1957) a énoncé sa théorie de la sélection clonale pour expliquer la réponse immunitaire «explosive» à un antigène particulier. Chaque lymphocyte reconnaît une seule spécificité antigénique par l'intermédiaire de son récepteur membranaire. Cette sélection par l'antigène induit la prolifération et la maturation du lymphocyte en un clone de cellules effectrices immunologiques. Le résultat est une réponse immunitaire spécifique massive et la formation de cellules «mémoire» conservées en vue d'une seconde rencontre avec l'antigène (ROITT et al., 1985; BACH et LESAVRE, 1982).

1.1.2.3 COOPÉRATION DES LYMPHOCYTES B ET T

Les lymphocytes sont engagés dans 2 types d'immunité, soit l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire. Cependant, cette distinction n'est pas absolue puisque la thymectomie néonatale d'une souris (le thymus est le site de production des lymphocytes T) empêche sa production d'anticorps spécifiques à certains antigènes appelés thymodépendants. Ceci signifie qu'une collaboration des lymphocytes T avec les lymphocytes B est essentielle pour une production optimale d'anticorps, dans ce cas, tandis que les antigènes thymoindépendants génèrent la production des

anticorps en absence de collaboration de la part des lymphocytes T. Les mécanismes d'activation du lymphocyte B par le lymphocyte Th impliquent des interactions via des facteurs spécifiques ou non-spécifiques de l'antigène (cascade de cytokines) sécrétés par le lymphocyte Th ou un contact direct entre les 2 populations lymphocytaires (ROITT et al., 1985; BACH et LESAVRE, 1982).

1.1.3 AUTOTOLÉRANCE

La tolérance immunitaire au soi ou autotolérance (découverte par Burnet et Medawar dans les années 60) est un état d'inhibition spécifique et centrale des réponses immunitaires face à un antigène, consécutive à un contact préalable avec celui-ci. Quelques mécanismes d'induction de tolérance immunitaire ont été énoncés (BACH et LESAVRE, 1982):

1-Séquestration des autoantigènes dans des barrières anatomiques, ce qui les met hors de portée du système immunitaire.

Ex.: protéines du cristallin de l'oeil ou du spermatozoïde

2-Elimination du répertoire des cellules potentiellement réactives aux autoantigènes (délétion clonale).

3-Création d'un répertoire de cellules «suppressives» (Ts) qui empêchent l'activation ou le fonctionnement des cellules potentiellement autoréactives.

4-Application aux cellules autoréactives immatures d'un

«pré-signal» qui interfère avec leur réponse ultérieure à des stimuli normalement efficaces (anergie clonale).

Au niveau des lymphocytes T, l'élimination de ces cellules anti-soi immatures rencontrant l'antigène dans le thymus semble être le principal mécanisme d'induction de tolérance, alors que les lymphocytes B immatures semblent être plutôt amenés à la tolérance lors de la rencontre avec l'autoantigène par un processus d'induction d'anergie ne menant pas à la mort cellulaire. L'induction de tolérance est plus facile à réaliser chez les lymphocytes T, alors que les lymphocytes B y sont plus réfractaires (facilité de production d'autoanticorps).

1.1.4 AUTOIMMUNITÉ

L'autoimmunité est définie comme un état dans lequel l'absence de réponse ou tolérance au soi est rompue, résultant en une production d'anticorps et de cellules capables de réagir contre les constituants du soi. L'issue de cette situation est une maladie autoimmune. Bien que la cause de cette «autoimmunisation» demeure toujours inconnue, quelques mécanismes ont été proposés dans une tentative d'explication du phénomène (THEOFILOPOULOS, 1987):

1-Exposition d'antigènes séquestrés:

Des autoantigènes à l'écart du champ d'action du système immunitaire, possiblement libérés suite à un dommage

tissulaire, sont perçus par le système immunitaire comme des exoantigènes authentiques, générant une forte réaction immunitaire. Néanmoins, l'exposition de ces autoantigènes doit être chronique pour donner lieu à une réponse immune significative.

2-Activation polyclonale des lymphocytes B:

Parmi les activateurs polyclonaux des lymphocytes B, on retrouve des mitogènes comme les lipopolysaccharides bactériens induisant une production non-sélective d'autoanticorps par les lymphocytes B. Néanmoins, cette réponse immune primaire, caractérisée par de bas niveaux d'autoanticorps à faible affinité de liaison (IgM) et polyclonaux (peu spécifiques) se distingue clairement de la production d'autoanticorps IgG -à haute affinité et spécifiques- qui médient des perturbations tissulaires donnant lieu à une maladie autoimmune.

3-Régulation défectueuse par les lymphocytes T:

Une réponse immunitaire exercée par des lymphocytes T envers un constituant soi peut être déclenchée par l'activation de lymphocytes Th spécifiquement tolérants à un autoantigène, ce qui lui permet de stimuler la production d'autoanticorps spécifiques par les lymphocytes B. Réciproquement, une inhibition des lymphocytes Ts, dont le rôle est d'empêcher la formation d'autoanticorps spécifiques par les lymphocytes B, mène au même résultat. Donc, un excès d'activité stimuloire (Th) ou un déficit en activité suppressive (Ts) conduisent à la production d'autoanticorps.

4-Altérations antigéniques et mimétisme moléculaire:

La combinaison d'un autoantigène avec des drogues, des virus ou des évènements dénaturants peut altérer chimiquement la structure antigénique (néoantigène) qui génère alors la production d'autoanticorps contre l'autoantigène non-modifié. Le mimétisme moléculaire consiste en une ressemblance entre un antigène étranger et un autoantigène, ce qui entraîne une réponse immunitaire contre l'autoantigène (réactivité croisée).

1.1.5 PRODUCTION D'AUTOANTICORPS

1.1.5.1 DÉFINITION

Les autoanticorps développés lors du phénomène de l'autoimmunité sont des anticorps produits par un individu contre des composantes présentes dans son organisme. Les antigènes «soi» ciblés par ces autoanticorps sont appelés autoantigènes. Un large spectre d'autoanticorps présents chez des patients souffrant de diverses maladies rhumatismales reconnaissent une variété d'autoantigènes comme des (ribo)nucléoprotéines, des acides nucléiques, des immunoglobulines, des molécules de surface cellulaire, des récepteurs hormonaux, la thyroglobuline et des composés de la myéline. Certains de ces autoanticorps, seuls ou en combinaison, remplissent une fonction diagnostique ou de marqueurs pour des maladies autoimmunes rhumatismales comme l'association des anti-ADN et anti-Sm avec le lupus érythémateux disséminé (SCHUMACHER et al., 1988).

1.1.5.2 MÉCANISMES DE GÉNÉRATION DES AUTOANTICORPS

Deux mécanismes responsables de la production des autoanticorps ont été proposés: une activation polyclonale non-spécifique des lymphocytes B, par laquelle il y a une production d'autoanticorps en l'absence de toute stimulation antigénique, ou une immunisation, directement avec un composé «soi» ou par exposition à des antigènes étrangers

induisant des autoanticorps par le mécanisme du mimétisme moléculaire (DZIARSKI, 1988).

Des résultats expérimentaux supportent l'existence de l'activation lymphocytaire non-spécifique comme des signes d'hyperréactivité immune chez plusieurs patients souffrant de maladies autoimmunitaires (WELCH, 1983). Cependant, les autoanticorps ne sont pas produits au hasard puisque un faible nombre des cibles disponibles est privilégié et que la réponse individuelle du système immunitaire est restreinte à certains autoantigènes (HARDIN, 1986). Donc, l'activation polyclonale des lymphocytes B jouerait probablement un rôle dans la facilitation ou l'augmentation de production des autoanticorps déclenchée par un autre mécanisme.

Bien que quelques exemples de mimétisme moléculaire soient connus, ce modèle d'immunisation n'explique pas les multiples épitopes reconnus sur un seul autoantigène, ni la reconnaissance de plusieurs autoantigènes par un seul sérum. La plupart des résultats expérimentaux suggèrent plutôt que les autoanticorps seraient produits par immunisation directe avec un autoantigène, ce qui expliquerait la présence, dans un sérum, de groupes d'autoanticorps dirigés contre des autoantigènes existant en complexes macromoléculaires *in vivo* (HARDIN, 1986).

1.1.5.3 PATHOGÉNICITÉ DES AUTOANTICORPS

Certains autoanticorps pourraient être directement ou indirectement pathogènes, mais il n'a pas encore été possible de conclure à l'implication d'un ou de plusieurs mécanismes.

Bien que difficile à expliquer, le mécanisme d'internalisation des autoanticorps a été rapporté lors de l'incubation de cellules mononucléaires périphériques viables avec un sérum autoimmun contenant des IgG anti-RNP natives couplés à la fluorescéine. L'immunofluorescence indirecte a mis en évidence un patron intranucléaire, ce qui signifie que ces IgG pénètrent *in vivo* à l'intérieur des cellules mononucléaires humaines et ceci, par l'intermédiaire du récepteur membranaire pour le fragment Fc des IgG. L'interaction intranucléaire de l'autoanticorps avec la particule de ribonucléoprotéine serait la base de la perturbation cellulaire, mais cette observation n'a pas été confirmée (ALARCON-SEGOVIA et al., 1978).

Le mécanisme d'hypersensibilité aux complexes immuns (type III) implique un rôle pathogène indirect des autoanticorps médié par les complexes immuns. Ceci pourrait expliquer l'action des anti-ADN contre l'autoantigène extériorisé des cellules dans la néphrite lupique (KOFFLER, 1974). La production continue d'autoanticorps entraîne une formation importante de complexes immuns qui ne peuvent plus

être éliminés par le système phagocytaire devenu surchargé. La liaison des complexes immuns avec le complément entraîne une réaction inflammatoire impliquant les mastocytes, les basophiles et les polynucléaires (ROITT et al., 1985).

Enfin, certains autoantigènes peuvent apparaître à la surface des cellules, ce qui les rendrait disponibles à la liaison par les autoanticorps. Ce mécanisme a été produit expérimentalement avec un modèle humain comportant des kératinocytes épidermiques néonataux exposés à une radiation UV. Une immunofluorescence avec des IgG polyclonaux humains de sérums lupiques a démontré une expression membranaire active d'autoantigènes comme Ro/SS-A, RNP ou Sm. Le dommage causé aux kératinocytes se ferait par l'intermédiaire d'une lyse ADCC («antibody-dependant cellular cytotoxicity») par des lymphocytes et des macrophages (LeFEBER et al., 1984; Furukawa et al., 1990).

1.1.6 MALADIES AUTOIMMUNES

1.1.6.1 DÉFINITION

Une maladie autoimmune organospécifique, comme la thyroïdite, affecte un seul organe et des autoanticorps et/ou une réactivité des lymphocytes T sont habituellement dirigés contre des autoantigènes spécifiques de cet organe. Le phénomène autoimmun systémique (ou généralisé) comporte

un large spectre d'autoanticorps impliquant des autoantigènes présents chez plusieurs organes (SCHUMACHER et al., 1988). Trois maladies autoimmunes particulièrement d'intérêt pour ce travail sont présentées ici: le lupus érythémateux disséminé (LED), le syndrome de Sjögren (SS) et la polyarthrite rhumatoïde (PR).

1.1.6.2 LUPUS ÉRYTHÉMATEUX DISSÉMINÉ

Le LED est une maladie inflammatoire chronique qui résulterait d'un désordre immunorégulatoire relié à des facteurs génétiques, hormonaux ou environnementaux. La description originale a été réalisée par Bielt en 1822; le terme lupus érythémateux a été utilisé pour la première fois par Cazenave en 1851 pour décrire les manifestations cutanées. Plus tard, Kaposi et Osler se sont attardés à la nature systémique de la maladie. Des critères révisés pour la classification du LED ont été établis en 1982 (SCHUMACHER et al., 1988).

Le LED semble provenir d'un dérangement de la régulation immune qui mènerait à, ou résulterait d'une activation polyclonale des lymphocytes B menant à la production d'une large variété d'autoanticorps comme montré dans le Tableau 1. Des anticorps antinucléaires (AAN) sont présents dans presque tous les sérums de patients. Les anticorps anti-ADN, découverts en 1960, demeurent les marqueurs les plus spécifiques de la maladie. Des anti-ADN

Tableau 1: Lupus érythémateux disséminé: nature des autoantigènes et prévalence des autoanticorps

Les autoantigènes marqués d'un astérisque sont ciblés par des autoanticorps très spécifiques à la maladie (Tiré de Tan et al., 1988).

Nature de l'autoantigène	Prévalence des auto-anticorps (%)	Caractéristiques moléculaires
ADN natif*	40	ADN double brin
ADN dénaturé	70	ADN simple brin
Histones	70	Classes H1, H2A, H2B, H3 et H4
Sm*	30	Protéines 28, 29, 16 et 13 kDa complexées avec les ARN U1, U2, U4, U5 et U6
RNP nucléaire (U1 RNP)	32	Protéines 33 et 22 kDa complexées avec l'ARN U1
SS-A/Ro	35	Protéine 60 kDa complexée avec les ARN Y1-Y5
SS-B/La	15	Phosphoprotéine 48 kDa complexée avec les transcrits de l'ARN polymérase III
Ku	10	Protéines 66 et 86 kDa
RNP ribosomale	10	Phosphoprotéines 38, 16 et 15 kDa
PCNA/cycline	3	Protéine 36 kDa
ARN Alu-protéine	Rare	Protéine 68 kDa complexée avec l'ARN Alu

à double brin (natifs) sont presque uniques au LED alors que des anti-ADN à simple brin (dénaturés) sont retrouvés chez une grande variété d'autres maladies rhumatismales. De plus, des autoanticorps reconnaissant des antigènes nucléaires solubles ou ENA («extractable nuclear antigen») sont également caractéristiques du LED: anti-U1 RNP, anti-Sm, anti-Ro/SS-A et anti-La/SS-B (TAN et al., 1988).

Ces autoanticorps peuvent participer à la pathogénèse comme constituants de complexes immuns (hypersensibilité de type III) se déposant dans les articulations, les petits vaisseaux ou les glomérules rénaux. Les autoanticorps peuvent aussi interagir directement avec un autoantigène membranaire *in situ* ou avec un autoantigène déposé dans la membrane basale (SCHUMACHER et al., 1988).

1.1.6.3 SYNDROME DE SJÖGREN

Le syndrome de Sjögren (SS) est un désordre autoimmun et inflammatoire chronique caractérisé par une diminution de la sécrétion des glandes lacrymales et salivaires (complexe sec ou sicca) résultant en une kératoconjonctivite sèche (yeux secs) et une xérostomie (bouche sèche). Le SS peut se présenter seul (forme primaire ou complexe sicca), c'est-à-dire sans aucune autre pathologie associée, ou il peut accompagner une autre maladie du tissu conjonctif (forme secondaire) comme la polyarthrite rhumatoïde ou le LED.

Des AAN existent chez 50 à 80% des patients et les autoanticorps retrouvés dans le SS sont pour la plupart non-spécifiques d'organes. Les autoanticorps anti-La/SS-B sont représentés chez plus de 60% des patients souffrant de SS primaire. Les autoanticorps anti-Ro/SS-A sont moins spécifiques du SS.

Les facteurs étiologiques impliqués semblent être génétiques, immunologiques, hormonaux et probablement infectieux puisque des molécules Ia (DR) et le virus Epstein-Barr ont été détectés dans l'épithélium des glandes salivaires. Le mécanisme exact du dérangement immunitaire n'est pas connu (SCHUMACHER et al., 1988).

1.1.6.4 POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un désordre inflammatoire chronique d'étiologie inconnue impliquant une inflammation articulaire qui résulte habituellement en une destruction progressive de l'articulation, des difformités et un degré variable d'invalidité. D'autres manifestations cliniques complètent le profil de cette pathologie systémique (SCHUMACHER et al., 1988).

Une particularité sérique de la PR est la présence de facteur rhumatoïde (FR) qui est un autoanticorps spécifique à des déterminants antigéniques existant dans des régions homologues C-gamma 2 et C-gamma 3 de la portion Fc de l'IgG humain natif. De plus, des autoanticorps anti-ADN (simple brin surtout) et d'autres autoanticorps dirigés contre des antigènes nucléaires existent à faibles titres chez un petit pourcentage de patients.

Deux processus immunologiques peuvent contribuer à l'inflammation et à la destruction tissulaire. Un premier mécanisme impliquerait une interaction entre un autoantigène articulaire et un autoanticorps vraisemblablement produit localement pour former un complexe immun. Un phénomène d'immunité cellulaire peut également entrer en jeu. Les macrophages de la membrane synoviale agissent comme APC pour l'activation des lymphocytes Th et Tc. Ils occuperaient donc un rôle central dans la pathogenèse de la PR en menant

à la production d'autoanticorps et en stimulant les cellules synoviales bordantes, les chondrocytes et les ostéoclastes à croître et à produire des médiateurs chimiques capables de détruire les tissus articulaires (SCHUMACHER et al., 1988).

1.2 PROPRIÉTÉS MOLÉCULAIRES DES AUTOANTIGENES Ro/SS-A ET La/SS-B

1.2.1 CLASSES DE RIBONUCLÉOPROTÉINES RECONNUES PAR LES AUTOANTICORPS

Les autoanticorps ont classiquement été définis par la technique d'immunodiffusion en gel d'agarose, utilisant des extraits tissulaires et cellulaires totaux. Plus récemment, les techniques d'immunoprécipitation et d'immunobuvardage ont permis d'étudier les caractéristiques moléculaires des autoantigènes.

Les systèmes antigène/anticorps impliqués dans les maladies autoimmunes ont souvent été les premiers outils de détection de ces macromolécules. L'immunoprécipitation d'extraits cellulaires humains et murins avec des sérums de spécificités anti-Ro/SS-A et anti-La/SS-B a mis en évidence des petits ARN liés de façon non-covalente avec des polypeptides spécifiques pour former des complexes ribonucléoprotéiques (HENDRICK et al., 1981; LERNER et al., 1981b).

Avec des sérums de patients souffrant de diverses maladies autoimmunes, de nouvelles classes de ribonucléoprotéines de mammifères ont été détectées et pour certaines, la fonction intracellulaire a été élucidée (Tableau 2). En plus des différentes classes d'ARN cellulaires bien connues, les petits ARN ont été décrits récemment comme une classe additionnelle distincte. Selon leur localisation

Tableau 2: Particules de ribonucléoprotéines reconnues
par les autoanticorps

Le tableau montre les différentes classes de
ribonucléoprotéines nucléaires et cytoplasmiques
reconnues par des autoanticorps
(Tiré de HARDIN et MIMORI, 1985)

ND: non-disponible

AUTOANTICORPS	RIBONUCLÉOPROTÉINES		
	ARN	PROTÉINES	FONCTIONS
SnRNP Anti-U1 RNP	U1	68 Kd A, B', C B, D, E, F et G	Lie le site d'épissage en 5' du pré- mARN
Anti-U2 RNP	U2	A', B'', D, E, F et G	Epissage des précurseurs de mARN
Anti-Sm	U1, U2, U4/U6 U5	B', B et D ?	
Anti-U3	U3	Fibrillarine	ND
Anti-La (SS-B)	ARN La (Trans. de pol. III)	50 kDa	Participe à la synthèse de l'ARN comme cofac- teur pour l'ARN poly- mérase III
Anti-Th	ARN Th (7.2 et 8.2)	ND	ND
Anti-hn RNP	ARN hn	31-42 kDa	Précurseurs du pré-mARN
Anti-5S rARN	5S rARN	35 kDa	Trad. prot.
ScRNP Anti-Ro(SS-A)	ARN Ro (Y1-Y5)	60 kDa 52 kDa???	?
Anti-Jo-1	tARN ^{His}	Histidyl-tARN synthétase	Histidyl-tARN synthétase
Anti-tARN	tARN	?	?

intracellulaire, on les nomme petits ARN nucléaires (snARN) ou cytoplasmiques (scARN). La plupart sont retrouvés en association non-covalente avec des protéines pour former des particules de ribonucléoprotéines (HARDIN et MIMORI, 1985; LERNER et STEITZ, 1981).

Les déterminants antigéniques reconnus par les autoanticorps sont habituellement localisés sur la portion protéique de la ribonucléoprotéine. En effet, l'activité antigénique des autoantigènes Ro/SS-A et La/SS-B est résistante au traitement à la RNase et les constituents protéiques sont reconnus par des sérums autoimmuns dans des conditions où ils sont séparés de l'ARN (REICHLIN, 1986). De plus, des autoanticorps anti-ARN (non-associé aux protéines) ont parfois été détectés (HOET et VAN VENROOIJ., 1992).

1.2.2 CARACTÉRISATION DE L'AUTOANTIGÈNE Ro/SS-A

L'autoantigène Ro/SS-A a été décrit initialement comme une ribonucléoprotéine cytoplasmique (scrNP). Des autoanticorps de cette spécificité sont détectés par ELISA chez presque 96% des patients souffrant de SS et chez environ 48% des patients atteints de LED (REICHLIN, 1986; SLOBBE et al. 1991b).

L'autoantigène nommé Ro a été détecté pour la première fois en 1969 par immunodiffusion avec des sérums de patients atteints du SS ou du LED en utilisant la fraction

cytoplasmique soluble d'une variété de tissus humains (CLARK et al., 1969). ALSPAUGH et TAN (1975) ont décrit, par immunodiffusion avec des sérums SS et un extrait cellulaire Wil-2, deux autoantigènes désignés SS-A et SS-B (ALSPAUGH et TAN., 1975; ALSPAUGH et al., 1976). Un échange de sérums et d'extraits cellulaires entre différents laboratoires a mené à la reconnaissance de l'identité immunologique entre Ro et SS-A, désormais nommé Ro/SS-A (ALSPAUGH et MADDISON, 1979).

WOLIN et STEITZ (1984) ont déterminé, par immunoprécipitation de ribonucléoprotéines Ro/SS-A marquées *in vivo* avec [³⁵S]-méthionine, qu'un polypeptide antigénique de 60 kDa est la forme majeure de la protéine Ro/SS-A des cellules HeLa.

La ribonucléoprotéine Ro/SS-A humaine contient un des 4 petits ARN hY1 (hY2), hY3, hY4 et hY5 (80-112 bases) lié en complexe non-covalent avec la protéine Ro/SS-A de 60 kDa. L'ARN hY2 est un dérivé tronqué de hY1 (HENDRICK et al., 1981; STEITZ et al., 1982). Les ARN Ro/SS-A humains sont peu abondants (10⁵ copies par cellule environ) et sont présents chez plusieurs espèces de mammifères, différant en nombre et en séquence. Chez toutes les espèces examinées, un ARN comigrant avec hY1 a été détecté (MAMULA et al., 1989b; PRUIJN et al., 1990).

En 1982, l'ARN C8 (4.5S) des cellules HeLa a été séquencé, puis identifié à hY5 par identité des fragments de digestion

à la RNase T1 et de l'extrémité 5'-terminale (KATO et al., 1982). Par la suite, un fragment génomique de 4 Kb codant pour la séquence entière de hY1 (hY2) et hY3 a été cloné à partir d'une librairie λ Charon 4A de placenta humain (WOLIN et STEITZ, 1983). Les gènes hY1 (hY2) et hY3 ont ensuite été clonés de façon indépendante; ils existent en une seule copie dans le génome humain, contrairement aux copies multiples des ARN structuraux comme les tARN et les rARN. L'ARN hY4 a été cloné et séquencé récemment à partir d'une librairie de cADN hY de réticulocytes humains. Les ARN hY1 et hY4 des cellules érythroïdes anucléées sont homologues à leurs correspondants des cellules HeLa, mais ils sont légèrement plus courts (O'BRIEN et HARLEY, 1990).

Les ARN hY1-hY5 présentent une importante homologie de séquence et de structure secondaire (Figure 1). Une région conservée chez les ARN Ro/SS-A est formée par complémentarité des extrémités 5' et 3' (base de l'ARN). Cette structure constitue le site de liaison de la protéine Ro/SS-A de 60 kDa (WOLIN et STEITZ, 1984).

Une protéine Ro/SS-A de 52 kDa récemment décrite (BENCHETRIT et al., 1988) chez des lignées cellulaires humaines est la cible d'autoanticorps retrouvés dans plus de 80% des sérums anti-Ro/SS-A (SS) ayant une spécificité pour la protéine Ro/SS-A 60 kDa. Les 2 protéines ont été clairement

Figure 1: Structure secondaire des ARN Ro/SS-A humains

La figure montre la structure secondaire des ARN Ro/SS-A humains hY1-hY5 (Tiré de SLOBBE et al., 1991a).

distinguées du point de vue immunologique, à cause de l'existence de sérums reconnaissant exclusivement l'une ou l'autre des protéines, de l'absence de fragments communs à la protéolyse partielle et de l'absence de réactivité croisée entre les anticorps purifiés par affinité sur les 2 protéines (BEN-CHETRIT et al., 1988). Des ribonucléoprotéines Ro/SS-A ont été immunoprécipitées avec des anticorps anti-60 kDa et anti-52 kDa purifiés par affinité. La détection des ARN Ro/SS-A dans les 2 cas a laissé présumer que les 2 protéines sont présentes dans les particules Ro/SS-A. Par contre, un site de liaison de la protéine 52 kDa avec l'ARN n'a pas encore été déterminé. Une interaction par l'intermédiaire d'une autre protéine a été proposée (PRUIJN et al., 1991; ITOH et al., 1991; SLOBBE et al., 1991a).

Une hétérogénéité de l'autoantigène Ro/SS-A a été mise en évidence dans des cellules humaines nucléées (lymphocytes) et anucléées (cellules érythroïdes). En plus d'une protéine de 60 kDa antigéniquement distincte de celle des cellules HeLa, le globule rouge contient une protéine de 54 kDa, par opposition à une protéine de 52 kDa existant chez les lymphocytes. Ces polypeptides sont retrouvés en association avec les ARN hY1 et hY4 (RADER et al., 1989; ITOH et al., 1990). Donc, une expression différentielle au niveau des protéines et des ARN existe chez différents types cellulaires à l'intérieur d'une même espèce.

Le polypeptide Ro/SS-A de 60 kDa a été cloné par 2 équipes. DEUTSCHER et al. (1988) ont criblé une librairie λ gt11 de placenta humain avec des sérums ou des anticorps de lapin anti-Ro/SS-A. Un clone de cADN de 1614 paires de bases (538 acides aminés) codant pour une protéine de masse moléculaire 60.6 kDa a été isolé et son identité avec la protéine 60 kDa des cellules HeLa a été établie par cartographie peptidique. L'équipe de BEN-CHETRIT (1989) a isolé un clone de cADN de 1.8 Kb (525 acides aminés) par criblage d'une librairie λ gt11 de cellules Molt-4 humaines avec un sérum anti-Ro/SS-A. La protéine de 57.5 kDa correspond au Ro/SS-A 60 kDa des cellules HeLa. Les clones isolés par ces 2 groupes sont identiques sauf au niveau de l'extrémité C-terminale. Ces séquences légèrement divergentes peuvent provenir de l'expression différentielle de 2 gènes Ro/SS-A ou plus vraisemblablement, de l'épissage alternatif d'un seul gène 60 kDa (BEN-CHETRIT et al., 1989).

La séquence de la protéine 60 kDa comporte un motif RNP consensus qui est une caractéristique commune à plusieurs protéines liant l'ARN et possiblement d'autres protéines (DEUTSCHER et al., 1988). Une autre structure nommée doigt-de-zinc («zinc finger»), originalement décrite chez les protéines liant l'ADN, est retrouvée dans la séquence de la protéine Ro/SS-A 60 kDa (DEUTSCHER et al., 1988; BEN-CHETRIT et al., 1989) et serait impliquée dans la liaison de protéines à l'ARN ou à d'autres protéines (BERG, 1990).

Le clonage de la protéine Ro/SS-A de 52 kDa a été effectué par 2 équipes. Un clone a d'abord été obtenu à partir d'une librairie λ gt11 de thymocytes humains avec un sérum anti-52 kDa de patient lupique (ITOH et al., 1991). Le fragment de cADN de 1425 nucléotides (475 acides aminés) code pour la protéine complète de masse moléculaire 54.108 kDa. En parallèle, par criblage d'une librairie Hep-2 de foie humain avec un sérum anti-52 kDa (SS), un clone de 43 kDa correspondant à 80% de la séquence complète a d'abord été identifié. A l'aide d'un oligonucléotide représentant une portion de l'extrémité 5' de ce clone, un cADN de 1.9 Kb (475 acides aminés) a été détecté à partir d'une librairie de cellules Molt-4 et code pour une protéine de masse moléculaire 54.082 kDa (CHAN et al., 1991; CHAN et al., 1990). Les 2 clones sont essentiellement identiques.

L'extrémité N-terminale du Ro/SS-A 52 kDa contient une région occupée par des domaines doigt-de-zinc, ainsi qu'une structure appelée «leucine-zipper», décrite chez des protéines dimériques liant l'ADN et agissant comme facteur de transcription (ITOH et al., 1991; CHAN et al., 1991; LANDSCHULZ et al., 1988). Des séquences RNP consensus semblent absentes de la protéine Ro/SS-A de 52 kDa, ce qui fait croire qu'elle n'interagit pas directement avec les ARN.

La localisation intracellulaire de l'antigène Ro/SS-A est controversée. La particule a été décrite à l'origine en

1969 comme étant un antigène soluble présent dans la fraction cytoplasmique de plusieurs tissus humains (CLARK et al., 1969). Cependant, l'antigène Ro/SS-A a été démontré par immunofluorescence indirecte à la fois dans le noyau et le cytoplasme de cellules Hep-2 avec des sérums humains anti-Ro/SS-A et des anticorps humains anti-60 kDa et anti-52 kDa monospécifiques (ELKON et JANKOWSKI, 1985; BEN-CHETRIT et al., 1988; SLOBBE et al., 1991b), tandis que plusieurs groupes ont rapporté une localisation uniquement nucléaire (mouchetée) chez des cellules Wil-2 (ALSPAUGH et al., 1976; ELENITSAS et l., 1986), des cellules Hep-2 (MAMULA et al., 1989b) et chez des tissus de plusieurs espèces de mammifères, ainsi que sur une variété de cellules humaines (HARMON et al., 1984; XIA et al., 1987; WERMUTH et al., 1985).

Deux fonctions ont été proposées pour la particule Ro/SS-A. La ribonucléoprotéine Ro/SS-A pourrait être impliquée dans le contrôle de la distribution des mARN sous forme traductionnellement active (associée aux polyribosomes) ou inactive, en complexe mRNP (WOLIN et STEITZ, 1983; KATO et al., 1982). En faveur de cette hypothèse, l'antigène Ro/SS-A aurait été identifié dans un complexe hnRNP possédant une activité endoribonucléase VII, impliquée dans la liaison et la dégradation des chaînes poly-U. Cette particule contient un ARN qui serait un ARN Ro/SS-A associé aux protéines Ro/SS-A et La/SS-B. Réciproquement,

l'activité endoribonucléase VII aurait été isolée de ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées par chromatographie d'affinité (BACHMANN et al., 1986; BACHMANN et al., 1987). Par ailleurs, la présence de doigt-de-zinc liant des acides nucléiques dans la séquence des protéines Ro/SS-A 60 kDa et 52 kDa suggère une similarité avec le facteur de transcription TFIIIA de Xenopus laevis et a permis de suggérer un rôle de régulation de transcription pour l'antigène Ro/SS-A (BEN-CHETRIT et al., 1989).

1.2.3 CARACTÉRISATION DE L'AUTOANTIGÈNE La/SS-B

L'autoantigène La/SS-B est une ribonucléoprotéine d'origine nucléaire («snurp» ou snRNP) contre laquelle sont dirigés des autoanticorps détectés par tests ELISA chez environ 87% des patients souffrant de SS et chez environ 24% des patients atteints de LED (REICHLIN, 1986; SLOBBE et al., 1991a).

La particule La/SS-B a été définie initialement par MATTIOLI et REICHLIN (1974) comme un antigène cytoplasmique, par immunofluorescence chez des thymocytes entiers et des préparations cytoplasmiques de thymus de veau. L'antigène SS-B a été identifié par immunodiffusion dans des extraits cellulaires Wil-2 (ALSPAUGH et TAN, 1975; ALSPAUGH et al., 1976). Il a finalement été reconnu en 1979 que La et SS-B sont immunologiquement identiques, d'où l'appellation La/SS-B (ALSPAUGH et MADDISON, 1979).

La particule La/SS-B, abondante dans les cellules de mammifères, contient une protéine de 50 kDa très sensible à la protéolyse qui conduit rapidement à un polypeptide de 43 kDa et à plusieurs autres de plus petites masses moléculaires (ELKON et CULHANE, 1984; ELKON et JANKOWSKI, 1985).

Les ARN présents dans la ribonucléoprotéine La/SS-B sont hétérogènes et la plupart sont des transcrits primaires de

l'ARN polymérase III eucaryote, c'est-à-dire des précurseurs des ARN matures correspondants (HENDRICK et al., 1981). L'immunoprécipitation d'extraits cellulaires avec des sérums humains anti-La/SS-B démontre que le polypeptide de 50 kDa s'associe avec une variété d'ARN, comme des transcripts viraux, soit EBER I et II du virus EBV (LERNER et al., 1981a) et VA I et II de l'adénovirus de type 2 (PIZER et al., 1983) ainsi que des précurseurs de tARN, 5S rARN et U6 sn ARN des cellules HeLa (RINKE et STEITZ, 1982 et 1985), l'ARN Ro/SS-A hy5, l'ARN 4.5S murin et plusieurs autres ARN (HENDRICK et al., 1981).

L'irradiation UV *in vitro* de complexes d'ARN VAI avec une source cellulaire de La/SS-B, créant une liaison covalente entre les 2 composantes, démontre que le site de réticulation contient la chaîne poly-U en 3' de l'ARN VAI (FRANCOEUR et MATHEWS, 1982; MATHEWS et FRANCOEUR, 1984). Durant la maturation des transcripts de l'ARN polymérase III, cette chaîne de poly-U est clivée et l'interaction avec la protéine La/SS-B est perdue. Par contre, certains de ces ARN matures, comme EBER, VA et Ro/SS-A, conservent le site de liaison de la protéine La/SS-B (STEITZ et al., 1982).

A partir d'une librairie d'expression λ gt11 de foie humain, CHAMBERS et KEENE (1985) ont isolé 2 clones partiels pour la protéine La/SS-B: un clone La-6 codant pour 122 acides aminés et un clone La-8 codant pour 55 acides aminés. Ces

clones ont servi à sélectionner, par hybridation, des mARN La/SS-B à partir d'ARN totaux de cellules HeLa. La traduction *in vitro* a mené à la production d'une protéine de 50 kDa représentant un polypeptide La/SS-B authentique (CHAMBERS et KEENE, 1985). Par criblage d'une librairie λ gt10 d'une lignée cellulaire Burkitt avec une sonde dérivée du clone de 55 acides aminés, STURGESS et al. (1988) ont obtenu un clone partiel La/SS-B codant pour 355 acides aminés et spécifiant une protéine de 40.1 kDa. Des clones de gADN et cADN pour la protéine La/SS-B complète (408 acides aminés, 46.7 kDa) ont été obtenus par CHAMBERS et al. (1988).

La protéine La/SS-B a une susceptibilité protéolytique intrinsèque causant la production de plusieurs polypeptides de plus petites masses moléculaires, demeurant antigéniques (HOCH et BILLINGS, 1984). Les polypeptides humains et bovins possèdent des séquences «PEST» (riches en résidus proline, acide glutamique, sérine et thréonine) conférant aux protéines qui les contiennent une susceptibilité accrue aux protéases intracellulaires (CHAN et al., 1989; ROGERS et al., 1986). Les protéines La/SS-B humaine et bovine contiennent, dans le domaine N-terminal, un motif RNP-80, semblable à celui qui est retrouvé chez d'autres protéines liant l'ARN (CHAN et al., 1989).

La ribonucléoprotéine La/SS-B, définie par MATTIOLI et REICHLIN (1974) comme étant un antigène cytoplasmique, a été localisée dans le noyau et/ou le nucléole par technique

d'immunofluorescence en utilisant des sérums humains ou des anticorps monoclonaux de souris anti-La/SS-B chez des cellules Hep-2 (ELKON et JANKOWSKI, 1985; BACHMANN et al., 1986). De façon plus précise, il a été déterminé, à l'aide de cellules Wil-2 synchronisées et des sérums humains anti-La/SS-B, que la localisation intracellulaire de l'antigène varie en fonction de l'étape du cycle cellulaire (ELENITSAS et al., 1986). L'autoantigène La/SS-B effectue une navette nucléocytoplasmique dans des conditions d'inhibition de transcription. Par exemple, l'immunofluorescence avec des sérums humains purifiés par affinité ou des anticorps monoclonaux de souris anti-La/SS-B sur des cellules CV-1 de singe montre que, durant l'inhibition de transcription de l'ARN polymérase III, l'antigène La/SS-B est déplacé vers le cytoplasme et retourne ensuite au noyau après une inhibition prolongée (BACHMANN et al., 1989a et b).

Des épitopes linéaires de la protéine La/SS-B ont été identifiés en immunobuvardage et par tests ELISA avec des sérums de patients LED et SS et des fragments recombinants de la protéine. Les nombreux épitopes rapportés pour la protéine La/SS-B (Figure 2) couvrent la séquence entière des 408 acides aminés. Il est difficile d'effectuer des rapprochements entre les groupes puisque les niveaux de liaison ne peuvent pas être comparés et peu de sérums anti-La/SS-B ont été utilisés (SLOBBE et al., 1991a).

Figure 2: Localisation des divers épitopes de la protéine La/SS-B mis en évidence par différents groupes

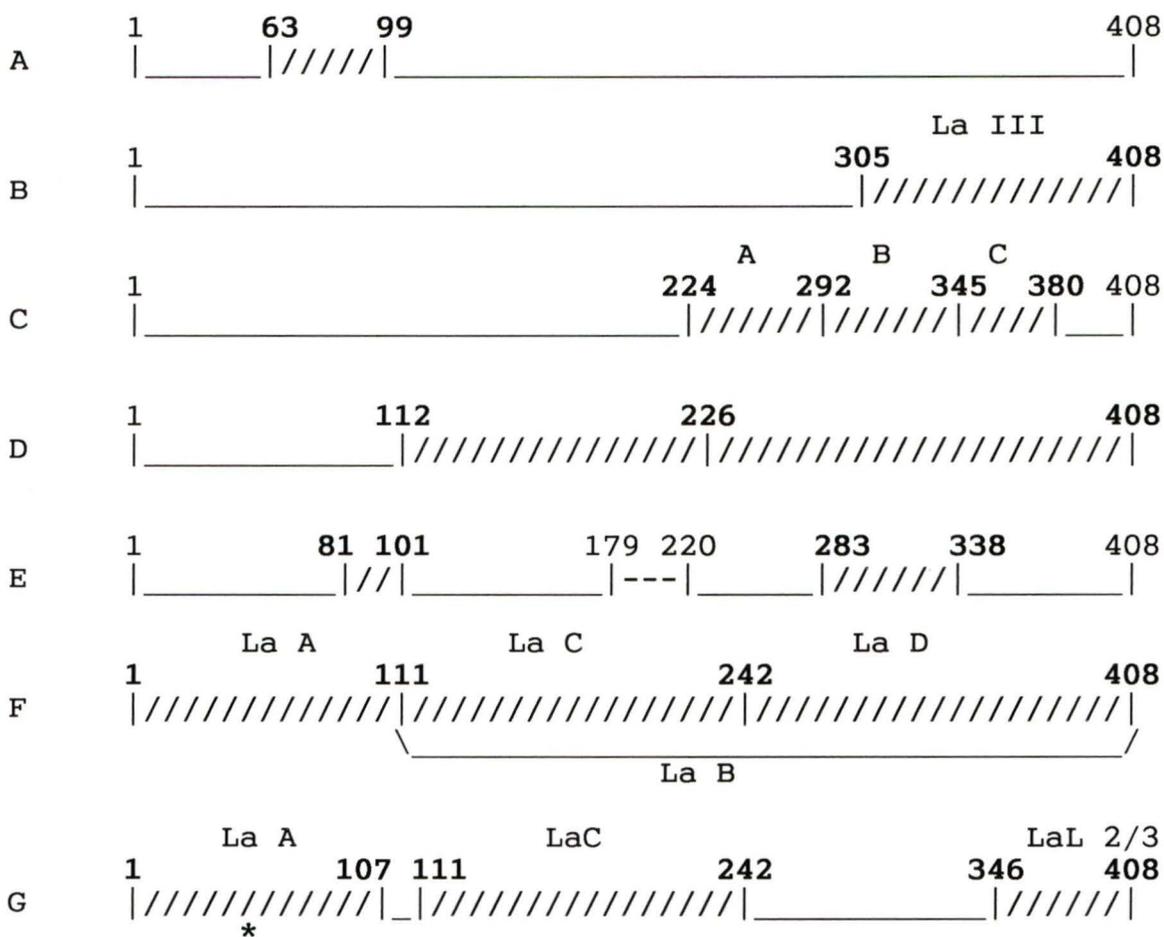
- A: CHAMBERS et KEENE, 1985
- B: STURGESS et al., 1988
- C: RAUH et al., 1988
- D: BINI et al., 1990
- E: KOHSAKA et al., 1990
- F: ST-CLAIR et al., 1988 et 1990
- G: McNEILAGE et al., 1990

Les régions hachurées représentent les épitopes majeurs; un épitope mineur apparaît en pointillé. Les noms attribués à certains épitopes sont indiqués au-dessus du segment concerné.

* Selon McNEILAGE et al. (1992), cet épitope conformationnel ou discontinu dépendrait des régions d'acides aminés 12-28 et 82-99 pour son expression.

N-terminal

C-terminal



RINKE et STEITZ (1982) ont attribué à la protéine La/SS-B un rôle probable dans la transcription, la maturation ou le transport hors du noyau des transcripts de l'ARN polymérase III, avec lesquels elle s'associe transitoirement après la transcription. GOTTLIEB et STEITZ (1989a et 1989b) ont défini la protéine La/SS-B comme un facteur de terminaison de transcription de l'ARN polymérase III selon le mécanisme suivant: la polymérase arrête la transcription au signal de terminaison puis, en présence de La/SS-B, l'enzyme transcrit la chaîne poly-U 3', libère le transcript naissant d'ARN et rend l'ADN ainsi que la polymérase disponibles pour d'autres cycles de transcription. En absence de La/SS-B, la polymérase s'arrête avant la synthèse du poly-U, créant un complexe transcriptionnel «gelé» (GOTTLIEB et STEITZ, 1989a et b). De plus, la protéine La/SS-B a été caractérisée comme ayant une activité hélicase, c'est-à-dire de fusion d'hybrides ADN/ARN ou ARN/ARN en présence de (d)ATP, ce qui crée un rapprochement avec le facteur rho de terminaison de transcription procaryote qui possède des propriétés semblables (BACHMANN et al., 1990a et b).

Plusieurs systèmes d'autoanticorps coexistants sont connus, comme les anti-SmRNP/anti-U1snRNP, les anti-histone/anti-ADN et les anti-U1 snRNP/anti-hnRNP (HARDIN, 1986). MATTIOLI et REICHLIN (1974) ont observé que 8 sérums anti-La/SS-B sur 9 possèdent aussi des anticorps anti-Ro/SS-A, suggérant une

association physique entre les autoantigènes Ro/SS-A et La/SS-B. Il a été déterminé par la suite que la protéine La/SS-B est présente dans un sous-groupe de ribonucléoprotéines Ro/SS-A par immunoprécipitation des ARN Ro/SS-A humains et murins avec des sérums ou un anticorps monoclonal humains anti-La/SS-B. Des particules Ro/SS-A portent donc conjointement les déterminants antigéniques La/SS-B et Ro/SS-A ce qui explique la haute fréquence de coexistence des autoanticorps anti-Ro/SS-A et anti-La/SS-B dans un même sérum de patient (HENDRICK et al., 1981; MAMULA et al., 1989a).

1.2.4 INTÉRÊT DE L'ÉTUDE DES PARTICULES RIBONUCLÉOPROTÉIQUES NATIVES

Les autoanticorps peuvent reconnaître la structure primaire (déterminants antigéniques linéaires) ou secondaire (déterminants antigéniques conformationnels) à la surface des autoantigènes. Les déterminants antigéniques linéaires sont constitués par une portion de séquence primaire de résidus alors que les déterminants antigéniques conformationnels sont formés suite à l'acquisition de la structure tridimensionnelle de la macromolécule (BARLOW et al., 1986).

Plusieurs études suggèrent que les autoanticorps dirigés contre des déterminants antigéniques conformationnels constituent une composante majeure de la réponse autoimmune.

Récemment, notre laboratoire a identifié des sérums anti-Ro/SS-A qui reconnaissent le Ro/SS-A dans des analyses qui préservent la structure native de l'antigène et non dans des conditions de dénaturation antigénique. Après épuisement de la population d'autoanticorps dirigés contre l'antigène Ro/SS-A 60 kDa dénaturé, la plupart des sérums contiennent encore de haut titres d'autoanticorps anti-conformationnels (BOIRE et al., 1991). Nous avons également démontré que certains sérums anti-Ro/SS-A contiennent une population d'autoanticorps reconnaissant un épitope spécifiquement humain sur la ribonucléoprotéine contenant l'ARN hY5, ou RohY5 (BOIRE et CRAFT, 1989).

Ces données suggèrent un mécanisme de sélection d'un autoantigène par le système immunitaire: chez un hôte génétiquement prédisposé à l'autoimmunité, l'instabilité évolutionnaire (épitopes spécifiquement humains), contribuerait à la sélection préférentielle d'un autoantigène. L'accessibilité de cet épitope en surface de la macromolécule native et son association avec le site fonctionnel de l'autoantigène participeraient également à la sélection de ces épitopes par le système immunitaire. Il est vraisemblable que la fonction de l'autoantigène, comme la liaison ou la modification d'un acide nucléique, joue aussi un rôle. En effet, les épitopes conformationnels ciblés par les autoanticorps sont souvent associés avec le site fonctionnel de la particule puisque plusieurs autoanticorps

inhibent la fonction cellulaire de ces autoantigènes (dans le cas où elle est connue). Par exemple, des autoanticorps anti-Sm et anti-RNP inhibent l'épissage des précurseurs de mARN. Il est donc important de déterminer la spécificité des autoanticorps ainsi que la structure moléculaire et la fonction des autoantigènes ciblés dans le but d'élucider les mécanismes précoces du processus autoimmun (TAN et al., 1988; TAN, 1989). Peu d'études se sont jusqu'à présent intéressées à la structure «native» des autoantigènes. La caractérisation des particules intactes purifiées permettra de comprendre ce qui déclenche le processus d'autoimmunisation durant lequel un autoantigène normalement non-immunogène devient une cible privilégiée du système immunitaire. Nous sommes intéressés à la contribution à l'antigénicité des déterminants antigéniques instables (humains) et conformationnels du système Ro/SS-A et plus particulièrement, à l'hétérogénéité des ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées et à la présence des polypeptides associés.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 PRÉPARATION DE Ro/SS-A D'EXTRAIT PLACENTAIRE HUMAIN

Le placenta fraîchement obtenu est lavé dans la saline physiologique (NaCl 0.9%) et le tissu est haché finement sur glace après l'élimination des parties fibreuses de l'enveloppe. Une homogénéisation est effectuée dans un tampon PBS (phosphate 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM) contenant du dithiothréitol (DTT) 1 mM et du fluorure de phényl méthyl sulfonyle (PMSF) 1 mM, pendant 5 à 10 minutes, à 4°C. L'homogénat est clarifié par centrifugation à 10000 rpm, pendant 1 heure, à 4°C (centrifugeuse Sorvall, rotor GSA). Le surnageant obtenu est utilisé comme extrait total.

Cet extrait clarifié est mis en contact pendant environ 1 heure à 4°C avec du DEAE-cellulose de type DE-52 (1 g pour 2 g de placenta), équilibré dans le tampon PBS. Après ce temps, le matériel non-adsorbé est éliminé par lavage avec du tampon PBS, puis une élution est effectuée avec un tampon PBS/NaCl 300 mM contenant DTT et PMSF 1 mM. Le filtrat est dilué à 150 mM NaCl avec un tampon phosphate 10 mM, (pH 7.4), DTT et PMSF 1 mM.

L'extrait élué de l'échangeur DEAE-cellulose est purifié sur diverses colonnes: échangeurs cationiques faible (CMC) et fort (SP Séphadex C-50), hydroxyapatite et résines préparatives (Sep-Pak: QMA, Silica, CN et C18, Waters).

Les échangeurs cationiques sont équilibrés dans le PBS à des pH variant de 2.0 à 7.4. Les extraits dilués et ajustés au pH approprié sont mis en contact avec la résine pendant 1 heure, à 4°C. Le surnageant est récupéré par une centrifugation à basse vitesse et est titré à pH 7.4.

L'hydroxyapatite, équilibrée comme décrit ci-haut, est incubée pendant 1 heure, à 4°C avec l'extrait dilué. Après le lavage avec le PBS, une élution est effectuée successivement avec des tampons PBS/NaCl 150 mM contenant du phosphate 50 mM, 80 mM, 120 mM et 200 mM.

Les colonnes préparatives Sep-Pak (QMA, Silica et CN) sont équilibrées comme ci-haut. L'extrait est fixé sur la colonne puis, après le lavage du matériel non-adsorbé avec le PBS, une élution est réalisée avec un tampon PBS/NaCl 300 mM. La colonne C18 (phase inversée) est hydratée dans le méthanol avant d'être mise en présence de tampons aqueux; le matériel non-adsorbé est éliminé par lavage avec PBS/NaCl 300 mM et l'élution s'effectue avec PBS/NaCl 150 mM.

Tous les échantillons recueillis à chaque étape sont concentrés par dialyse contre une solution de polyéthylène glycol dissout dans le PBS ou bien lyophilisés, pour analyse subséquente.

2.2 PRÉPARATION D'EXTRAIT TOTAL DE CELLULES HeLa

Les cellules HeLa obtenues de l'"American Type Culture Collection" (Rockville, MD) sont maintenues en culture à 37°C, sous une atmosphère d'air contenant 5% CO₂/95% air dans un milieu RPMI 1640, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté à la chaleur et 100 µg/ml de chacun des antibiotiques pénicilline et streptomycine.

Les cellules sont récupérées par centrifugation à basse vitesse et lavées 2 fois dans un tampon TBS stérile (Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 120 mM) contenant du MgCl₂ 1.5 mM et ZnCl₂ 50 µM, puis resuspendues dans un tampon Net-2 stérile (Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 120 mM, Nonidet P-40 0.05%) contenant du MgCl₂ 1.5 mM et ZnCl₂ 50 µM, à raison d'environ 1 ml de Net-2 par 100 X 10⁶ cellules. Des inhibiteurs de protéases (CLAP 1/1000:[chymostatine, leupeptin, antipain, pepstatine-0.5 mg/ml chacun] et PMSF 1 mM) et de ribonucléase (RNasin, 40 U/ml) sont ajoutés dans ce tampon juste avant une sonication effectuée à 5 reprises pendant 15 secondes sur glace (sonicateur Fisher, Modèle 300). L'extrait est clarifié par centrifugation à 13000 rpm et à 4°C durant 20 minutes (Biofuge A, Canlab); le surnageant obtenu est ensuite recentrifugé et clarifié sur filtre stérile 0.45 µm (Millipore).

Alternativement, les cellules HeLa lavées dans le TBS froid peuvent être radiomarquées *in vivo*, par resuspension dans 100 ml de milieu de culture sans phosphate. Du [³²P] orthophosphate 10 µCi/ml (total 1 mCi) est ajouté et les cellules sont laissées en croissance pour une nuit à 37°C. L'extrait total radiomarké est ensuite préparé par sonication comme décrit ci-haut. (CRAFT et al., 1988).

2.3 PRÉPARATION D'EXTRAIT TOTAL DE CELLULES ERYTHROIDES ANUCLEÉES HUMAINES

Le sang humain héparinisé d'un donneur sain est centrifugé durant 15 minutes à 2000 rpm (Microfuge TJ-6, Beckman). Après l'enlèvement du plasma, les cellules sanguines sont mélangées avec un volume de TBS et un demi-volume de dextran 6% et laissées au repos durant 30 minutes (25°C) pour permettre la sédimentation des cellules érythroïdes anucléées. Le culot de cellules érythroïdes anucléées est lavé 2 fois dans le TBS par centrifugation à basse vitesse. La lyse hypotonique des cellules est effectuée dans environ 2 volumes d'une solution contenant Tris 50 mM, pH 7.4, Nonidet P-40 0.5%, NaCl 40 mM, PMSF et dTT 1 mM ainsi que CLAP (1/1000) et RNasin. Le lysat est clarifié sur un filtre stérile Grade 202 (Reeve-Angel, Whatman) et est centrifugé durant 60 minutes à 18000 rpm (Centrifuge Beckman J2-MC, rotor JA-18-0). Le surnageant est utilisé comme extrait total.

2.4 SÉRUMS HUMAINS AUTOIMMUNS

Les sérums anti-Ro/SS-A et anti-La/SS-B témoins du Center for diseases control (CDC, Atlanta) sont utilisés pour définir les sérums témoins locaux, en immunodiffusion et immunoblot. Les sérums normaux, prélevés chez le personnel de laboratoire en santé et les sérums de patients atteints de diverses maladies du tissu conjonctif, sont conservés par aliquotes de 1 ml à -70°C. Ils sont utilisés, à une dilution appropriée, en immunoblot, immunoprécipitation et ELISA.

Des immunoglobulines IgG anti-Ro/SS-A (60 kDa, 52 kDa) ont été préparées à partir d'un sérum entier sur une colonne de Sépharose 6MB couplée à la protéine A de Staphylococcus aureus (Pharmacia) pour améliorer la spécificité de l'ELISA (GODING, 1976). Elles sont conservées en aliquotes de 1 ml, à -20°C.

2.5 ÉLUTION SUR RÉSINES QMA ET DEAE-CELLULOSE

Les résines QMA et DEAE-cellulose sont des échangeurs d'anions comportant, respectivement, des groupes fonctionnels méthylamine quaternaire et diéthylaminoéthyle. L'équilibre des résines est effectué dans du TBS supplémenté avec MgCl₂ 1.5 mM, ZnCl₂ 50 µM, CLAP 1/1000 et PMSF 1 mM.

L'extrait total de cellules est adsorbé sur la résine et le matériel non-adsorbé est éliminé par lavage avec du TBS. Des éluions séquentielles sont réalisées dans des tampons TBS contenant des concentrations de NaCl croissantes et chaque filtrat est rapidement dilué à 120 mM NaCl avec Tris 50 mM, pH 7.4.

2.6 ÉLUTION SUR RÉSINE DEAE 8HR (HPLC)

La colonne DEAE 8HR (AP-1 10 x 100 mm de Waters, Milford, Massachusetts), combinée à un système HPLC (Waters 650E) est équilibrée avec TBS (MgCl₂ et ZnCl₂). Une quantité d'extrait purifié sur DEAE-cellulose et dilué à 120 mM NaCl, équivalant à un maximum de 250 millions de cellules, est injectée sur la colonne. La fraction non-adsorbée est éliminée par lavage avec du TBS et l'éluion est effectuée par un gradient linéaire de NaCl dans le TBS. Des fractions de 1 ml sont récoltées (collecteur de fractions FRAC-100, Waters) et diluées immédiatement avec du Tris 50 mM, pH 7.4, MgCl₂ et ZnCl₂. Le profil d'éluion des particules Ro/SS-A est déterminé par analyse de chaque fraction en ELISA avec des IgG humains anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa.

Alternativement, une cartouche de DEAE-cellulose (Mem-Sep 1010, Waters), conçue pour être adaptée au système HPLC, est utilisée pour purifier directement des extraits totaux de cellules HeLa (environ 150 millions de cellules par

injection) avec un gradient linéaire de NaCl(TBS) ou avec une élution unique dans TBS/NaCl 250 mM.

2.7 ÉLUTION SUR RÉSINE DE TAMIS MOLECULAIRE TSK 300SW (HPLC)

La colonne TSK 300 SW (Waters), adaptée au système HPLC, est équilibrée dans le tampon TBS. Dans le but d'établir une courbe de référence en tamis moléculaire, un mélange (100 µl) de 5 protéines de masses moléculaires connues est injecté sur la colonne: thyroglobuline 100 µg (669 kDa), aldolase 100 µg (158 kDa), albumine bovine sérique 100 µg (67 kDa), chymotrypsinogène 100 µg (25 kDa) et acide para-aminobenzoïque 5 µg (0.159 kDa). Le profil d'élution (tampon TBS) est déterminé par la lecture de l'absorbance à 280 nm.

Les 3 populations de particules Ro/SS-A, isolées de la colonne DEAE 8HR (HPLC), ont été injectées successivement sur la colonne dans un volume de 100 µl: RohY5 (74 millions de cellules), RohY4 (115 millions de cellules) et Ro/SS-A hY1-hY3 (93 millions de cellules). L'élution est faite avec du TBS et des fractions de 1 ml sont recueillies. Le profil d'élution des particules Ro/SS-A est déterminé par l'ELISA avec des IgG anti-Ro/SS-A (60 et 52 kDa). La masse moléculaire des ribonucléoprotéines Ro/SS-A est ensuite déduite à partir de la courbe étalon.

2.8 GRADIENT DE SUCROSE

Un gradient de sucrose 10-30% (P/P) est préparé dans un tampon TBS/EDTA 1 mM. Des portions de 1 ml d'un extrait total de cellules HeLa (50 millions de cellules) et d'un extrait semi-purifié sur DEAE avec TBS/NaCl 250 mM et dilué à 120 mM NaCl (50 millions de cellules) sont déposées en parallèle sur 2 tubes de gradient. Ceux-ci sont centrifugés à 35000 rpm (ultracentrifuge Beckman, rotor SW41 Ti) pendant 18 heures, à 4°C et des fractions de 500 µl sont recueillies à partir du fond des tubes. La détection des particules Ro/SS-A dans les fractions est effectuée par immunoprécipitation des ARN avec un sérum anti-Ro/SS-A.

2.9 CONCENTRATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons recueillis à diverses étapes de purification ont été concentrés à un volume qui permet leur analyse sur un gel de polyacrylamide. La première méthode consiste en une concentration sur des cônes CF25 (Centriflo, Amicon), suivie d'une ultrafiltration sur filtres Ultrafree-MC (Millipore). Les cônes CF25 ont une rétention de plus de 95% des molécules de masse moléculaire supérieure à 25 kDa. Un volume maximum de 7 ml d'échantillon est placé dans chaque cône et la concentration s'effectue par centrifugation à une vitesse maximale de 2000 rpm (4°C) sur Microfuge TJ-6 (Beckman). La concentration se poursuit au

volume final (environ 5 millions de cellules/15 μ l) dans des unités d'ultrafiltration (Ultrafree-MC, Millipore) qui retiennent les molécules de masse moléculaire supérieure à 10 kDa. Un volume maximal de 400 μ l d'échantillon est placé dans le tube (4°C) et la concentration procède par centrifugation à une vitesse maximale de 5000 rpm (Biofuge A, Canlab).

La deuxième méthode consiste en une dialyse sous vide à 4°C (Micro-Pro-Dicon de Bio-Molecular Dynamics, Beaverton, Oregon) à un volume adéquat pour une précipitation subséquente des protéines avec de l'acide trichloroacétique (TCA). L'échantillon amené à une concentration finale de 25% de TCA est incubé pendant 30 minutes à 4°C. Une centrifugation est faite à 13000 rpm pendant 20 minutes (4°C) puis le culot, lavé 2 fois par centrifugation dans de l'acétone froide, est séché sous vide durant 5-10 minutes et est préparé pour l'électrophorèse.

2.10 ÉLECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DENATURANT ET ÉLECTROTRANSFERT

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide sont effectuées avec un gel d'une épaisseur de 1 mm, constitué d'un gel séparateur de 5 cm de hauteur et d'un gel concentrateur de 1 cm de hauteur. Dans les conditions usuelles (LAEMMLI, 1970), le gel séparateur est composé d'une concentration finale d'acrylamide de 10% et de bis-

acrylamide (N,N'-méthylène-bis-acrylamide) de 0.27% pour un rapport mono/bis de 37.5. Le gel contient aussi 0.1% de SDS, 375 mM de Tris-HCl, pH 8.7, 0.04% de persulfate d'ammonium (APS) et 0.05% de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine). Le gel concentrateur contient 4.27% d'acrylamide, 0.12% de bis-acrylamide, 0.1% de SDS, 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 0.03% d'APS et 0.1% de TEMED.

Un nouveau type de gel de polyacrylamide dénaturant a été utilisé pour améliorer la résolution des bandes protéiques (BUYON et al., 1990). Dans ce nouveau système, le gel séparateur contient des concentrations finales d'acrylamide de 15% et de bis-acrylamide de 0.085% (rapport mono/bis de 172.4). Les autres composants sont inchangés, sauf l'APS, présent à 0.035%, et le TEMED, à 0.1%. Le gel concentrateur contient 5% d'acrylamide et 0.14% de bis-acrylamide, alors que les autres composants sont inchangés.

Les extraits cellulaires (5 millions de cellules/15 µl) sont dissous dans un tampon contenant des concentrations finales de 10% de glycérol, 3% de SDS, 5% de β-mercaptoéthanol, 62.5 mM de Tris-HCl, pH 6.8 et 0.005% de bleu de bromophénol et sont chauffés dans un bain à 100°C durant 3 minutes.

L'électrophorèse est réalisée dans un appareil "Mini Protean II Cell" (Bio-Rad) avec un tampon Tris 25 mM, pH 8.4, glycine 192 mM et SDS 0.1%, durant 1 heure à 165 V pour le gel d'acrylamide 10% ou 2 heures à 150 V pour le gel d'acrylamide 15%. Peu avant la fin de l'électrophorèse, une solution de pyronine 0.002% dans 20% de glycérol est déposée sur le gel dans le but de marquer l'emplacement des puits. Les gels sont ensuite électrotransférés sur une membrane de nitrocellulose dans un appareil "Mini Trans-blot Cell" (Bio-Rad) dans un tampon contenant Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 20%, à 100 V durant 60 minutes. Les membranes de nitrocellulose sont incubées durant une nuit avec un tampon Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM et albumine bovine sérique 3% ou gélatine de poisson 5% (44.5 g de protéines/ml, Norland Products Inc., New Brunswick) pour bloquer les sites résiduels non-occupés par des protéines.

2.11 ÉLECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE NON-DENATURANT ET ÉLECTROTRANSFERT

L'électrophorèse en conditions non-dénaturantes ("natives") se fait en absence de SDS et de l'agent réducteur β -mercaptoéthanol. Le gel séparateur contient 7.5% d'acrylamide, 0.2% de bis-acrylamide, 745 mM de Tris-HCl, pH 8.9 et 0.06% d'APS et de TEMED. Le gel concentrateur est constitué de 2.0% d'acrylamide, 0.5% de bis-acrylamide, 62 mM de Tris-HCl, pH 6.7 et 0.06% d'APS et de TEMED.

Les échantillons sont resuspendus dans du glycérol à une concentration finale de 40% et du bleu de bromophénol. L'électrophorèse est effectuée à un ampérage constant de 35 mA durant 90 minutes dans un tampon contenant 387 mM de glycine et 50 mM de Tris, pH 8.6. L'électrotransfert sur membrane de nitrocellulose se fait à 100 V pour 60 minutes dans une solution d'acide acétique 0.7%. Après le transfert, les membranes de nitrocellulose sont lavées de 3 à 4 fois pendant cinq minutes dans un tampon TBS (Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM) avant d'être incubées pour une nuit avec le tampon de blocage TBS/3% albumine bovine sérique (BSA) à 4°C.

2.12 IMMUNOBUVARDAGE

Le protocole est le même pour l'électrophorèse en conditions dénaturantes ou non-dénaturantes (adaptation de TOWBIN et al., 1979). Après le blocage de la membrane de nitrocellulose, celle-ci est lavée 2 fois pendant dix minutes à 25°C dans un tampon contenant Tris 150 mM, pH 7.4, Tween-20 0.1% et BSA 0.5% ou gélatine de poisson 1% (tampon diluant). La membrane de nitrocellulose est incubée durant 60 minutes (25°C) avec des sérums témoins anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B et normaux (SNH) à une dilution adéquate (tampon diluant) dans un appareil "Miniblotter II" (Immunetics, Cambridge, Massachusetts). Chaque puits de cet appareil est conçu de façon à ce que 40 µl de sérum dilué

soit mis en contact avec un équivalent d'environ 2.5 millions de cellules par puits. Trois lavages de 10 minutes dans l'appareil et un lavage hors de l'appareil sont effectués avec le tampon diluant (25°C). Une incubation de 60 minutes (25°C) avec l'anti-IgG humain (Fc) couplé à la peroxydase (1/1000) ou à la phosphatase alcaline (1/7500) est faite, puis la membrane de nitrocellulose est lavée 3 fois pendant dix minutes avec un tampon Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 1M et Tween-20 0.1% (25°C) et 2 fois pendant cinq minutes avec un tampon Tris 10 mM, pH 7.4 et NaCl 150 mM.

Le substrat pour la peroxydase est constitué de 0.06% de 4-chloro-1-naphtol, 20% de méthanol et 0.012% de peroxyde d'hydrogène. Pour la phosphatase alcaline, le substrat utilisé est composé de 1% de chacun des substrats 5-bromo 4-chloro 3-indolylphosphate (BCIP) et nitro blue tetrazolium (NBT) dans un tampon contenant Tris 100 mM, pH 9.5, NaCl 100 mM et MgCl₂ 5 mM. Le développement de la réaction enzymatique est arrêté par rinçage de la membrane de nitrocellulose dans de l'eau bidistillée.

Le développement des bandes a également été fait par autoradiographie. Le protocole est le même que ci-haut sauf que l'étape comportant l'anti-IgG humain couplé à une enzyme est remplacée par une incubation de 90 minutes (25°C) avec 0.5 µCi d'un conjugué [¹²⁵I]-protéine A, préparé dans le tampon diluant. La membrane de nitrocellulose est ensuite rinçée plusieurs fois pour 10 minutes (25°C) dans le tampon

Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 1 M et Tween-20 0.1% et exposée avec un film gris X-OMAT AR ou bleu X-OMAT RP (Kodak), à -70°C, dans une cassette d'autoradiographie.

2.13 ELISA

La technique d'ELISA utilisée ("Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay") consiste en une détection spécifique des protéines Ro/SS-A, en phase solide, dans une plaque de polystyrène à 96 puits (Costar, Cambridge, Massachusetts).

La fraction antigénique (50-200 µl) est incubée dans le puits durant une nuit à 4°C pour permettre la fixation des protéines. Après 2 lavages des puits avec un tampon phosphate 10 mM, pH 7.0, NaCl 150 mM (PBS), BSA 1% et Tween-20 0.2%, une incubation de 2 heures (25°C) avec un tampon PBS/BSA 3% sert à occuper les sites protéiques libres. Après 2 lavages, les sérums anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa (IgG purifiés) et SNH dilués 1/4000 dans le tampon diluant PBS/BSA 3%/Tween-20 0.2%, sont incubés durant 60 minutes (25°C). Les puits sont lavés 6 fois, puis l'anti-IgG humain biotinylé dilué 1/4000 est ajouté sur la plaque pendant 60 minutes (25°C). Après 6 lavages, le complexe est incubé avec une dilution 1/4000 de streptavidine conjuguée à la peroxydase pour 30 minutes (25°C), et après 6 autres lavages, le substrat ortho-phénylènediamine (OPD) 0.1% dans un tampon citrate-phosphate 75 mM, pH 7.6, et peroxyde

d'hydrogène 0.016% est ajouté. Le développement de la couleur est arrêté avec 50 μ l d'acide sulfurique 4N par puits. L'absorbance à 492 nm est lue sur un lecteur ELISA Multiskan MCC/340 MKII (Titertek, Costa Mesa, Californie).

2.14 IMMUNOPRÉCIPITATION

La méthode utilisée est une adaptation de CRAFT et al. (1988). Une quantité de 3 mg de protéine A-Sépharose CL-4B est incubée durant au moins 90 minutes à 4°C avec 15 μ l de sérum dans 500 μ l de tampon IPP (Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 500 mM et Nonidet P-40 0.1%). Les billes sont lavées 4 fois dans 500 μ l de tampon IPP et 2 fois dans le même volume de tampon Net-2 (Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM et Nonidet P-40 0.05%). Les lavages sont faits par centrifugation à 13000 rpm, pour 30 secondes. Après la resuspension des billes dans 400 μ l de tampon Net-2, l'extrait cellulaire est ajouté et incubé à 4°C durant 2 heures. Les billes sont ensuite lavées de 10 à 12 fois avec 500 μ l de Net-2, puis resuspendues dans 300 μ l du même tampon. Les ARN sont extraits par ajout de 30 μ l de SDS 10%, 30 μ l d'acétate de sodium 3M, 300 μ l de PCA et 3 μ l de glycogène 10 mg/ml. La solution PCA est composée de 50 volumes de phénol, 50 volumes de chloroforme, 1 volume d'alcool isoamylique et 0.1% de 8-hydroxyquinoline dans un tampon 1X SSC contenant NaCl 150 mM et citrate de sodium 15 mM (pH 7.0). Les phases sont séparées par centrifugation de 1 minute à 13000 rpm,

puis la phase supérieure contenant les ARN est prélevée. Ceux-ci sont précipités durant 1 heure à -70°C ou une nuit à -20°C avec de l'éthanol à une concentration finale de 70%. Le culot obtenu par une centrifugation de 20 minutes à 13000 rpm est lavé avec 500 μl d'éthanol 70% et séché sous vide.

L'ARN est resuspendu dans un tampon contenant 10 M urée, 1X TBE (Tris 90 mM, pH 8.3, acide borique 90 mM et EDTA 1 mM), 0.025% de bleu de bromophénol et 0.025% de xylène cyanol et dénaturé à 65°C , durant 3 minutes.

Les échantillons sont déposés sur un gel d'acrylamide 10%, bis-acrylamide 0.38%, 7M urée, 90 mM Tris-borate, pH 8.3, 1 mM EDTA, 0.8% APS et 0.08% TEMED, et fractionnés à 400 V dans le tampon 1X TBE durant 45 minutes ou jusqu'à ce que le deuxième front coloré (xylène cyanol) atteigne le bas du gel. Après l'électrophorèse, le gel est fixé dans une solution de méthanol 40% et d'acide acétique 10% durant au moins 1 heure à 25°C .

2.15 COLORATION A L'ARGENT

Les gels d'ARN non-radiomarqués sont révélés par coloration à l'argent (FORMAN et al., 1985). Après la fixation, le gel est lavé 3 fois pendant dix minutes dans l'éthanol 10% et 1 fois pendant cinq minutes dans de l'eau bidistillée (25°C). Un réactif oxydant composé de dichromate de potassium 0.0034 M et d'acide nitrique 0.02% est ajouté pour une incubation de 8 minutes (25°C). Le gel est ensuite lavé 4 à 5 fois cinq minutes dans de l'eau bidistillée ou jusqu'à décoloration complète. Une solution de nitrate d'argent 12 mM est incubée pour 40 minutes et le gel est rincé rapidement dans de l'eau bidistillée.

La solution de développement contenant le carbonate de sodium 0.28 M et 500 µl/l de formaldéhyde (formaline 37%) est ajoutée et remplacée plusieurs fois jusqu'à l'obtention de la coloration voulue. Le développement est arrêté en plaçant le gel dans une solution d'acide acétique 1%.

Alternativement, les gels d'immunoprécipitation d'ARN marqués au ^{32}P sont séchés sous vide, puis placés entre 2 pellicules plastiques et exposés à un film X-OMAT AR ou X-OMAT RP (Kodak) à -70°C , dans une cassette d'autoradiographie.

2.16 ÉCHANGE DE COMPOSANTES ARN ET PROTEINES

Les ARN hY1-hY5 marqués au ^{32}P sont obtenus par immunoprécipitation d'un extrait cellulaire total HeLa radiomarké *in vivo* avec du ^{32}P orthophosphate. Ces ARN sont incubés durant une nuit à 4°C, avec des particules Ro^{hY5} purifiées en présence ou absence d'EDTA 2 mM pour permettre l'échange des composantes de la ribonucléoprotéine. Après ce délai, les 2 extraits ont été supplémentés de façon facultative avec, respectivement, MgCl₂ 2 mM et ZnCl₂ 10 µM et réincubés pendant 90 minutes, à 4°C. Les ARN hY1-hY5 radiomarkés qui ont subi un échange avec l'ARN des particules Ro^{hY5} ajoutées sont détectés par immunoprécipitation avec un sérum anti-Ro/SS-A. Le témoin négatif consiste en une immunoprécipitation avec un sérum normal.

3. RÉSULTATS

3.1 EXTRAITS TISSULAIRES HUMAINS

Dans le but d'effectuer la purification des ribonucléoprotéines Ro/SS-A, nous avons d'abord utilisé du tissu placentaire humain comme source d'antigènes. Les extraits totaux ont été soumis à des fractionnements sur diverses résines: DEAE-cellulose, CMC, SP Séphadex C-50, hydroxyapatite et résines préparatives Sep-Pak: QMA, Silica, CN et C18. Des conditions de pH variées ont été utilisées (pH 2.0-7.4) pour améliorer la séparation du Ro/SS-A par rapport aux autres constituents de l'extrait total.

La présence de l'antigène Ro/SS-A dans les différentes fractions purifiées a été déterminée par la détection des composantes protéiques en immunobuvardage dénaturant. La purification sur les résines CMC et hydroxyapatite a démontré un enrichissement peu significatif de Ro/SS-A par rapport à l'étape de purification sur colonne de DEAE-cellulose, comme démontré par une coloration au bleu de Coomassie et à l'argent des gels de polyacrylamide dénaturants et non-dénaturants. Un manque de reproductibilité d'une extraction à l'autre et une grande non-spécificité des bandes protéiques en immunobuvardage ont également été observés.

Mais surtout, le matériel antigénique récupéré par purification sur les résines CMC, SP Séphadex C-50 et Sep-Pak ne correspondait pas aux caractéristiques d'une particule "native" par immunobuvardage en conditions non-dénaturantes. A cause de l'importance primordiale que nous accordons à la préservation de la structure intacte des ribonucléoprotéines purifiées et des autres raisons mentionnées, la purification de Ro/SS-A a été réalisée subséquentement à partir de cellules HeLa en culture dans des conditions d'inhibition de l'activité ribonucléase.

3.2 PURIFICATION DES RIBONUCLÉOPROTEINES Ro/SS-A DE CELLULES HUMAINES NUCLÉÉES ET ANUCLÉÉES

Dans le but de mieux définir la nature des différentes composantes de Ro/SS-A, la purification de ces particules a été effectuée à partir de cellules humaines nucléées (cellules HeLa en culture) et anucléées (cellules érythroïdes). Les portions protéines et ARN ont été identifiées par immunobuvardage en conditions dénaturantes ou non-dénaturantes ("natives") et par immunoprécipitation, respectivement.

3.2.1 COMPOSITION DES RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro/SS-A DE CELLULES NUCLÉÉES HUMAINES (HeLa)

3.2.1.1 UTILISATION DES CATIONS DIVALENTS MAGNÉSIUM ET ZINC

La purification des ribonucléoprotéines Ro/SS-A a été effectuée en présence des cations divalents magnésium ($MgCl_2$ 1.5 mM) et zinc ($ZnCl_2$ 50 μM).

Selon CELANDER et CECH (1991), le $MgCl_2$, à une concentration de 1.5 mM, favoriserait l'acquisition de structure tridimensionnelle correcte d'un ARN autocatalytique de *Tetrahymena thermophila*. Un effet du zinc à une concentration de 50-150 μM s'exercerait au niveau de la dimérisation de l'hormone de croissance humaine, rendant ainsi le dimère plus résistant face à la dénaturation. Il semble que 2 ions zinc s'associent de façon coopérative par dimère d'hormone de croissance, vraisemblablement selon un modèle de coordination tétraédrale avec des ligands contenant de l'oxygène et de l'azote (histidine ou acide glutamique). L'article ne mentionne pas si ce domaine constitue un doigt-de-zinc (CUNNINGHAM et al., 1991). Donc, l'hypothèse a été faite que l'utilisation de ces cations agirait sur la préservation de la structure intacte de l'ARN et sur le maintien d'éventuelles interactions protéiques dans les ribonucléoprotéines Ro/SS-A. De plus, l'utilisation du cation zinc a été dictée par la présence, dans la séquence d'acides aminés des protéines Ro/SS-A 60 et

52 kDa, de motifs "doigt-de-zinc". Ces domaines sont retrouvés chez des protéines agissant comme facteurs de transcription de l'ADN (BERG, 1990) mais leur présence dans la séquence des protéines Ro/SS-A 60 kDa et 52 kDa n'a pas été reliée à une telle fonction, jusqu'à présent. Bien que ce ne soit pas le domaine «doigt-de-zinc» lui-même qui est impliqué dans la liaison avec d'autres protéines, mais bien des domaines structuraux adjacents à celui-ci (BERG, 1990), nous faisons l'hypothèse que la présence de l'ion zinc permettrait peut-être de retenir la conformation intacte de la région entière ce qui favoriserait les interactions inter-protéines potentielles.

Finalement, nous avons constaté la présence en immunobuvardage dénaturant d'une faible quantité de Ro/SS-A 52 kDa dans une fraction purifiée en absence de $MgCl_2$ par comparaison avec l'intensité habituelle de cette bande protéique dans une purification durant laquelle ce cation avait été incorporé. Cette observation a été à l'origine d'une hypothèse qui attribuerait au cation magnésium un rôle potentiel de maintien de l'association du Ro/SS-A 52 kDa dans les particules purifiées.

Pour toutes les raisons mentionnées, le $MgCl_2$ 1.5 mM et le $ZnCl_2$ 50 μM ont été présents dans toutes les purifications effectuées. Dans la dernière partie de cette section, l'effet de ces cations a été étudié plus systématiquement.

3.2.1.2 ESSAIS DE PURIFICATION SUR RÉSINE QMA

Le processus de purification de l'antigène Ro/SS-A à partir d'extraits totaux a débuté par une chromatographie sur résine DEAE-cellulose. Dans le but d'adapter cette étape de purification à un système HPLC, l'utilisation de la résine QMA, de propriétés physico-chimiques semblables à celles du DEAE-cellulose, mais capable de résister aux pressions générées par le HPLC, a été envisagée.

Le comportement chromatographique de la résine QMA a été comparé avec celui de la résine DEAE-cellulose par élution d'un extrait cellulaire total HeLa avec des tampons TBS contenant des concentrations croissantes de NaCl de 190 à 500 mM. Les ribonucléoprotéines Ro/SS-A ont été identifiées dans les fractions par immunoprécipitation des ARN Ro/SS-A associés.

Sur DEAE-cellulose, la particule RohY5 est éluée à 190 mM NaCl alors que sur QMA, l'élution a lieu à partir d'une concentration de 250 mM NaCl (Tableau 3). Le groupe des particules RohY1-hY4 est élué sur DEAE-cellulose à 250 mM NaCl alors que celles-ci ne sont pas éluées de la résine QMA jusqu'à 500 mM NaCl. De même, l'élution du tARN est fortement déplacée vers une plus forte molarité de NaCl.

La résine QMA présente donc un inconvénient majeur. En raison de sa plus forte affinité que le DEAE-cellulose pour

Tableau 3: Conditions d'élution des ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules HeLa sur les résines DEAE-cellulose et QMA

Des extraits cellulaires HeLa totaux adsorbés sur des résines DEAE-cellulose et QMA ont été élués avec des tampons TBS contenant des concentrations croissantes de NaCl et les particules Ro/SS-A ont été détectées dans les fractions par l'identification des ARN extraits des ribonucléoprotéines Ro/SS-A immunoprécipitées.

IMMUNOPRECIPITATION ANTI-Ro/SS-A		
Concentration de NaCl (mM)	DEAE-cellulose	QMA
190	hY5	---
210	---	---
250	hY1-hY4	hY5
300	tARN	hY5
335	---	hY5
400	---	---
500	---	tARN

l'antigène Ro/SS-A, des tampons de force ionique plus élevées sont requis pour effectuer l'élution, ce qui est dommageable pour les ribonucléoprotéines, puisque l'interaction entre les composantes ARN et protéine(s) est sensible à l'élévation de la molarité de NaCl (BOIRE et CRAFT, 1990).

Dans le but d'obtenir des particules intactes, les fractions éluées sont immédiatement diluées pour abaisser la concentration de NaCl à un niveau minimum. Donc, la résine DEAE-cellulose est plus adéquate pour une élution de l'antigène Ro/SS-A qui préserve le mieux son intégrité. Une colonne DEAE-cellulose adaptable au système HPLC a été utilisée par la suite ce qui fournit tous les avantages attendus pour la purification.

3.2.1.3 GEL DE POLYACRYLAMIDE 15% DÉNATURANT

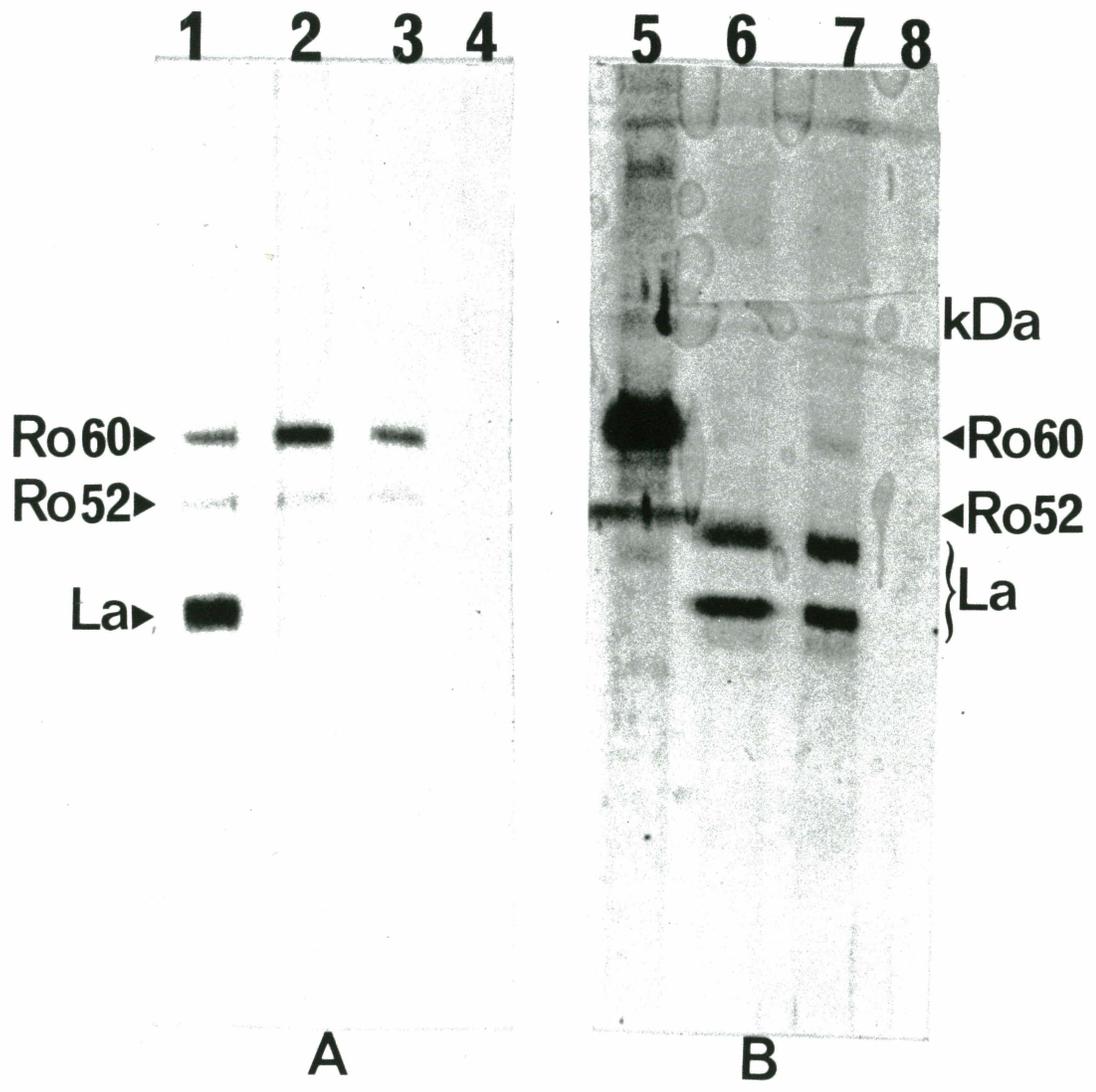
Le gel de polyacrylamide dénaturant utilisé le plus souvent contient 10% d'acrylamide et 0.27% de bis-acrylamide pour un rapport mono/bis de 37.5. Dans ces conditions, il y a une comigration des protéines Ro/SS-A 52 kDa et La/SS-B 48 kDa ce qui est responsable d'une absence apparente de Ro/SS-A 52 kDa dans les fractions purifiées. La protéine La/SS-B, très abondante dans la cellule (GOTTLIEB et STEITZ, 1989a et b) produit une bande forte en immunobuvardage dénaturant, qui obscurcit la bande de Ro/SS-A 52 kDa, souvent présente à une intensité plus ou moins importante.

Cet inconvénient a été éliminé par une modification des conditions du gel de polyacrylamide dénaturant, décrite par BUYON et al., en 1990.

Ce gel contient 15% d'acrylamide et 0.085% de bis-acrylamide pour un rapport mono/bis de 172.4. Ces conditions ont permis d'effectuer une séparation nette en immunobuvardage dénaturant entre les bandes protéiques Ro/SS-A 52 kDa et La/SS-B 48 kDa, permettant la détection de Ro/SS-A 52 kDa qui était passé inaperçu avec le gel usuel. La Figure 3 montre, pour fins de comparaison, un immunobuvardage dans les 2 conditions décrites.

Figure 3: Immunobuvardages comparatifs de gels de polyacrylamide dénaturants 10% et 15%

Des immunobuvardages sous conditions dénaturantes 15% (A) et 10% (B) ont été effectués sur des extraits cellulaires HeLa semi-purifiés sur DEAE-cellulose (TBS/NaCl 250 mM) avec divers sérums de patients à une dilution de 1/100: anti-Ro/SS-A 60, 52 kDa et La/SS-B (lignes 1 et 7), anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa (lignes 2, 3 et 5), anti-La/SS-B (ligne 6) et un sérum humain normal (lignes 4 et 8). En B, les 2 bandes identifiées La correspondent au polypeptide complet de 48 kDa et à son principal produit de dégradation de 43 kDa.



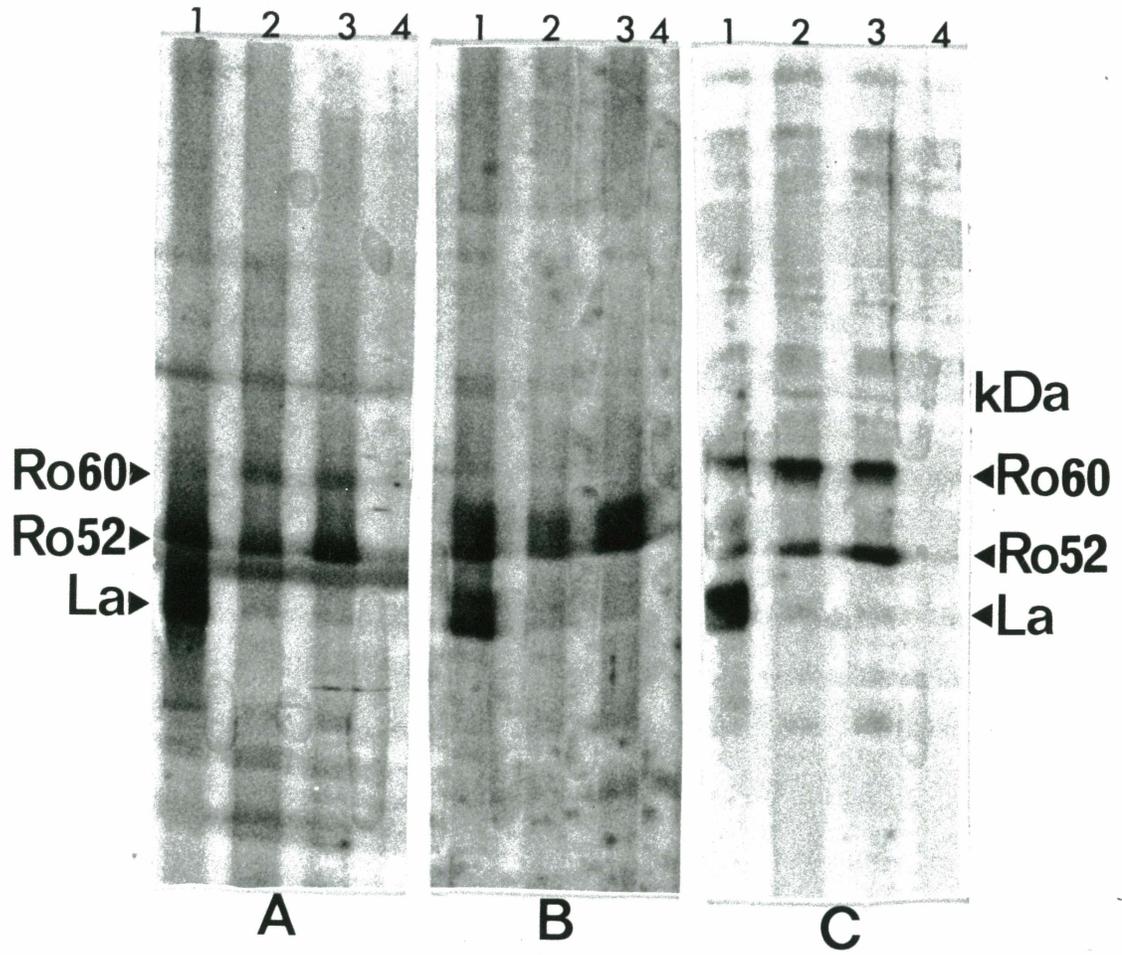
3.2.1.4. PURIFICATION SUR RÉSINE DEAE-CELLULOSE

Toutes les étapes de purification mentionnées ont été effectuées en présence de $MgCl_2$ 1.5 mM et $ZnCl_2$ 50 μM . Un extrait total de cellules HeLa a été adsorbé sur la résine DEAE-cellulose dans un tampon TBS (120 mM NaCl). La fraction non-adsorbée sur la résine a été recueillie et l'élution a été effectuée dans TBS/NaCl 250 mM. L'extrait, rapidement dilué à une concentration de 120 mM NaCl, est soumis à une immunoprécipitation des ARN Ro/SS-A et à un immunobuvardage dénaturant pour les protéines associées.

La Figure 4 montre les protéines Ro/SS-A et La/SS-B présentes dans l'extrait total avant la purification, la fraction non-adsorbée et la fraction éluée à 250 mM NaCl sur DEAE. L'extrait total contient les protéines Ro/SS-A 60 et 52 kDa, ainsi que le La/SS-B 48 kDa. A noter que la fraction non-adsorbée contient la majorité du Ro/SS-A 52 kDa présent dans l'extrait total. Suite à l'immunoprécipitation des ribonucléoprotéines Ro/SS-A de l'extrait total et à l'extraction des ARN liés à ces particules, nous avons montré la présence des ARN hY1-hY5, alors que ceux-ci sont absents de la fraction non-adsorbée. L'extrait élué contient le Ro/SS-A 60 kDa et des quantités variables de Ro/SS-A 52 kDa. Les ARN hY1-hY5 sont également présents. Etant donnée la grande abondance de la protéine La/SS-B, celle-ci est retrouvée dans toutes les fractions examinées.

Figure 4: Identification des protéines Ro/SS-A et La/SS-B associées aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées d'un extrait total de cellules HeLa sur DEAE-cellulose.

L'immunobuvardage d'un gel de polyacrylamide dénaturant contenant un extrait total de cellules HeLa (A), d'une fraction non-adsorbée (B) à 120 mM NaCl et une fraction éluée (C) à 250 mM NaCl sur une résine DEAE-cellulose en utilisant des sérums dilués 1/100: anti-Ro/SS-A 60, 52 kDa et La/SS-B (ligne 1), anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa (lignes 2 et 3) et un sérum humain normal (ligne 4).



Un fait intéressant est donc l'association mineure du Ro/SS-A 52 kDa avec les particules RohY1-hY5 semi-purifiées, suggérant que cette protéine existe surtout sous forme libre dans des fractions ne contenant pas d'ARN Ro/SS-A.

L'antigène Ro/SS-A obtenu est constitué de protéines et d'ARN non-dégradés (comigration avec les constituants respectifs de l'extrait total) associés en un complexe ribonucléoprotéique (immunoprécipitable). Afin de vérifier l'intégrité de l'antigène isolé, un gradient de sucrose 10-30% (P/P) est utilisé pour purifier en parallèle des particules Ro/SS-A d'un extrait total et d'un extrait élué sur colonne de DEAE-cellulose. La présence de l'antigène Ro/SS-A est confirmée dans les fractions recueillies par l'extraction et l'identification des ARN associés aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A immunoprécipitées. Le Tableau 4 présente les résultats de cette séparation sur gradient de sucrose.

Dans l'extrait élué, seule la particule RohY5 est présente et elle comigre en gradient de sucrose avec la particule correspondante de l'extrait total. La séparation en gradient de sucrose étant basée sur la densité des macromolécules, ce résultat confirme que le RohY5 semi-purifié par chromatographie sur DEAE-cellulose est demeuré intact par rapport à l'autoantigène présent dans l'extrait total.

Tableau 4: Fractionnement de particules Ro^{hY5} d'un extrait total et d'un extrait semi-purifié de cellules HeLa sur un gradient de sucrose

Le Tableau montre la migration parallèle de particules Ro^{hY5} d'un extrait total HeLa et d'une fraction éluée du DEAE-cellulose sur un gradient de sucrose 10-30%. Les ribonucléoprotéines Ro/SS-A sont détectées dans les fractions par l'identification des ARN Ro/SS-A extraits des ribonucléoprotéines immunoprécipitées.

(+): présent

(-): absent

3.2.1.5 PURIFICATION SUR RÉSINE DEAE 8HR (HPLC)

L'extrait dilué qui a été élué de la colonne DEAE-cellulose a été adsorbé sur une résine DEAE 8HR combinée à un système HPLC. Comme précédemment, la fraction non-adsorbée sur la résine (120 mM NaCl) est conservée. L'élution procède par un gradient linéaire TBS/NaCl 120-320 mM (plateau à 220 mM NaCl) et les fractions éluées sont dans un volume de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 permettant de ramener la concentration en NaCl à 120 mM.

La Figure 5 représente l'identification par test ELISA des protéines Ro/SS-A associées aux ribonucléoprotéines purifiées avec des IgG anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa. Les 5 pics protéiques détectés ont été immunoprécipités pour identifier les ribonucléoprotéines Ro/SS-A présentes. Les particules Ro/SS-A ont été purifiées en 3 populations biochimiquement distinctes : la particule RohY5 à 175 mM NaCl, la particule RohY4 à 260 mM NaCl et le groupe de particules RohY1-hY3 à 275 mM NaCl. L'ELISA a également identifié 2 pics supplémentaires dépourvus d'ARN Ro/SS-A mais contenant des protéines détectées par le sérum anti-Ro/SS-A.

La Figure 6 correspond à une coloration à l'argent d'un gel contenant les ARN extraits (PCA) des ribonucléoprotéines Ro/SS-A immunoprécipitées. La distribution des ARN hY1-hY5 est montrée dans les 3 fractions.

Figure 5: Identification par test ELISA des ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules HeLa purifiées sur DEAE 8HR (HPLC)

Un extrait cellulaire HeLa semi-purifié sur DEAE-cellulose (TBS/NaCl 250 mM) est refractionné sur une colonne de DEAE 8HR (HPLC) avec un gradient continu de NaCl (ligne brisée) procédant par plateaux à 120 mM NaCl (a), 220 mM NaCl (b) et 320 mM NaCl (c). Le test ELISA est effectué à l'aide d'IgG anti-Ro/SS-A 60 kDa purifiés (dilués 1/4000). Les ribonucléoprotéines Ro/SS-A sont détectées dans chaque pic par l'identification des ARN extraits des ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées: RohY5 à 175 mM NaCl (pic 1), RohY4 à 260 mM NaCl (pic 3) et le groupe RohY1-hY3 à 275 mM NaCl (pic 4). Les pics 2 et 5 sont dépourvus d'ARN Ro/SS-A mais contiennent des protéines Ro/SS-A reconnues par le sérum utilisé pour l'ELISA.

ABSORBANCE 492 nm

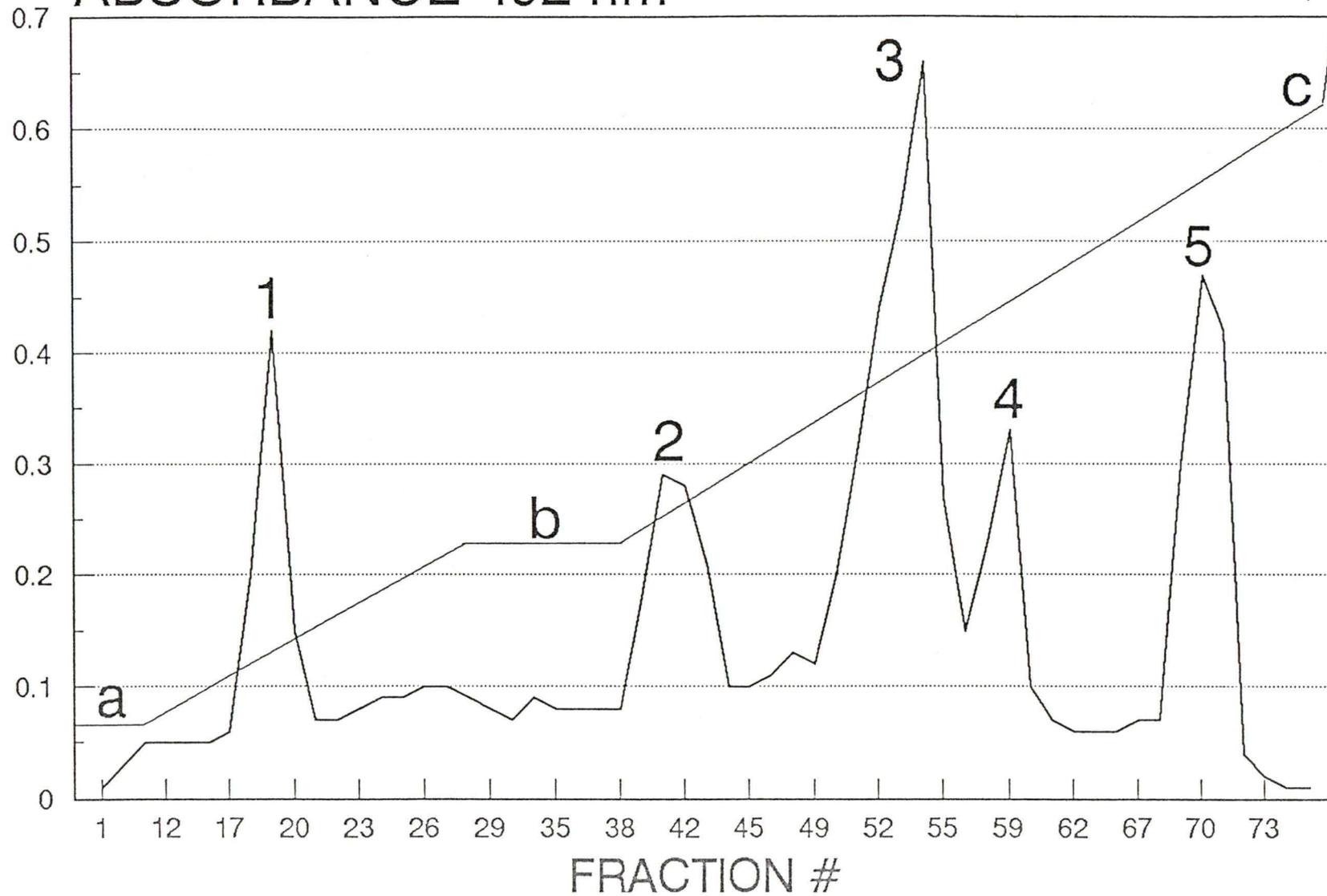
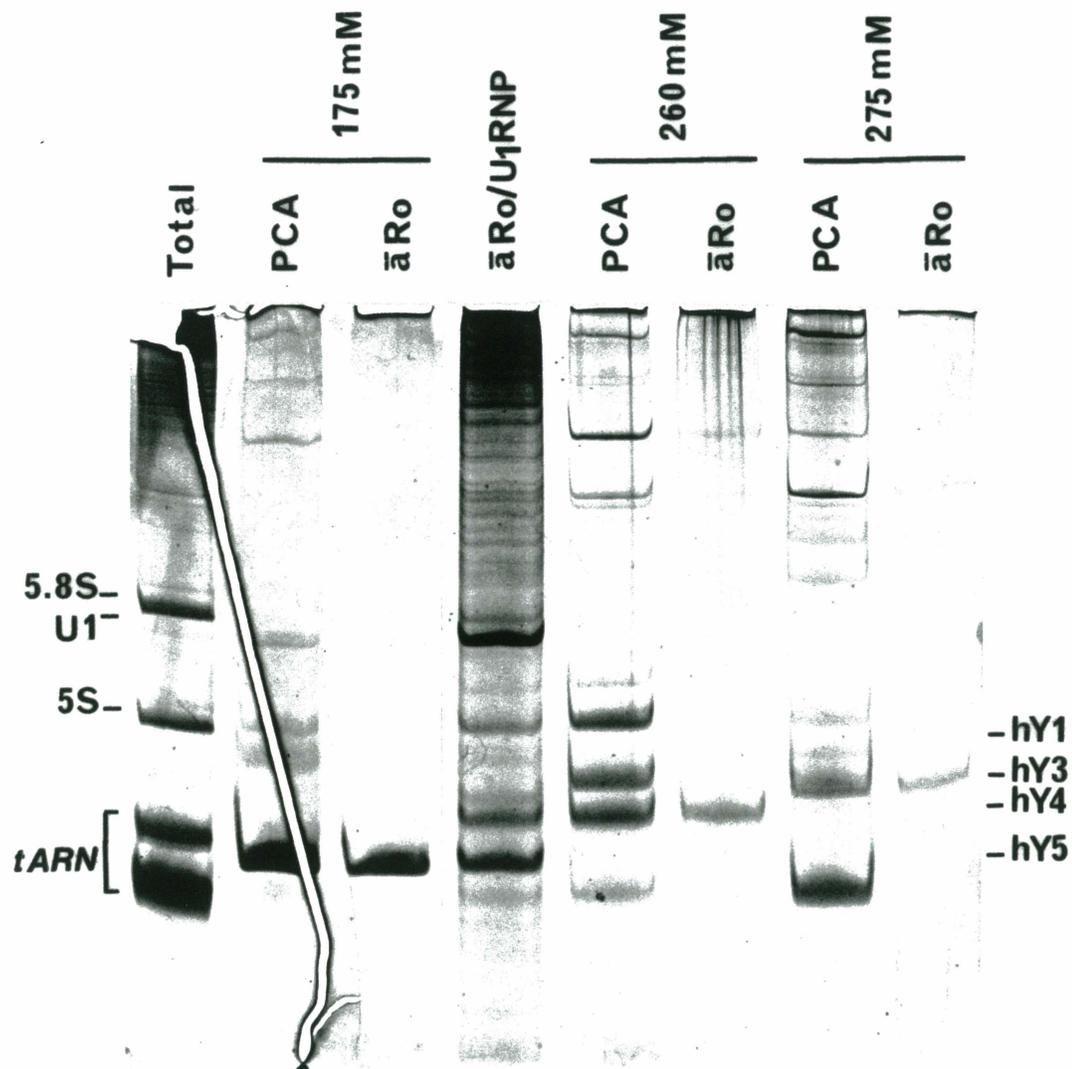


Figure 6: Détection des ARN Ro/SS-A de cellules HeLa dans les fractions purifiées sur DEAE 8HR (HPLC)

Le gel montre les ARN hY1-hY5 extraits des ribonucléoprotéines Ro/SS-A immunoprécipitées (anti-Ro) ainsi que les ARN totaux (PCA) retrouvés dans les fractions RohY5 à 175 mM NaCl (pic 1), RohY4 à 260 mM NaCl (pic 3) et RohY1-hY3 à 275 mM NaCl (pic 4). La première ligne illustre les ARN totaux présents dans un extrait non-purifié et la ligne centrale (témoin) correspond aux ARN associés aux ribonucléoprotéines immunoprécipitées avec un sérum anti-Ro/SS-A et U1 RNP à partir d'un extrait total.



Donc, à ce niveau de purification, les ribonucléoprotéines Ro/SS-A représentent un constituant majeur dans chaque fraction.

Les protéines Ro/SS-A et La/SS-B associées à ces particules purifiées ont été identifiées par immunobuvardage dénaturant. La Figure 7 montre les protéines retrouvées dans les extraits obtenus au cours des 2 premières étapes de purification. L'élution sur DEAE a permis d'isoler les 4 particules Ro/SS-A en présence des protéines Ro/SS-A 60 kDa, La/SS-B 48 kDa (et 43 kDa) et Ro/SS-A 52 kDa, celle-ci étant moins abondante que dans l'extrait total et la fraction non-adsorbée. La fraction non-adsorbée sur la résine DEAE 8HR contient la protéine La/SS-B 48 kDa, également présente en abondance dans les populations de ribonucléoprotéines Ro/SS-A. Dans la plupart des cas, le produit de dégradation 43 kDa du La/SS-B 48 kDa est présent. La protéine Ro/SS-A 60 kDa est un constituant important des ribonucléoprotéines puisqu'elle est retrouvée dans toutes les fractions. Par contre, des quantités faibles de Ro/SS-A 52 kDa sont associées aux ribonucléoprotéines RohY5 et RohY1-hY3; la particule RohY4 semble en être dépourvue. Le polypeptide Ro/SS-A 52 kDa existerait majoritairement sous forme libre puisqu'il est retrouvé surtout dans la fraction non-adsorbée sur DEAE-cellulose, en absence d'ARN Ro/SS-A, bien qu'il semble exister un certain degré de copurification avec les particules RohY5 et RohY1-hY3. De plus, la présence

Figure 7: Identification des protéines Ro/SS-A et La/SS-B associées aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées à partir d'un extrait de cellules HeLa sur DEAE-cellulose et DEAE 8HR (HPLC).

Les protéines présentes à chaque étape de purification de l'extrait de cellules HeLa ont été identifiées par immunobuvardage en conditions dénaturantes avec un sérum anti-Ro/SS-A et La/SS-B dilué 1/100 (ligne 1) et un sérum anti-Ro/SS-A dilué 1/100 (ligne 2). De gauche à droite, on retrouve l'extrait de départ (TOTAL), les fractions non-adsorbée (NA) et éluée avec TBS/NaCl 250 mM (ELUAT) sur DEAE-cellulose puis les fractions non-adsorbée, RohY5, RohY4 et RohY1-hY3 obtenues du DEAE 8HR (HPLC). La fraction portant un trait horizontal ne contient que des protéines Ro/SS-A détectées en ELISA par le sérum utilisé.

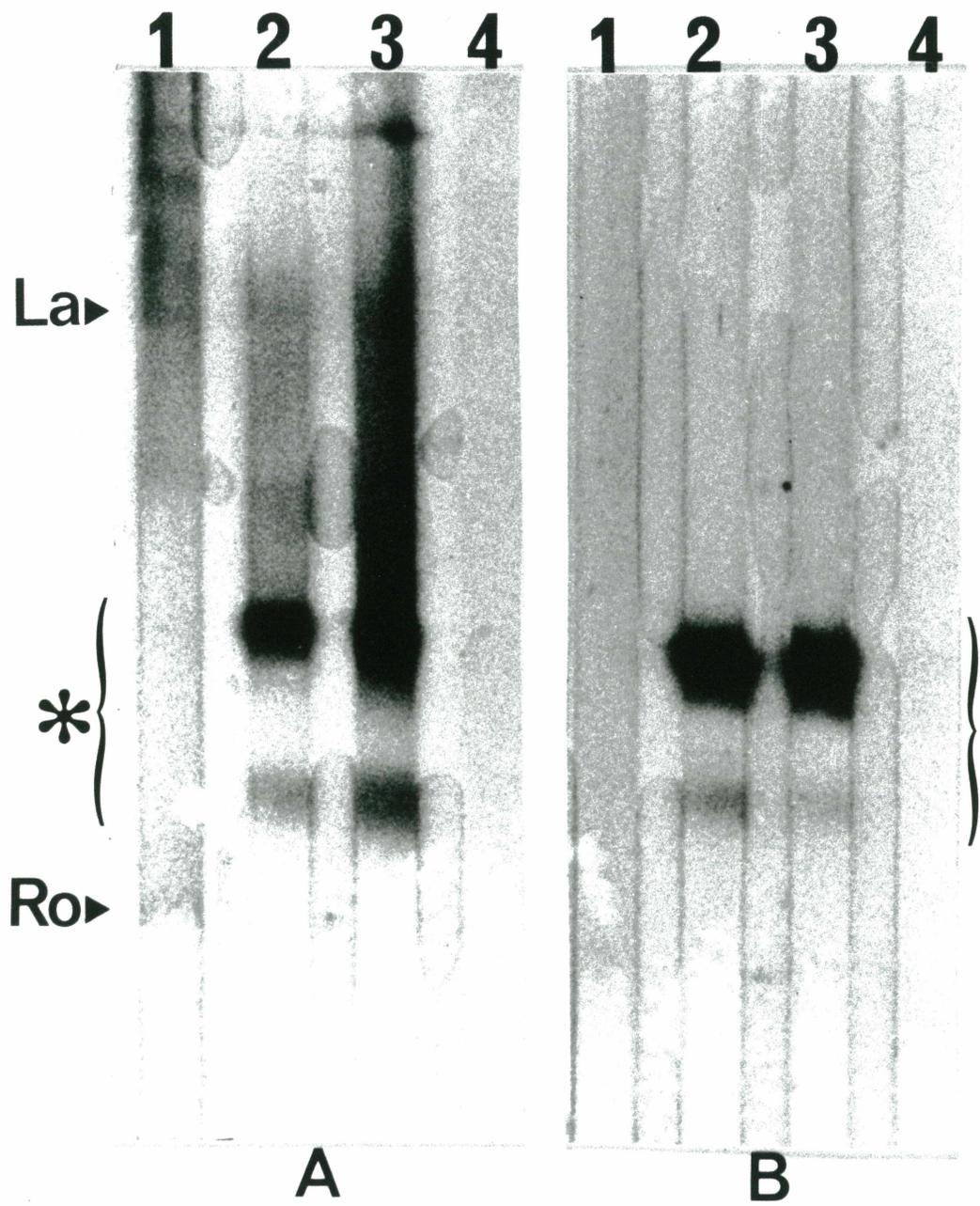
conjointe des protéines Ro/SS-A 60 kDa, 52 kDa et La/SS-B 48 kDa a été observée en absence d'ARN Ro/SS-A.

Cette seconde étape de purification a mené à l'isolement de particules Ro/SS-A apparemment intègres, comme le suggèrent l'absence presque complète de dégradation des portions ARN et protéines et la possibilité d'immunoprécipiter les ARN Ro/SS-A à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines Ro/SS-A.

Cette affirmation a été renforcée par l'analyse de la ribonucléoprotéine Roh^{Y5} sur un gel de polyacrylamide non-dénaturant. La Figure 8 montre la présence des bandes obtenues en immunobuvardage de l'extrait Roh^{Y5} et, en parallèle, sur un extrait contenant des ribonucléoprotéines La/SS-B. Au niveau du Roh^{Y5}, la bande de plus haute masse moléculaire correspond à un antigène contenant à la fois les protéines Ro/SS-A et La/SS-B, tandis que la bande de plus faible masse moléculaire représente un antigène contenant la protéine Ro/SS-A seule. Les 2 bandes révélées spécifiquement par un sérum anti-La/SS-B dans les 2 extraits sont de nature inconnue mais elles sont caractéristiques de cette spécificité sérologique. Dans l'extrait Roh^{Y5}, ces bandes suggèrent, conjointement avec la présence de la bande supérieure, que la protéine La/SS-B demeure associée à l'antigène Ro/SS-A.

Figure 8: Caractérisation des composantes protéiques associées à la particule Ro^{hY5} purifiée sur DEAE 8HR (HPLC) par immunobuvardage sous conditions non-dénaturantes.

La section A montre l'immunobuvardage d'un gel de polyacrylamide non-dénaturant effectué sur des ribonucléoprotéines Ro^{hY5} purifiées par DEAE 8HR (HPLC) alors que la section B correspond à des ribonucléoprotéines La/SS-B. L'immunobuvardage a été réalisé avec des sérums (dilués 1/100) anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa (ligne 1), anti-La/SS-B (lignes 2 et 3) et un sérum humain normal (ligne 4). L'astérisque indique 2 bandes spécifiquement révélées par les sérums anti-La/SS-B en immunobuvardage sous conditions non-dénaturantes.



3.2.1.6 PURIFICATION SUR RÉSINE DE TAMIS MOLECULAIRE TSK 300SW (HPLC)

La colonne de tamis moléculaire TSK 300SW a été standardisée par injection de protéines de masses moléculaires connues.

Les Figures 9 et 10 correspondent, respectivement, au profil d'éluion des protéines de références (absorbance 280 nm) et à la courbe de calibration qui en est déduite. Les 3 populations de ribonucléoprotéines Ro/SS-A isolées à l'étape DEAE 8HR ont été appliquées successivement sur la colonne de tamis moléculaire: RohY5 (74 millions de cellules), RohY4 (115 millions de cellules) et RohY1-hY3 (93 millions de cellules). Les protéines Ro/SS-A présentes dans les ribonucléoprotéines isolées ont été détectées par un essai ELISA à l'aide d'IgG anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa. Les sous-types de particules Ro/SS-A isolées ont été déterminés par l'identification des ARN Ro/SS-A extraits (PCA) de ces ribonucléoprotéines. Les Figures 11, 12 et 13 présentent le profil d'éluion des protéines Ro/SS-A dans les 3 populations de ribonucléoprotéines purifiées.

La courbe de référence a permis de calculer la masse moléculaire des particules Ro/SS-A, soit environ 350 kDa pour RohY5 et le groupe RohY1-hY3 et environ 250 kDa pour RohY4. Le test ELISA effectué sur les fractions éluées à partir de la population de ribonucléoprotéines RohY1-hY3 a mis en évidence un polypeptide d'environ 61 kDa reconnu par les IgG anti-Ro/SS-A. L'extraction au phénol-chloroforme

Figure 9: Profil d'élution des protéines de référence sur la colonne de tamis moléculaire TSK 300SW

Ce profil résulte de la lecture de l'absorbance à 280 nm d'une séparation de standards de poids moléculaire sur une résine de tamis moléculaire TSK 300SW: thyroglobuline 669 kDa (pic 1), aldolase 158 kDa (pic 2), albumine bovine sérique 67 kDa (pic 3), chymotrypsinogène 25 kDa (pic 4) et acide para-aminobenzoïque ou PABA 0.159 kDa (pic 5).

ABSORBANCE 280 nm

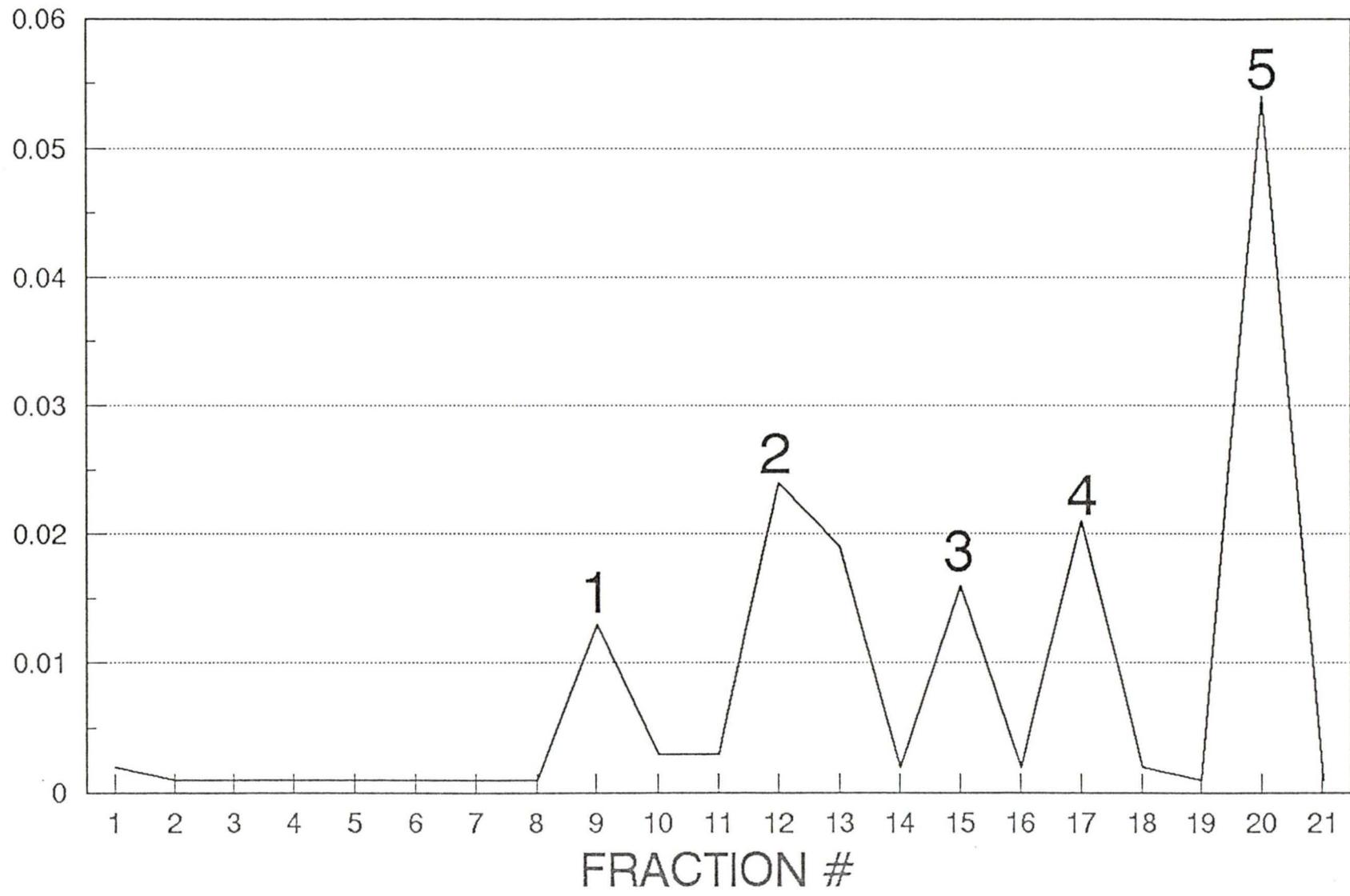


Figure 10: Courbe de calibration de la colonne de tamis moléculaire TSK 300SW

A partir de la Figure 9, une courbe de calibration de la colonne de tamis moléculaire TSK 300SW a été établie en considérant le logarithme à base 10 de la masse moléculaire (Log Poids moléculaire) et le coefficient d'élution (R_f) des standards: thyroglobuline 669 kDa (a), aldolase 158 kDa (b), albumine bovine sérique 67 kDa (c) et chymotrypsinogène 25 kDa (d). Le facteur R_f est un chiffre entre 0 et 1 représentant le rapport entre le temps d'élution de chaque protéine de référence et celui de la protéine de référence dont l'élution est la plus longue.

Log Poids moleculaire

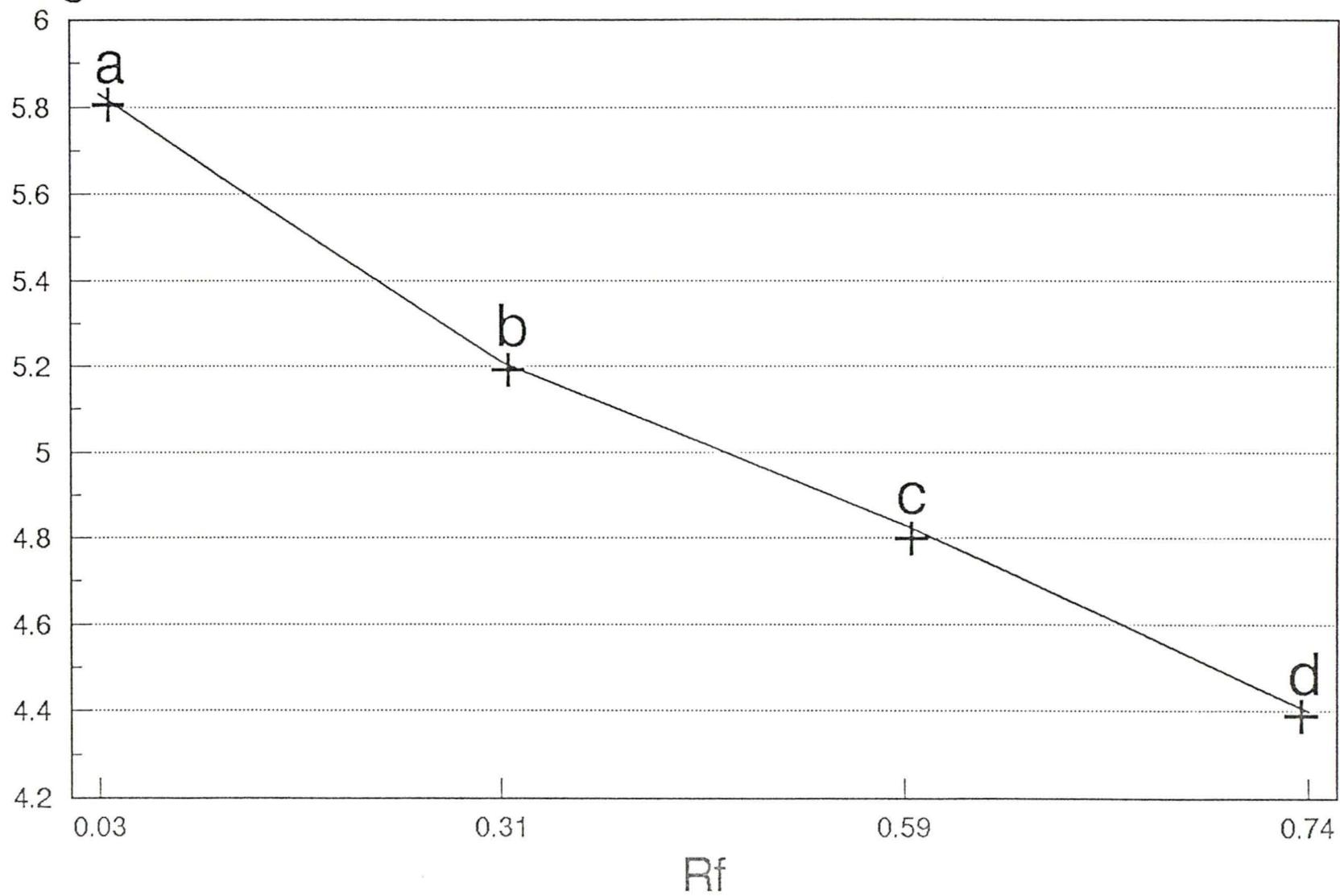


Figure 11: Profil d'élution de la ribonucléoprotéine RohY5 par tamis moléculaire

Des particules RohY5 purifiées sur colonne de DEAE 8HR (HPLC) ont été fractionnées sur la colonne de tamis moléculaire TSK 300SW et les fractions contenant les particules RohY5 ont été identifiées à l'aide d'un test ELISA effectué avec un sérum anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa dilué 1/4000. Le pic 1 correspond au RohY5, tel que démontré par l'identification de l'ARN hY5 extrait de la particule immunoprécipitée. La masse moléculaire déduite pour la particule est d'environ 350 kDa.

ABSORBANCE 492 nm

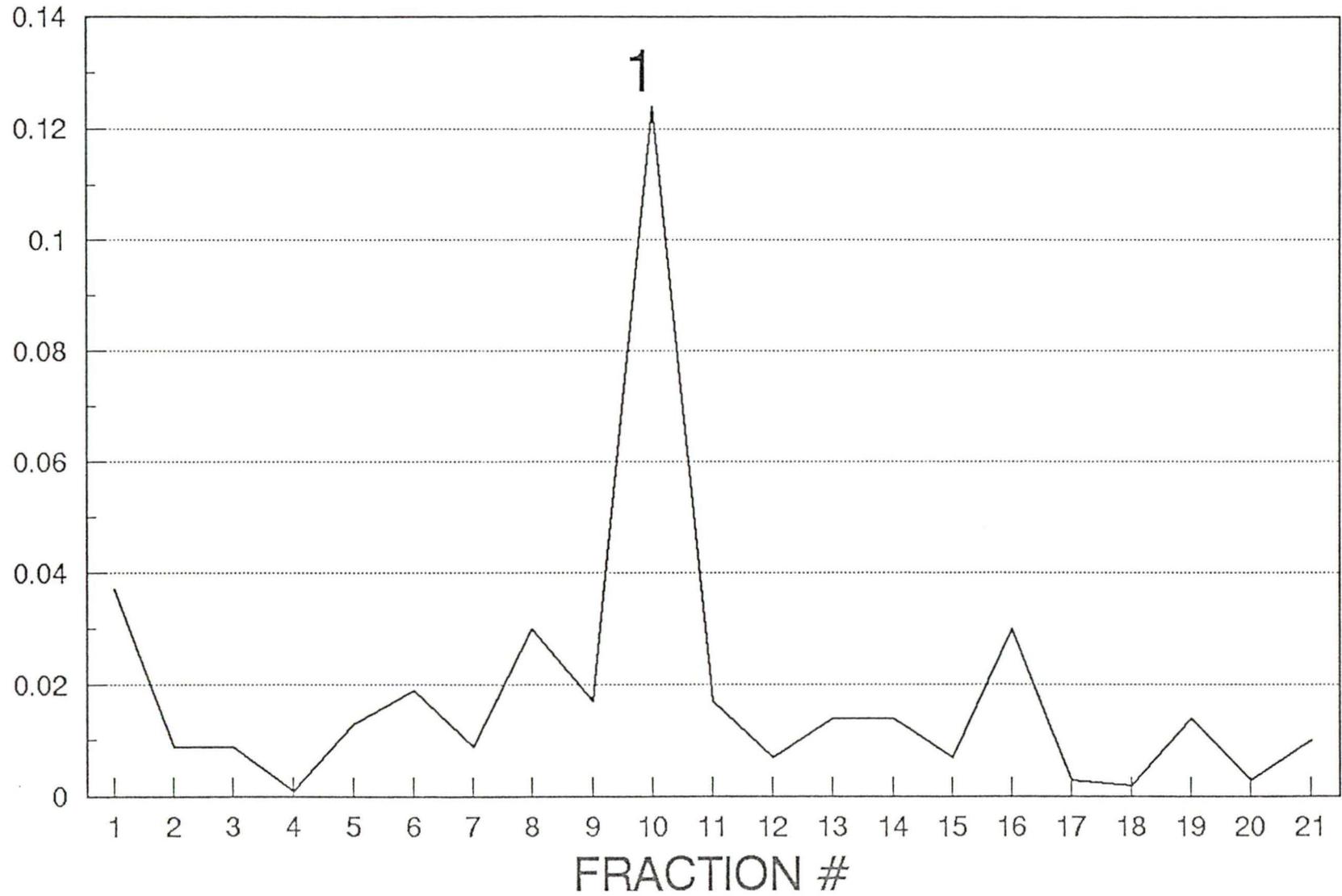


Figure 12: Profil d'élution de la ribonucléoprotéine Ro^{hY4} par tamis moléculaire

Des particules Ro^{hY4} purifiées sur DEAE 8HR (HPLC) ont été fractionnées sur la colonne de tamisage moléculaire TSK 300SW et les fractions contenant les particules Ro^{hY4} ont été identifiées à l'aide d'un test ELISA effectué avec un sérum anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa dilué 1/4000. Le pic 1 correspond au Ro^{hY4}, tel que démontré par l'identification de l'ARN h^{Y4} extrait de la particule immunoprécipitée. La masse moléculaire déduite pour la particule est d'environ 250 kDa.

ABSORBANCE 492 nm

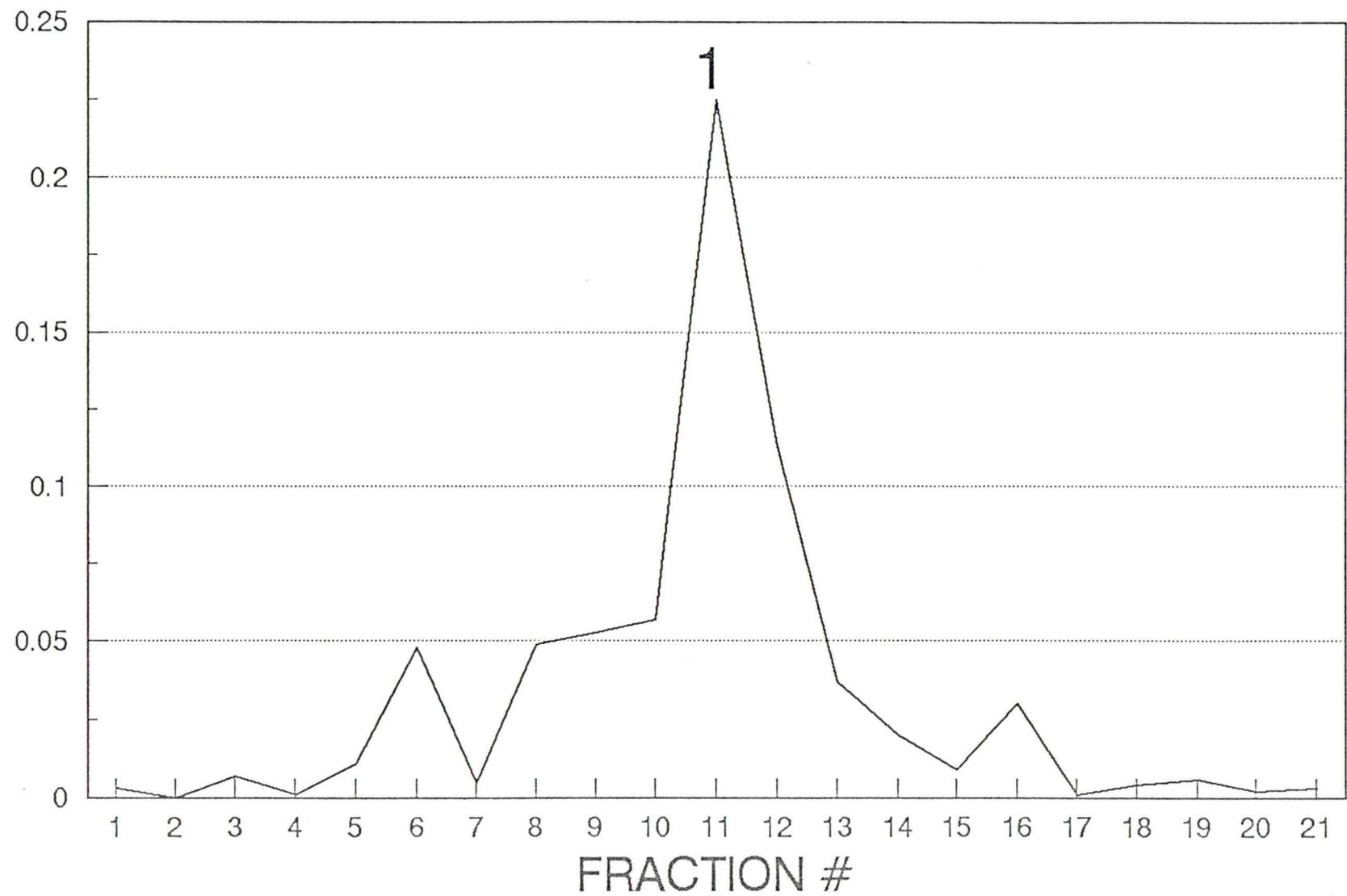
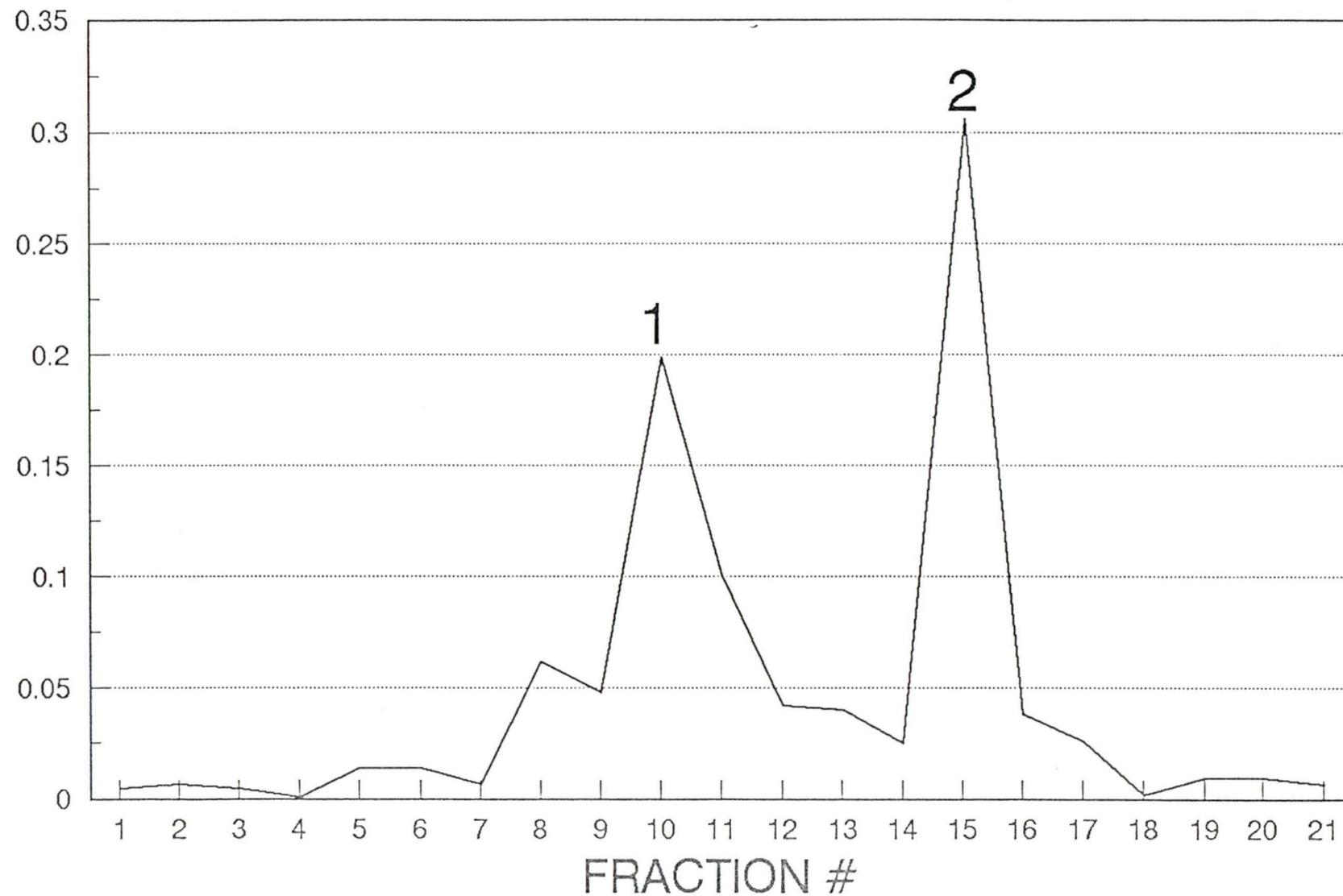


Figure 13: Profil d'élution des ribonucléoprotéines RohY1-hY3 par tamis moléculaire

Des particules RohY1-hY3 purifiées sur DEAE 8HR (HPLC) ont été fractionnées sur la colonne de tamis moléculaire TSK 300SW et les fractions contenant les particules RohY1-hY3 ont été identifiées à l'aide d'un test ELISA effectué avec un sérum anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa dilué 1/4000. Le pic 1 correspond aux particules RohY1-hY3, tel que démontré par l'identification des ARN hY1-hY3 extraits des particules immunoprécipitées et la masse moléculaire déduite pour la particule est d'environ 350 kDa. Le pic 2 correspond à une composante protéique reconnue par le sérum anti-Ro/SS-A à laquelle nous attribuons une masse moléculaire d'environ 61 kDa.

ABSORBANCE 492 nm



(PCA) de l'ARN de ces fractions a montré un degré de purification avancé des ribonucléoprotéines Ro/SS-A ainsi que l'absence de produits de dégradation. A cette étape, la quantité faible de matériel récupéré n'a pas permis de détecter les protéines associées par immunobuvardage sous conditions dénaturantes.

3.2.2 COMPOSITION DES RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro/SS-A DE CELLULES ANUCLÉÉES HUMAINES (CELLULES ERYTHROIDES)

Un extrait total de cellules érythroïdes anucléées humaines a été appliqué sur une colonne de DEAE 8HR (HPLC) afin d'effectuer une purification partielle des particules Ro/SS-A de cellules anucléées en vue d'une étude comparative de la composition de ces particules par rapport aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules nucléées (HeLa). La purification a été réalisée en absence d'addition d'ions magnésium ou zinc dans le milieu mais en présence d'inhibiteurs de RNase (DTT 1 mM et RNasine) et de protéases (PMSF et CLAP, 1 mM). Un lavage de la colonne avec un tampon TBS contenant 40 mM NaCl a permis de récupérer une portion non-adsorbée. Des éluions successives ont été faites avec un gradient discontinu de NaCl (TBS), 80 mM, 150 mM, 200 mM, 240 mM, 290 mM et 1000 mM. Les fractions obtenues à 240 mM et 290 mM NaCl ont été diluées immédiatement avec du Tris 50 mM (pH 7.4) à environ 150 mM NaCl pour éviter la perte de l'interaction ARN/protéine(s). Les composantes ribonucléoprotéiques ont été détectées dans

les fractions par immunoprécipitation des ARN et immunobuvardage dénaturant, respectivement.

La Figure 14 présente les ARN Ro/SS-A obtenus dans chaque fraction éluée, soit par extraction (PCA) des ARN totaux ou des ARN Ro/SS-A associés aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A immunoprécipitées. Les ribonucléoprotéines Ro/SS-A sont retenues sur la colonne à 40 mM de NaCl lors de la récupération du matériel non-adsorbé. Les particules RohY1 et RohY4 ont été éluées conjointement dans la fraction 290 mM NaCl alors que les autres fractions ne contiennent pas d'ARN Ro/SS-A. La Figure 15 montre les composantes protéiques retrouvées dans chacune des fractions. La portion non-adsorbée (NaCl 40 mM) contient la protéine Ro/SS-A 54 kDa. La protéine La/SS-B sous forme libre est retrouvée principalement dans la fraction 80 mM NaCl. Les fractions 150 mM et 200 mM NaCl, dépourvues d'ARN Ro/SS-A, contiennent du Ro/SS-A 54 kDa et 60 kDa alors que la fraction 290 mM NaCl, regroupant les ARN Ro/SS-A hY1 et hY4, contient le Ro/SS-A 60 kDa en absence de Ro/SS-A 54 kDa détectable. Cette distribution des ARN et des protéines Ro/SS-A au cours de l'éluion est très semblable au profil obtenu lors de la purification des particules Ro/SS-A de cellules nucléées (HeLa) sur DEAE 8HR (HPLC) puisque le Ro/SS-A 54 kDa existe majoritairement ou totalement non-associé aux particules Ro/SS-A et que le Ro/SS-A 60 kDa

Figure 14: Détection des ARN Ro/SS-A de cellules érythroïdes anucléées dans des fractions chromatographiques d'une colonne de DEAE 8HR (HPLC)

L'identification des ARN Ro/SS-A extraits des ribonucléoprotéines Ro/SS-A immunoprécipitées (lignes 2,4...) et des ARN totaux extraits avec du PCA à partir des ribonucléoprotéines isolées (lignes 1,3...) ont été effectuées sur des fractions d'un extrait total de cellules érythroïdes anucléées purifiées sur colonne de DEAE 8HR (HPLC) éluée avec un gradient discontinu de NaCl 80 mM, 150 mM, 200 mM, 240 mM et 290 mM. L'extrait identifié Total correspond à la portion non-purifiée et la portion non-adsorbée sur la colonne est identifiée 40 (mM NaCl).

FRACTIONNEMENT DES ARN Ro/SS-A DES GLOBULES ROUGES

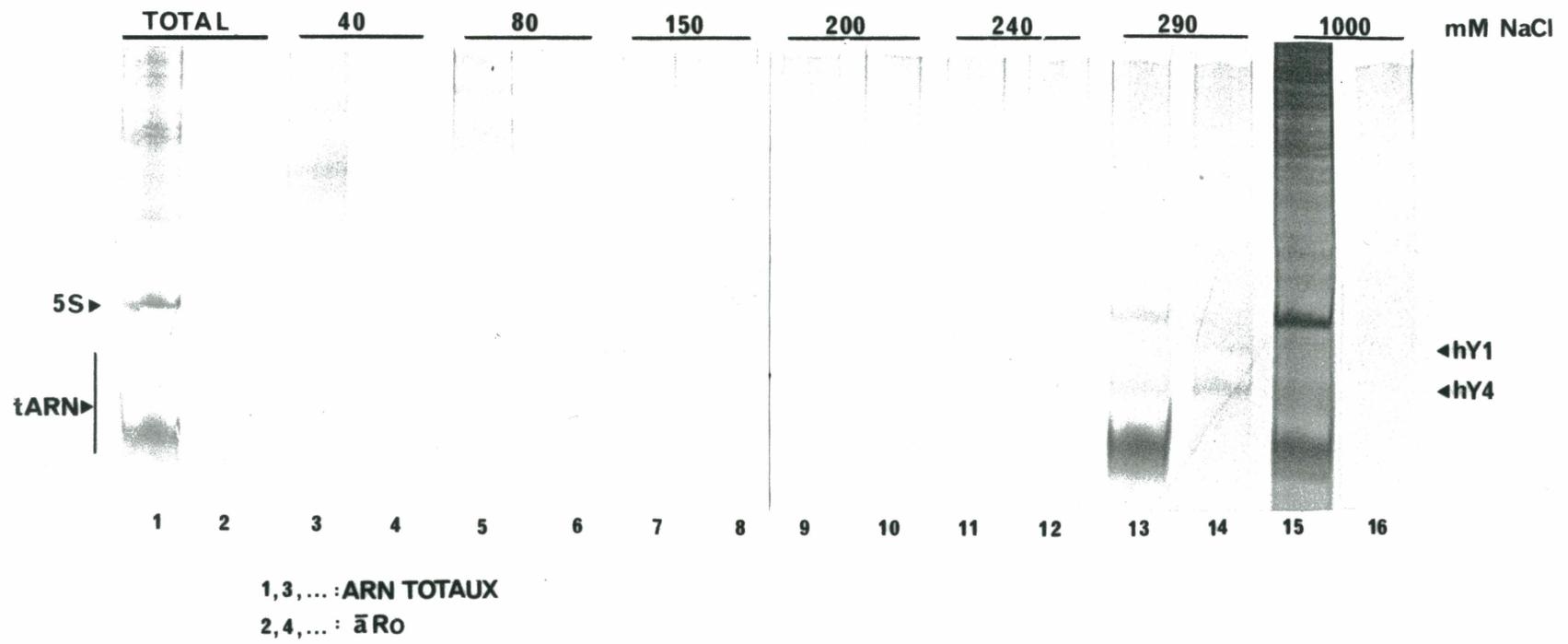
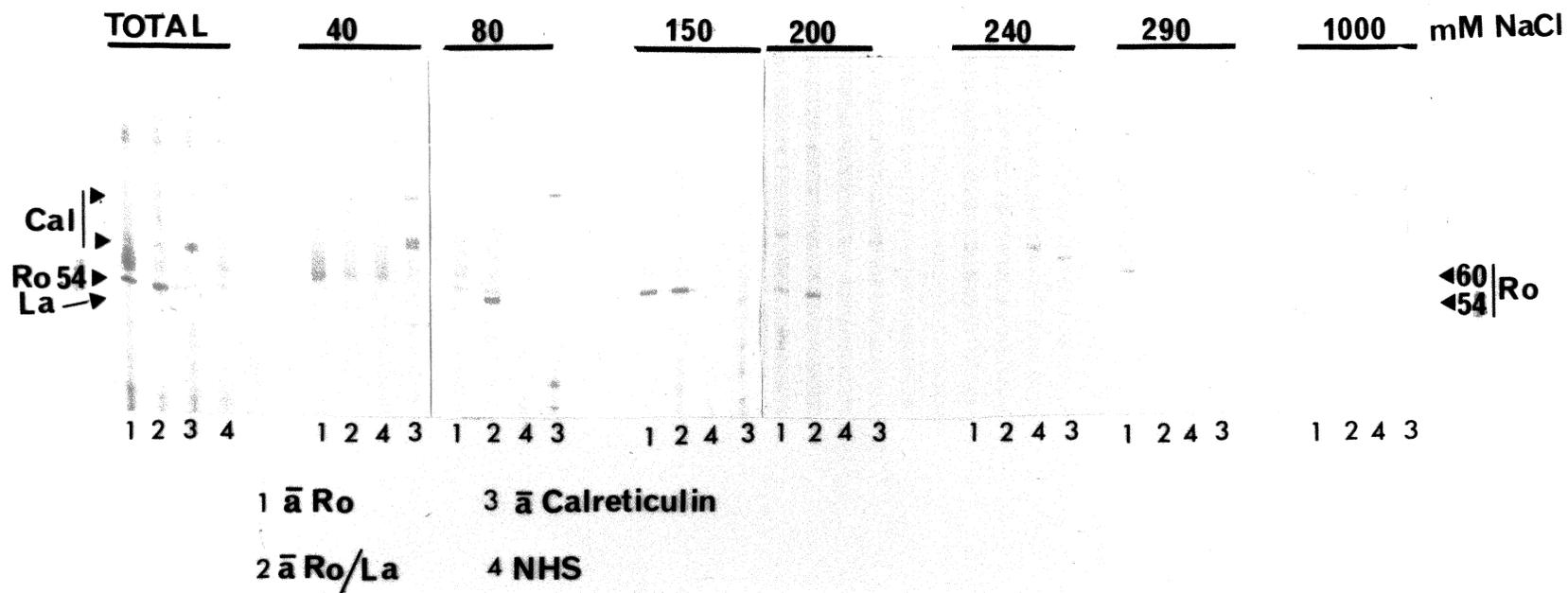


Figure 15: Détection des protéines Ro/SS-A et La/SS-B associées aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A des cellules érythroïdes anucléées suite à la purification sur DEAE 8HR (HPLC)

Les protéines retrouvées dans les fractions totale, non-adsorbée (40 mM NaCl), 80 mM, 150 mM, 200 mM, 240 mM, 290 mM et 1000 mM NaCl ont été révélées, après séparation par électrophorèse sous conditions dénaturantes, par immunobuvardage avec un sérum anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa (ligne 1), anti-Ro/SS-A 60, 52 kDa et La/SS-B (ligne 2), anti-calréticuline (ligne 3) et un sérum humain normal ou SNH (ligne 4), tous dilués 1/100.

FRACTIONNEMENT DES PROTEINES Ro/SS-A DES GLOBULES ROUGES



semble être le constituant principal des ribonucléoprotéines Ro/SS-A.

3.3 EFFET DES CATIONS DIVALENTS SUR LA STABILITÉ DES RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro/SS-A DE CELLULES NUCLÉÉES (HeLa)

Dans le but d'étudier systématiquement les effets potentiels des cations divalents magnésium et zinc sur la stabilité des ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules HeLa, 3 types d'approches ont été envisagées: la réassociation des composantes ARN et protéine(s) libres, la rétention de la protéine Ro/SS-A 52 kDa dans les particules purifiées et l'échange des composantes ARN et protéine(s) des ribonucléoprotéines Ro/SS-A.

3.3.1 RÉASSOCIATION ARN/PROTEINES

Des fractions chromatographiques contenant les ribonucléoprotéines Ro/SS-A ont subi une dissociation de leurs composantes ARN et protéines suite à leur purification dans un milieu salin concentré. Ces extraits ont été dilués pour ramener la concentration saline à 120 mM de NaCl et mis en présence de MgCl₂ 10 mM ou ZnCl₂ à des concentrations croissantes de 0.1 mM à 5.0 mM. De plus, un extrait dilué n'a reçu aucune addition de cation. Le degré de réassociation a été évalué d'après la capacité de détecter les ARN Ro/SS-A extraits des ribonucléoprotéines

immunoprécipitées. Dans certains extraits, un culot a été observé; une extraction PCA pour les ARN totaux a donc été faite sur les culots (s'il y a lieu) et les surnageants. Le Tableau 5 résume les résultats obtenus.

La dilution de l'extrait avec ou sans ajout de $MgCl_2$ n'a pas favorisé une réassociation qui aurait rendu les ribonucléoprotéines Ro/SS-A immunoprécipitables. En présence de $ZnCl_2$ à partir de 0.5 mM, un culot a été détecté et celui-ci contient les ARN Ro/SS-A. A 5.0 mM $ZnCl_2$, les ARN Ro/SS-A sont tous retrouvés dans le culot. Donc, l'apparente "réassociation" observée en immunoprécipitation résulterait d'une précipitation non-spécifique d'ARN puisqu'à plus basse concentration de $ZnCl_2$, cette "réassociation" disparaît en même temps que le culot. Pour confirmer ceci, des immunoprécipitations avec un sérum anti-Ro/SS-A et un sérum normal ont été faites sur un extrait dilué contenant $ZnCl_2$ 1 mM: dans les 2 cas, les ARN Ro/SS-A ont été détectés.

3.3.2 RÉTENTION DU Ro/SS-A 52 Kd DANS LES PARTICULES PURIFIÉES

Cet aspect de l'influence des cations magnésium et zinc a été étudié de 2 façons: des éluions successives d'un extrait total HeLa sur DEAE-cellulose en présence de concentrations croissantes de $MgCl_2$ ou 2 éluions d'un

Tableau 5: Essais de conditions pouvant mener à la réassociation des composantes ARN et protéines Ro/SS-A dissociées en milieu salin concentré

Différentes conditions de réassociation ont été testées sur des extraits de ribonucléoprotéines Ro/SS-A dont les composantes ARN et protéines ont été dissociées par une forte concentration saline: une dilution pour ramener la concentration de NaCl à 120 mM avec ou sans ajout de MgCl₂ 10 mM ou en présence de ZnCl₂ 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 1.0 mM et 5.0 mM. La réassociation a été vérifiée par la capacité de détecter les ARN Ro/SS-A extraits des ribonucléoprotéines immunoprécipitées. La présence d'ARN Ro/SS-A a été vérifiée par extraction (PCA) des ARN totaux dans des culots formés en présence de ZnCl₂ 0.5 mM ou plus et dans les surnageants de tous les extraits.

Conditions	Réassociation (immunoprécipitation)	ARN totaux (PCA)	
		Culot	Surnageant
Dilution	-	-	+
Dilution + MgCl ₂ 10 mM	-	-	+
Dilution + ZnCl ₂ 0.1 mM	-	-	+
0.3 mM	-	-	+
0.5 mM	+	+	+
1.0 mM	+	++	+
5.0 mM	++	++	-

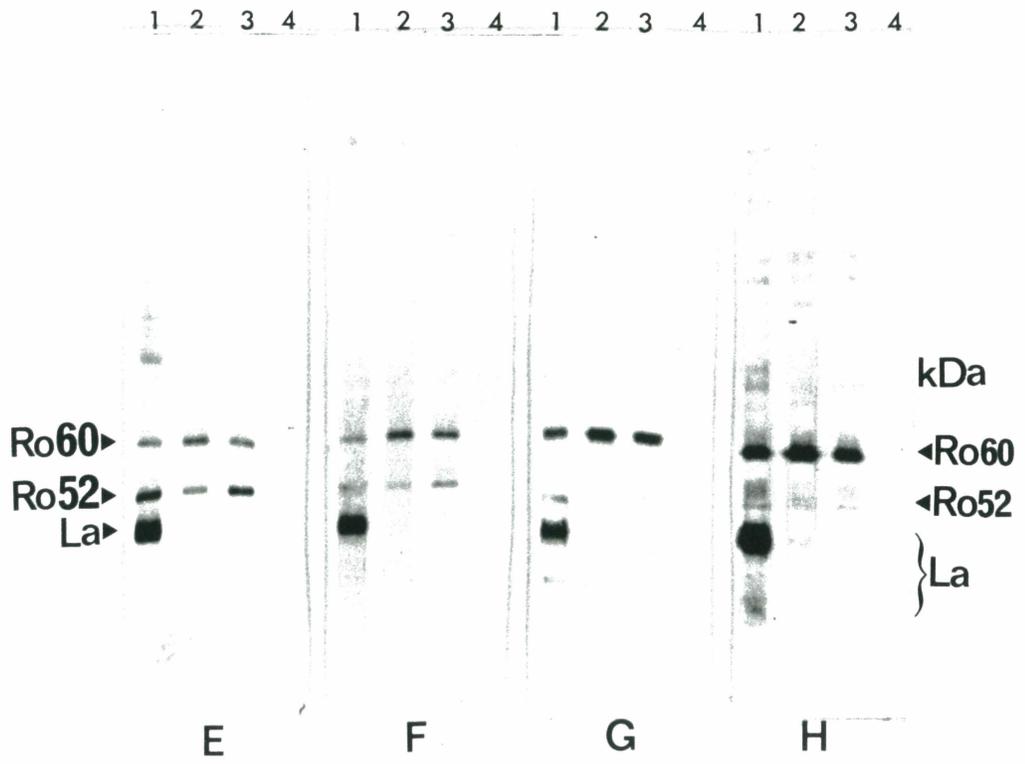
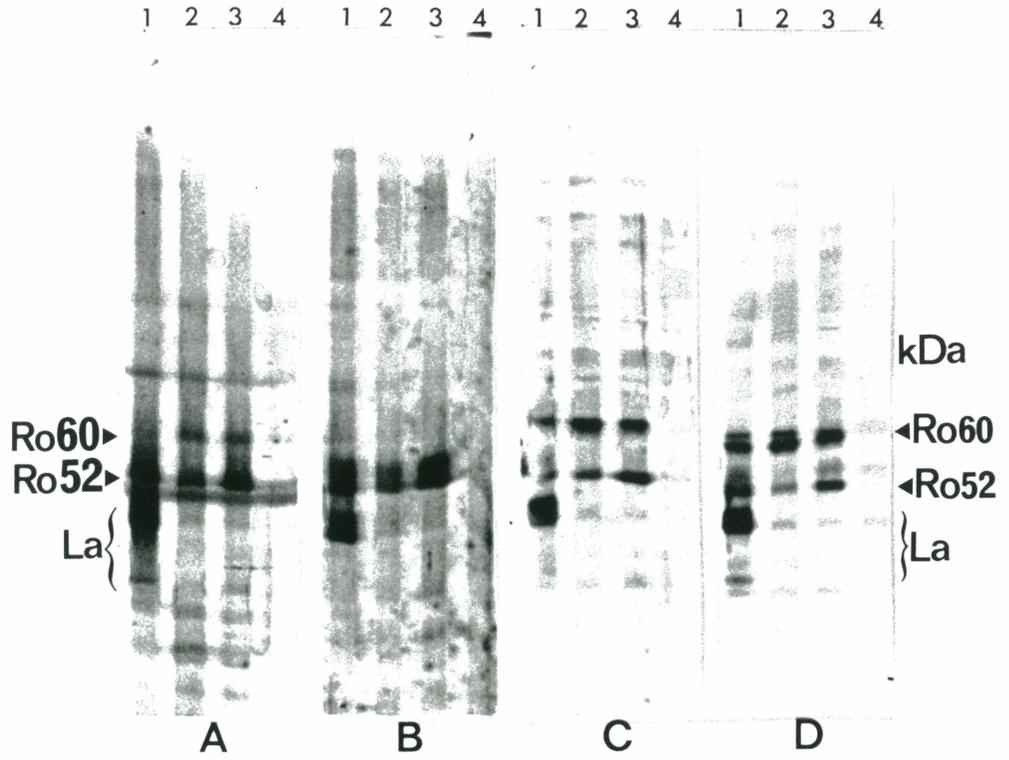
extrait total HeLa sur DEAE-cellulose avec un gradient linéaire en présence de $MgCl_2/ZnCl_2$ ou EDTA.

Au niveau du premier protocole, des extraits totaux de cellules HeLa ont été élués sur une cartouche DEAE-cellulose dans un tampon TBS/NaCl 250 mM contenant du $MgCl_2$ à des concentrations de 0,1,3,5,10 et 25 mM. Les fractions éluées ont été analysées en immunobuvardage sous conditions dénaturantes pour déterminer si une variation semi-quantitative de la quantité de Ro/SS-A 52 kDa existe dans ces extraits, en rapport avec la concentration de $MgCl_2$ présente durant l'éluion. La Figure 16 permet d'observer la présence, dans les 6 éluions, des protéines Ro/SS-A 60 kDa et La/SS-B, d'une abondance uniforme. Contrairement à une observation précédente, le Ro/SS-A 52 kDa est facilement détecté même sans addition de $MgCl_2$. De plus, non seulement une progression croissante de la quantité de cette protéine dans un milieu contenant plus de magnésium n'a pas été obtenue mais il semble même que l'abondance de Ro/SS-A 52 kDa soit diminuée à partir de 3 mM $MgCl_2$.

En seconde partie, une autre approche a été tentée sur la base de l'hypothèse qu'un effet des cations serait plus facilement mis en évidence si une purification plus avancée était appliquée à l'extrait cellulaire total. A cette fin, 2 extraits ont été successivement élués sur une cartouche DEAE-cellulose avec un gradient procédant par plateaux de 150, 190, 220 et 250 mM NaCl dans un tampon TBS. Les

Figure 16: Rétention du Ro/SS-A 52 kDa dans les ribonucléoprotéines Ro/SS-A des cellules HeLa en présence d'ions magnésium

Un immunobuvardage dénaturant en conditions dénaturantes a été effectué sur des fractions obtenues par purification d'extraits totaux de cellules HeLa sur DEAE-cellulose avec du TBS/NaCl 250 mM en présence de concentrations de MgCl₂ de 0 mM (C), 1 mM (D), 3 mM (E), 5 mM (F), 10 mM (G) et 25 mM (H). Les sérums utilisés à une dilution 1/100 sont des sérums anti-Ro/SS-A 60, 52 kDa et La/SS-B (ligne 1), anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa (lignes 2 et 3) et un sérum normal humain ou SNH (ligne 4). Les 2 bandes identifiées La correspondent au La/SS-B intact de 48 kDa et à son principal produit de dégradation de 43 kDa.



purifications ont été réalisées, respectivement, en présence de $MgCl_2$ 1.5 mM/ $ZnCl_2$ 10 μ M et EDTA 2 mM (chélation des cations).

Comme précédemment, les fractions recueillies (4 plateaux) dans chacune des 2 éluions ont été appliquées à un immunobuvardage sous conditions dénaturantes.

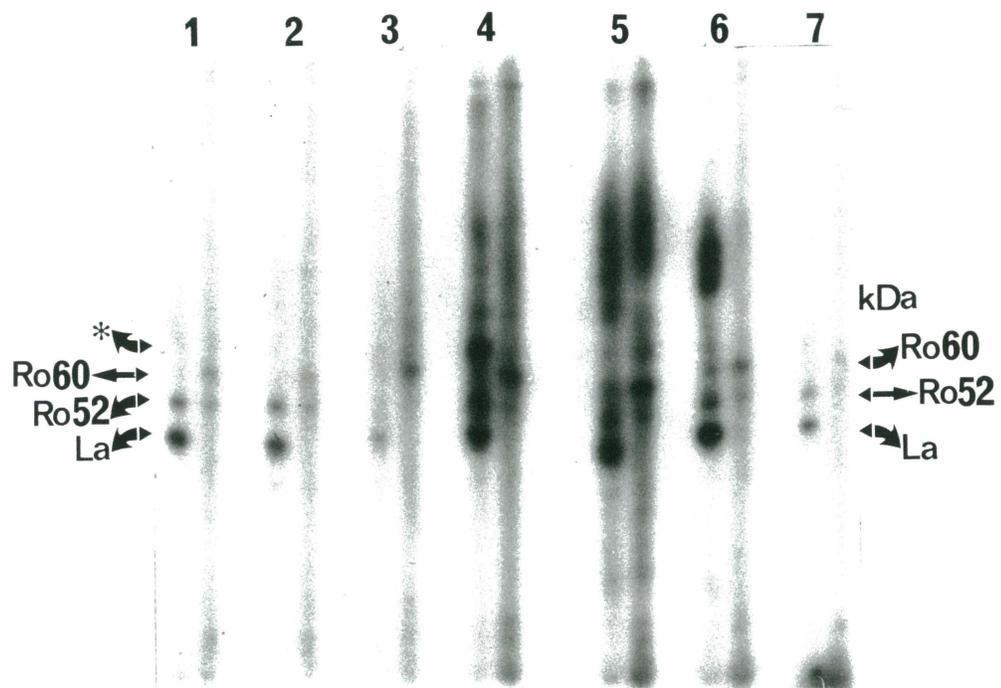
La Figure 17 expose l'autoradiogramme obtenu par révélation des bandes protéiques avec la protéine A étiquetée à ^{125}I . La comparaison des plateaux d'éluion correspondants pour les 2 purifications montre l'absence de fluctuations des niveaux de Ro/SS-A 52 kDa en présence ou absence des 2 cations. La seule différence notée dans les profils protéiques se situe au niveau du plateau 220 mM NaCl de l'éluion faite en présence d'EDTA où le sérum anti-Ro/SS-A et La/SS-B reconnaît une bande de plus haut poids moléculaire que le Ro/SS-A 60 kDa (visualisé par le sérum anti-Ro/SS-A) et où le sérum anti-Ro/SS-A ne reconnaît pas le Ro/SS-A 52 kDa. Ce même type de bandes est retrouvé aux plateaux 190 mM des 2 éluions. La signification de cette reconnaissance inusitée n'est pas connue.

3.3.3 ÉCHANGE DES COMPOSANTES ARN ET PROTEINES DES PARTICULES Ro/SS-A

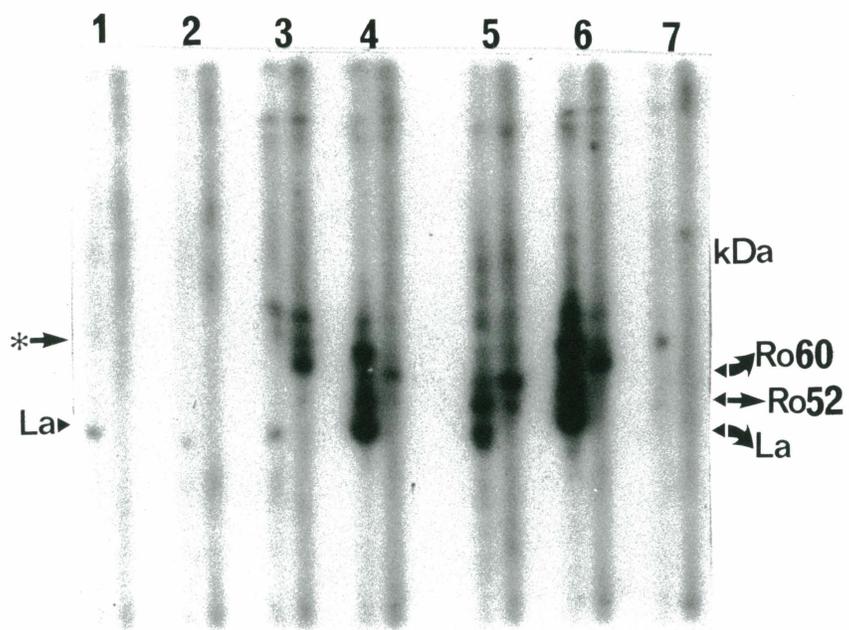
Par cette approche, un effet du magnésium et/ou du zinc sur la stabilité des ribonucléoprotéines Ro/SS-A a été mis en évidence. Des particules Ro^{hY5} purifiées en présence ou

Figure 17: Analyse de l'effet des ions magnésium et zinc sur la présence de la protéine Ro/SS-A 52 kDa dans les ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées à partir de cellules HeLa

Cet autoradiogramme d'un immunobuvardage sous conditions dénaturantes a été obtenu à partir d'extraits totaux de cellules HeLa purifiées sur DEAE-cellulose avec un gradient de NaCl (TBS) par plateaux à 150 mM (ligne 3), 190 mM (ligne 4), 220 mM (ligne 6) et 250 mM (ligne 7), soit en présence de MgCl₂ 1.5 mM et ZnCl₂ 10 µM (A) ou de EDTA 2 mM (B). Les lignes 1 et 2 correspondent, respectivement, à l'extrait total et à la portion non-adsorbée sur DEAE-cellulose. La ligne 5 est un témoin positif d'un extrait total de cellules HeLa. Chaque fraction est révélée avec un sérum anti-Ro/SS-A 60, 52 kDa et La/SS-B et un sérum anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa (dilution 1/100). L'astérisque indique une bande visualisée par le sérum anti-Ro/SS-A et La/SS-B de poids moléculaire plus élevé que le Ro/SS-A 60 kDa.



A



B

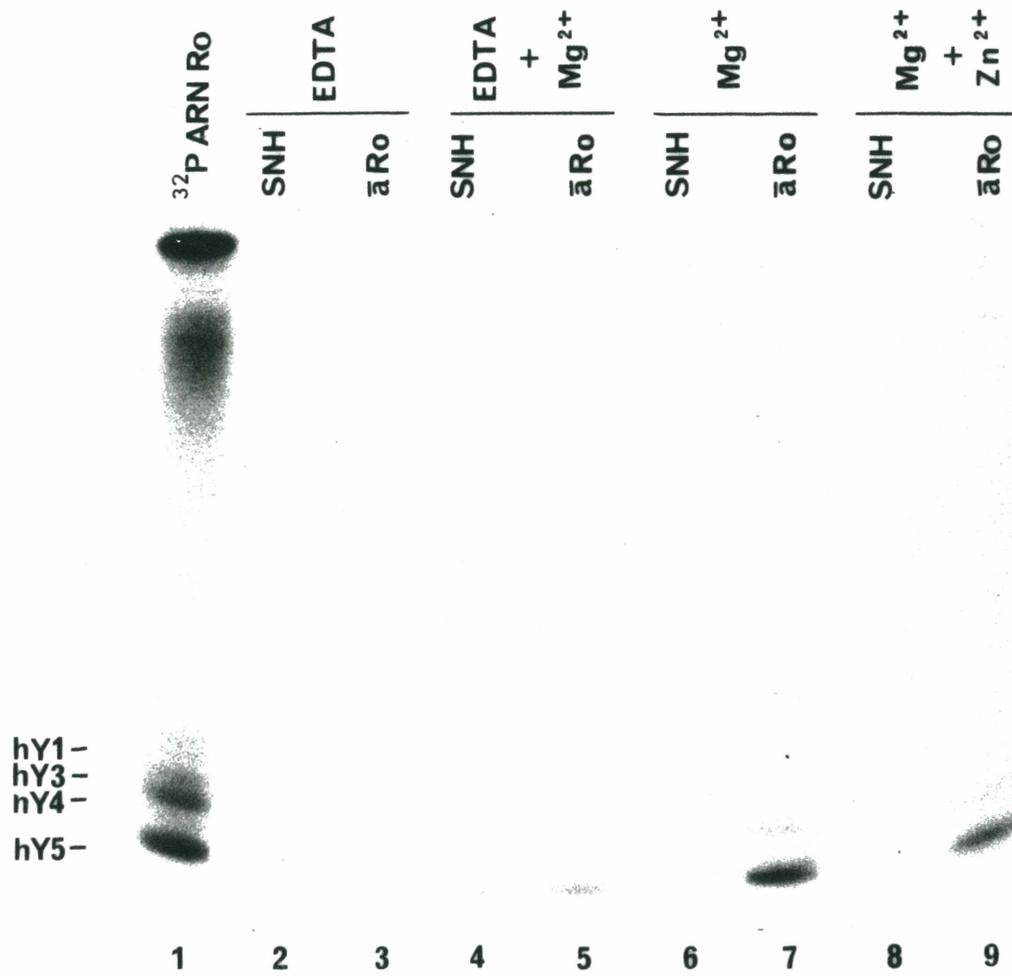
absence d'EDTA 2 mM ont été incubées avec des ARN hY1-hY5 radiomarqués *in vivo* avec du [³²P] orthophosphate. Les milieux contenant les particules purifiées en présence ou absence d'EDTA ont été supplémentés soit avec MgCl₂ 2 mM, soit avec ZnCl₂ 10 μM, respectivement.

Après l'incubation, l'échange ribonucléoprotéique consistant en un remplacement de l'ARN présent dans les ribonucléoprotéines Ro/SS-A par l'ARN hY5 radiomarqué a été vérifié par l'identification de ces ARN marqués qui ont été extraits des ribonucléoprotéines immunoprécipitées avec un sérum anti-Ro/SS-A.

La Figure 18 représente l'autoradiogramme effectué à partir du gel contenant les ARN marqués extraits des ribonucléoprotéines Ro/SS-A immunoprécipitées. Des bandes hY5 surtout et hY4 dans certains cas sont l'indice d'un échange de la protéine Ro/SS-A. Pour les particules RohY5 purifiées en présence d'EDTA, un tel échange est légèrement favorisé par l'addition de MgCl₂ 2 mM dans le milieu. Un échange important est obtenu pour les particules RohY5 purifiées en présence de magnésium. L'association n'est pas favorisée par l'addition de zinc. Donc, un échange des composantes ribonucléoprotéiques a lieu si la particule RohY5 est purifiée en présence de magnésium ou si cette protéine est mise en présence du cation magnésium après sa purification dans l'EDTA 2 mM.

Figure 18: Analyse de l'effet des ions magnésium et zinc sur la stabilité des particules RohY5 de cellules HeLa

Des particules RohY5 de cellules HeLa purifiées en présence d'EDTA 2 mM ou de Mg^{2+} 2 mM ont été incubées avec des ARN Ro/SS-A hY1-hY5 radiomarqués au [^{32}P] orthophosphate en présence ou non de $MgCl_2$ 2 mM pour les particules RohY5 purifiées avec EDTA 2 mM (EDTA + Mg^{2+} OU EDTA, respectivement) et en présence ou non de $ZnCl_2$ 10 μ M pour les particules RohY5 purifiées en présence de magnésium (Mg^{2+} + Zn^{2+} OU Mg^{2+} , respectivement). Le déplacement des protéines Ro/SS-A des particules RohY5 aux ARN Ro/SS-A radiomarqués est vérifié par immunoprécipitation (anti-Ro) de ces ARN hY1-hY5. Chaque extrait est également immunoprécipité avec un sérum normal humain (SNH) comme contrôle négatif. La ligne 1 (^{32}P ARN Ro) démontre la position des ARN Ro/SS-A radiomarqués préparés par immunoprécipitation d'un extrait total HeLa avec un sérum anti-Ro/SS-A.



4. DISCUSSION

A partir de cellules HeLa en culture et de cellules érythroïdes anucléées humaines, nous avons purifié biochimiquement les ribonucléoprotéines Ro/SS-A dans le but de caractériser leur structure native, particulièrement au niveau des polypeptides associés.

Durant le processus de purification, nous avons travaillé dans des conditions qui permettent de préserver l'intégrité des particules isolées. L'obtention de matériel dégradé à partir de tissu placentaire humain nous a amené à utiliser plutôt des cellules HeLa en culture pour la purification des ribonucléoprotéines Ro/SS-A des cellules nucléées. Les conditions d'extraction plus douces requises pour isoler les particules à partir de cellules en culture ont permis d'obtenir du matériel intact. Les composantes ribonucléoprotéiques ont été préservées de la dégradation étant donné que la purification a été effectuée dans des conditions d'inhibition des ribonucléases et des protéases, ainsi qu'à une température de 4°C et à pH physiologique. Les conditions salines utilisées pour l'élution des ribonucléoprotéines sur les diverses résines ont été maintenues les plus basses possibles puisqu'il est connu que l'association du Ro/SS-A 60 kDa avec les ARN Ro/SS-A est brisée dans des tampons de force ionique assez basse, soit 500 mM NaCl (BOIRE et CRAFT, 1990). Dans ce but, nous avons préféré la résine DEAE-cellulose à la résine QMA (copolymère

d'acrylamide sur silice) puisque cette dernière requiert des concentrations salines trop élevées (affinité plus élevée) pour l'éluion des particules Ro/SS-A. De même, les fractions éluées des résines ont été immédiatement diluées à environ 120 mM NaCl. Finalement, nous avons planifié un protocole de purification qui s'effectue dans un délai minimal pour réduire la probabilité de dégradation des composantes ARN et protéines. En particulier, le polypeptide La/SS-B est très susceptible aux protéases intracellulaires, menant souvent à la détection d'un produit de dégradation spécifique de 43 kDa (HOCH et BILLINGS, 1984).

Nous avons pu constater que ces mesures ont été efficaces puisque plusieurs indices indiquent que la purification a effectivement permis d'obtenir des ribonucléoprotéines Ro/SS-A structurellement intègres. La possibilité d'immunoprécipiter les ARN Ro/SS-A avec des sérums de spécificité anti-Ro/SS-A 60 kDa démontre que les composantes ARN et protéines demeurent en association dans le complexe ribonucléoprotéique. De plus, ces 2 portions n'ont pas subi de dégradation car les ARN immunoprécipités et les protéines visualisées en immunoblot dénaturant comigrent avec les constituants correspondants de l'extrait total. Un gradient de sucrose 10-30% utilisé pour fractionner les particules Ro/SS-A selon leur densité a démontré la comigration de particules Roh^y5 semi-purifiées sur DEAE-cellulose et de

particules RohY5 d'un extrait brut, ce qui suggère que la ribonucléoprotéine n'a perdu aucun de ses constituents et que ceux-ci n'ont pas été dégradés. Nous supposons qu'il en est de même pour les ribonucléoprotéines RohY1-hY4, bien qu'une observation équivalente n'ait pas été réalisée. Un immunobuvardage en conditions natives effectué sur des particules RohY5 purifiées sur DEAE 8HR (HPLC) montre une bande caractéristique des ribonucléoprotéines Ro/SS-A contenant une protéine La/SS-B associée, ce qui suggère que ce composant est demeuré associé à la particule durant la purification. Cette observation est renforcée par la présence de 2 bandes qui sont caractéristiques des populations de ribonucléoprotéines contenant la protéine La/SS-B. L'étape de tamis moléculaire des populations ribonucléoprotéiques RohY5, RohY4 et RohY1-hY3 a permis de déterminer une masse moléculaire qui est très semblable à ce qui a été rapporté précédemment pour des particules natives, soit environ 300 à 350 kDa pour RohY5 et RohY1-hY3 et environ 230 kDa pour RohY4 (BOIRE et CRAFT, 1990). Néanmoins, la colonne et les protéines de référence que nous avons utilisés ont été plus ou moins adéquats pour obtenir une détermination précise des masses moléculaires des particules Ro/SS-A dans le champ des valeurs concernées. Cependant, ces poids moléculaires ont déjà été déterminés par Boire et Craft (1990) et nos résultats ont confirmé ces données.

Nous avons également recherché un rôle potentiel du magnésium et du zinc au niveau de la réassociation des composantes ARN et protéines des particules Ro/SS-A, dans un effort supplémentaire pour préserver l'intégrité fragile des ribonucléoprotéines lors de la purification. Contrairement aux effets stabilisateurs rapportés par Cunningham et al. (1991) ainsi que Celander et Cech (1991), la dissociation des composantes ribonucléoprotéiques se produisant dans un milieu de force ionique élevée s'est montrée irréversible en dépit de la dilution de l'extrait et de l'ajout des 2 cations. Il est donc essentiel d'appliquer les mesures destinées à prévenir cette dissociation. Non seulement ces cations ne semblent pas favoriser une réassociation, mais le magnésium (du moins à une concentration de 2 mM) semble même avoir un effet déstabilisateur sur la ribonucléoprotéine Ro/SS-A. En effet, la purification de Ro^{hY5} en présence d'EDTA (chélateur des cations divalents présents dans le milieu) rend ces particules inaptées à un échange de la composante Ro/SS-A 60 kDa avec des ARN Ro/SS-A marqués. Cet échange est favorisé par l'ajout de magnésium à des particules Ro^{hY5} purifiées. Le cation zinc ajouté (ZnCl₂ 10 µM) ne semble pas avoir un effet additif. Il ne semble donc pas que ces cations soient utiles pour préserver les interactions ARN/protéines existant dans les ribonucléoprotéines Ro/SS-A.

Ces particules Ro/SS-A intactes ont été isolées à un degré avancé de purification puisque la détection des ARN Ro/SS-A et des ARN totaux dans les fractions isolées sur les résines DEAE 8HR (HPLC) et de tamis moléculaire a démontré que les ARN Ro/SS-A sont des constituents majeurs de chacune de ces fractions. De plus, le profil d'éluion des protéines totales (non-montré) lors de ces 2 dernières étapes de purification indique que les fractions contenant l'antigène Ro/SS-A sont accompagnées d'une faible quantité d'autres protéines, ce qui met en évidence le haut degré d'enrichissement des ribonucléoprotéines Ro/SS-A lors de ces étapes de purification.

La purification de l'autoantigène Ro/SS-A à partir de cellules anucléées a mis en évidence une hétérogénéité structurale des ribonucléoprotéines Ro/SS-A chez différents types cellulaires d'une même espèce. Conformément à la littérature (RADER et al., 1989; O'BRIEN et HARLEY, 1990), nous avons montré qu'un sous-groupe de ribonucléoprotéines Ro/SS-A existe chez les cellules érythroïdes anucléées, soit RohY1 et RohY4. Par contre, l'hétérogénéité rapportée pour la composante protéique (ITOH et al., 1990) n'a pas été vérifiée. Nous avons assumé que la composante protéique isolée des cellules érythroïdes anucléées est un polypeptide Ro/SS-A de 54 kDa correspondant au Ro/SS-A 52 kDa lymphocytaire. L'immunobuvardage sous conditions dénaturantes a cependant permis d'observer que les cellules

érythroïdes anucléées contiennent des quantités de La/SS-B plus faibles que les lymphocytes, bien qu'il soit tout de même détectable. En effet, ITOH et al. (1990) ont rapporté que les cellules érythroïdes anucléées contiennent peu de La/SS-B alors que O'BRIEN et HARLEY (1990) ont démontré que des anticorps anti-La/SS-B n'immunoprécipitent pas d'ARN Ro/SS-A d'un lysat de cellules érythroïdes anucléées, ce qui signifie que, chez ces cellules, les ARN Ro/SS-A ne constituent pas un sous-groupe des ARN La/SS-B. Ceci reflète peut-être un présumé rôle nucléaire de La/SS-B qui se retrouverait donc préférentiellement chez des cellules nucléées.

Une hétérogénéité de la ribonucléoprotéine Ro/SS-A a également été démontrée chez un même type cellulaire. BOIRE et CRAFT (1990) ont obtenu 3 populations distinctes de ribonucléoprotéines Ro/SS-A par purification biochimique d'un extrait de cellules HeLa en culture: une fraction RohY5, une fraction RohY4 avec laquelle les ribonucléoprotéines La/SS-B copurifient et une fraction RohY1-hY4 contaminée par les particules La/SS-B. Nous avons confirmé cette hétérogénéité biochimique chez les cellules HeLa par l'isolation de 3 populations de particules Ro/SS-A intègres, soit RohY5, RohY4 et le groupe RohY1-hY3 sur DEAE 8HR (HPLC). Une hétérogénéité immunologique de la particule RohY5 avait auparavant été observée par la mise en évidence

de sérums reconnaissant spécifiquement le polypeptide Ro/SS-A 60 kDa en association avec l'ARN hY5 (BOIRE et CRAFT, 1989). De plus, la masse moléculaire des ribonucléoprotéines fractionnées en tamis moléculaire supporte la notion que ces particules sont constituées d'un ARN associé avec plusieurs polypeptides et les différences observées suggèrent que la composition protéique des ribonucléoprotéines peut varier, soit à cause de l'existence de nouvelles protéines Ro/SS-A non-identifiées ou de multimères de protéines ou de particules (BOIRE et CRAFT, 1990; PRUIJN et al., 1990).

La caractérisation en immunobuvardage sous conditions dénaturantes des protéines associées aux particules Ro/SS-A purifiées à partir de cellules nucléées et anucléées a suggéré que le Ro/SS-A 52/54 kDa serait tout au plus une composante mineure des ribonucléoprotéines Ro/SS-A humaines. La purification des populations de ribonucléoprotéines Ro/SS-A de cellules HeLa effectuée par BOIRE et CRAFT (1990) a montré que les protéines Ro/SS-A 60 kDa et La/SS-B sont des composés stables de la particule Ro^{hY5} au moins, mais la présence de la protéine Ro/SS-A 52 kDa n'a pas pu être vérifiée à l'époque, probablement à cause du système de gel de polyacrylamide dénaturant qui résultait en une comigration du Ro/SS-A 52 kDa et du La/SS-B 48 kDa. L'utilisation de conditions de gel dénaturant améliorant la discrimination entre les protéines dans cette région nous a

permis de détecter cette composante des ribonucléoprotéines Ro/SS-A qui était passée inaperçue.

La purification d'un extrait total de cellules HeLa sur DEAE-cellulose a montré que la majorité du Ro/SS-A 52 kDa de cet extrait se retrouve dans une fraction non-adsorbée sur la résine et qui ne contient pas d'ARN Ro/SS-A, ni de protéine Ro/SS-A 60 kDa, alors que la fraction regroupant ces ARN contient du Ro/SS-A 60 kDa et du La/SS-B, mais peu de Ro/SS-A 52 kDa. Le La/SS-B est retrouvé dans toutes les fractions. Cette observation a été confirmée à l'étape de purification sur DEAE 8HR (HPLC) puisque les fractions contenant les populations de ribonucléoprotéines Ro/SS-A contiennent des protéines Ro/SS-A 60 kDa et du La/SS-B, mais de faibles quantités de Ro/SS-A 52 kDa associées avec RohY5 et RohY1-hY3. La faible quantité de matériel récupéré à l'étape du tamis moléculaire n'a pas permis la détection de la composante protéique mais des observations ultérieures (Boire et al., non publié) l'ont confirmé. La purification de l'extrait total de cellules érythroïdes anucléées sur DEAE 8HR (HPLC) a renforcé les données obtenues à partir des cellules nucléées puisque le Ro/SS-A 54 kDa a été retrouvé majoritairement dans une fraction ne contenant pas d'ARN Ro/SS-A et la fraction regroupant les particules RohY1 et RohY4 contient du Ro/SS-A 60 kDa, mais pas de Ro/SS-A 54 kDa, tel que démontré en immunobuvardage dénaturant. Le La/SS-B, peu abondant, est retrouvé principalement sous

forme libre dans une fraction ne contenant ni ARN Ro/SS-A ni protéines Ro/SS-A 60 et 54 kDa. Ceci suggère fortement que le Ro/SS-A 52/54 kDa est, au mieux, un constituant mineur des ribonucléoprotéines Ro/SS-A et qu'il existe majoritairement sous forme libre, c'est-à-dire non-associé aux ARN Ro/SS-A.

Nos résultats tendent à démontrer que le Ro/SS-A 52/54 kDa existerait en association avec le Ro/SS-A 60 kDa, ce qui signifie que ce dernier peut être soit un constituant stable des ribonucléoprotéines Ro/SS-A ou qu'il peut exister en complexe protéique avec le Ro/SS-A 52/54 kDa. En effet, le profil d'éluion des protéines Ro/SS-A des cellules HeLa sur DEAE 8HR (HPLC) a permis la détection de pics ne démontrant pas d'ARN Ro/SS-A en immunoprécipitation, mais contenant les protéines Ro/SS-A 60 kDa, 52 kDa et La/SS-B en immunobuvardage dénaturant. De même, la purification sur DEAE 8HR (HPLC) des particules Ro/SS-A des cellules érythroïdes anucléées a mené à l'isolation de 2 fractions ne contenant aucun ARN hY1 ou hY4, mais contenant du Ro/SS-A 60 et 54 kDa en immunobuvardage dénaturant.

Cette non-association du Ro/SS-A 52/54 kDa avec les ARN Ro/SS-A ne semble pas provenir d'une dissociation du polypeptide lors de la purification puisque l'étape de la fixation de l'extrait sur les résines DEAE-cellulose et DEAE 8HR (HPLC) durant laquelle la majorité du Ro/SS-A 52/54 kDa se retrouve dans une fraction dépourvue d'ARN Ro/SS-A est

effectuée à pH physiologique et dans des conditions salines légèrement hypotoniques (cellules HeLa à 120 mM NaCl) et même très hypotoniques (cellules érythroïdes anucléées à 40 mM NaCl) par rapport au cytoplasme cellulaire. De plus, le système de gel de polyacrylamide dénaturant modifié que nous avons utilisé n'est pas responsable de la non-détection du Ro/SS-A 52/54 kDa associé avec les ribonucléoprotéines Ro/SS-A puisque cette composante ne comigre pas avec le La/SS-B 48 kDa dans ce système et qu'elle est très bien visualisée dans des fractions ne contenant pas d'ARN Ro/SS-A. Il semble que le polypeptide Ro/SS-A 52/54 kDa existe majoritairement sous forme libre (c'est-à-dire, hors du complexe ribonucléoprotéique) puisque l'addition d'ions magnésium aux extraits cellulaires HeLa au cours d'une purification n'a pas favorisé une interaction du polypeptide avec les particules Ro/SS-A (de cellules nucléées, du moins). En effet, le Ro/SS-A 52 kDa a été retrouvé (de façon mineure) dans des fractions contenant des ARN Ro/SS-A même en absence de MgCl₂, ce qui suggère que ce cation ne participe pas à l'établissement d'une interaction entre le 52 kDa et les ARN Ro/SS-A. Le cation ne semble pas non plus favoriser cette interaction de façon dose-dépendante; la quantité de Ro/SS-A 52 kDa est même diminuée dans des fractions ribonucléoprotéiques contenant plus de 3 mM de MgCl₂. Ceci rejoint l'effet discuté plus haut de déstabilisation des ribonucléoprotéines Ro/SS-A par le magnésium.

Quand BEN-CHETRIT et al. (1988) ont montré que 80% des sérums ayant une spécificité pour la protéine Ro/SS-A 60 kDa reconnaissent également le Ro/SS-A 52 kDa, il a été supposé que ce polypeptide est un constituant majeur des ribonucléoprotéines Ro/SS-A sans avoir pu affirmer s'il interagit directement avec l'ARN ou par l'intermédiaire d'une autre protéine. Ce groupe aurait démontré que des sérums présumés monospécifiques anti-Ro/SS-A 52 kDa immunoprécipitent le même spectre d'ARN que des sérums anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa. De même, des anticorps anti-Ro/SS-A 52 kDa purifiés par affinité précipiteraient les mêmes ARN que des anticorps anti-Ro/SS-A 60 kDa purifiés par affinité, suggérant que les 2 protéines seraient des composantes du même complexe ribonucléoprotéique. Des observations semblables ont été obtenues par SLOBBE et al. (1991b). De plus, selon PRUIJN et al. (1991), un sérum présumé monospécifique anti-Ro/SS-A 52 kDa immunoprécipiterait une large portion des ribonucléoprotéines Ro/SS-A formées *in vitro* avec des ARN Ro/SS-A marqués et des extraits cellulaires bruts.

Les travaux de ces équipes ont de plus suggéré une interaction du Ro/SS-A 52 kDa avec le polypeptide de 60 kDa dans la particule Ro/SS-A. L'équipe de BEN-CHETRIT (1988) a déterminé que des sérums ou des anticorps purifiés par affinité anti-Ro/SS-A 60 kDa précipitent une faible quantité de 52 kDa alors que des anticorps anti-52 kDa précipitent

les 2 polypeptides Ro/SS-A, impliquant qu'une partie du Ro/SS-A 52 kDa existerait en complexe avec le Ro/SS-A 60 kDa. Plus précisément, PRUIJN et al. (1991) ainsi que SLOBBE et al. (1991a) ont observé que la liaison du Ro/SS-A 52 kDa à l'ARN serait complètement dépendante de l'association du Ro/SS-A 60 kDa avec ces mêmes ARN. Ceci suggère que le Ro/SS-A 52 kDa se lierait aux ribonucléoprotéines Ro/SS-A par l'intermédiaire d'une interaction avec le Ro/SS-A 60 kDa qui est un constituant stable des particules Ro/SS-A. La séquence du Ro/SS-A 52 kDa démontre l'absence de motif RNP consensus et la présence de domaine de type doigt-de-zinc possiblement impliqués dans la liaison avec d'autres protéines ainsi que de «Leucine zipper» présents chez des protéines capables de dimérisation (BERG, 1990). Nous ne savons pas si ces domaines ou des régions adjacentes contribuent à une interaction directe entre les protéines Ro/SS-A 52 kDa et 60 kDa à l'intérieur ou hors du complexe ribonucléoprotéique.

Par contre, une interaction directe ARN-indépendante entre ces 2 protéines a aussi été démontrée et une coprécipitation stable des 2 protéines en présence de ribonucléase a été observée (CHAN et al., 1991). Nos résultats appuient davantage cette dernière observation. En effet, les évidences de monospécificité des sérums et anticorps purifiés par affinité qui ont été utilisés par plusieurs groupes proviennent de la démonstration de leur réactivité

en immunobuvardage dénaturant. Pourtant, il a été démontré par BOIRE et al. (1991) que la majorité des anticorps anti-Ro/SS-A 60 kDa dans un sérum anti-Ro reconnaissent des épitopes conformationnels sur cette protéine, c'est-à-dire qui ne sont pas présents sur les polypeptides dénaturés et qui ne sont pas détectables en immunobuvardage dénaturant. Ceci pourrait entraîner une contamination des sérums ou anticorps anti-Ro/SS-A 52 kDa présumés monospécifiques par des anticorps anti-Ro/SS-A 60 kDa menant à l'observation hâtive que le Ro/SS-A 52 kDa serait un constituant stable des particules Ro/SS-A.

D'après les résultats de la caractérisation des ribonucléoprotéines Ro/SS-A purifiées, nous proposons un modèle d'interactions existant chez ces particules. Les protéines Ro/SS-A 60 kDa et La/SS-B seraient des constituants stables de toutes les ribonucléoprotéines Ro/SS-A alors que le Ro/SS-A 52/54 kDa serait un constituant mineur de ces particules. Le 52/54 kDa se retrouverait donc préférentiellement associé avec le 60 kDa quand celui-ci n'est pas présent dans une particule Ro/SS-A. Le Ro/SS-A 60 kDa existerait donc aussi sous forme libre en plus d'être un constituant stable des ribonucléoprotéines Ro/SS-A. Il en est de même pour la protéine La/SS-B qui est également retrouvée sous forme libre tout au long de la purification. Ce modèle expliquerait la présence de groupes d'autoanticorps dans un même sérum si on suppose que la

particule native agirait directement comme un immunogène pour le système immunitaire. Ceci renforce la nécessité de s'intéresser à la caractérisation des particules intactes plutôt qu'à ses composantes dissociées. La démonstration de l'existence d'anticorps anti-Ro/SS-A 60 kDa natif et d'anticorps spécifiques anti-Ro^{hY5} (BOIRE et al., 1991; BOIRE et CRAFT, 1989) a constitué la première preuve de ce concept. Une évidence supplémentaire en faveur de cette hypothèse a été amenée par notre équipe qui a observé que des sérums anti-Ro/SS-A immunoprécipiteraient le Ro/SS-A 52 kDa purifié biochimiquement (présumé intact), ce qui permet de supposer que ces sérums contiendraient des anticorps reconnaissant le Ro/SS-A 52 kDa natif.

Beaucoup de voies futures s'ouvrent à l'investigation dans ce domaine. Dans le but de nous assurer que les ribonucléoprotéines Ro/SS-A isolées sont réellement représentatives de celles qui sont retrouvées *in vivo*, nous nous proposons de définir précisément leur intégrité immunologique et biochimique. Nous nous assurerons d'abord que les particules purifiées contiennent tous les épitopes reconnus par les anticorps anti-Ro/SS-A qui immunoprécipitent les ribonucléoprotéines des extraits cellulaires bruts. Ceci sera réalisé en utilisant les particules purifiées en tant qu'inhibiteurs compétitifs d'immunoprécipitation d'extraits cellulaires HeLa bruts avec des sérums et des anticorps anti-Ro/SS-A réellement

monospécifiques (intégrité immunologique). Nous pourrions également définir la spécificité des anticorps reconnaissant les particules Ro/SS-A en utilisant des fractions protéiques purifiées comme inhibiteurs compétitifs. L'intégrité biochimique des ribonucléoprotéines Ro/SS-A sera évaluée par des analyses d'immunodéplétion d'extraits cellulaires HeLa bruts avec des anticorps monospécifiques anti-Ro/SS-A 60 et 52 kDa pour déterminer quels sont les ARN et les protéines coprécipités. Ces particules structurellement et antigéniquement intactes pourront être utilisées pour des études d'interaction ARN/protéines et de fonction cellulaire puisque l'intégrité des ribonucléoprotéines Ro/SS-A pourrait être nécessaire à un fonctionnement adéquat.

5. CONCLUSION

La purification et la caractérisation des ribonucléoprotéines Ro/SS-A intactes de cellules nucléées et anucléées suggère que les polypeptides Ro/SS-A 60 kDa et La/SS-B sont des constituents stables de toutes les populations de particules Ro/SS-A alors que le polypeptide Ro/SS-A 52/54 kDa serait, au mieux, un constituant mineur de celles-ci. Il semble plutôt que cette protéine existerait majoritairement ou complètement hors du complexe ribonucléoprotéique, soit seule ou associée à la protéine Ro/SS-A 60 kDa. Le poids moléculaire déduit pour les particules démontre leur intégrité et suggère une hétérogénéité au niveau de la composition protéique. L'hypothèse que la particule native stimulerait directement la production d'autoanticorps par le système immunitaire suggère l'importance de s'intéresser à la caractérisation de ribonucléoprotéines Ro/SS-A natives afin de les utiliser pour des études d'interactions entre les composantes ribonucléoprotéiques et de fonction cellulaire.

6. REMERCIEMENTS

Je désire exprimer ma profonde reconnaissance envers mes co-directeurs, soit le Dr Gilles Boire qui m'a très habilement guidée durant mon travail de recherche et le Dr Eveline de Médicis pour son excellent jugement durant la rédaction de mon mémoire.

Je remercie aussi le Dr Gilles Dupuis pour ses conseils de grande valeur durant l'élaboration de ce document.

Je remercie chaleureusement le directeur du service de Rhumatologie, le Dr Henri-André Ménard qui m'a accueillie dans son équipe.

Je veux souligner particulièrement la contribution majeure de ma co-équipière de travail, Maryse Gendron, durant la réalisation de ce projet de recherche.

Des remerciements additionnels vont à Ginette Girard ainsi qu'aux secrétaires Alice Chapdelaine et Marthe Filion pour leur précieuse aide technique lors de la mise en page de ce mémoire.

Et je garderai un excellent souvenir de tous les autres membres du département qui m'ont soutenue moralement tout au long de ma maîtrise.

7. RÉFÉRENCES

ALARCON-SEGOVIA, D., RUIZ-ARGUELLES, A. et FISHBEIN, E.
(1978) Antibody to nRNP penetrates live human
mononuclear cells through Fc receptors.
Nature 271: 67-69.

ALSPAUGH, M.A. et TAN E.M. (1975) Antibodies to cellular
antigens in Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest.
55: 1067-1073.

ALSPAUGH, M.A., TALAL, N. et TAN, E.M. (1976)
Differentiation and characterization of autoantibodies
and their antigens in Sjögren's syndrome. Arthritis
Rheum. 19: 216-222.

ALSPAUGH, M. et MADDISON, P. (1979) Resolution of the iden-
tity of certain antigen-antibody systems in systemic
lupus erythematosus: an interlaboratory collaboration.
Arthritis Rheum. 22: 796-798.

BACH, J.F. et LESAVRE, P. Immunologie. Flammarion Médecine Sciences, France (1982) p. 14-16, 124, 135 et 142.

BACHMANN, M., MAYET, W.J., SCHRODER, H.-C. et PFEIFER, K. (1986) Association of La and Ro antigens with intracellular structures in Hep-2 carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7770-7774.

BACHMANN, M., MAYET, W.J., SCHRODER, H.-C., PFEIFER, K., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K.-H. et MULLER, W.E.G. (1987) Identification of the Ro and La antigens in the endoribonuclease VII-ribonucleoprotein complex. Biochem. J. 243: 189-194.

BACHMANN, M., PFEIFER, K., SCHRODER, H.-C. et MULLER, W.E.G. (1989a) The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells. Mol. Cell. Biochem. 85: 103-114.

BACHMANN, M., FALKE, D., SCHRODER, H.-C. et MULLER, W.E.G. (1989b) Intracellular distribution of the La antigen in CV-1 cells after Herpes Simplex virus type 1 infection compared with the localization of U small nuclear ribonucleoprotein particles. *J. Gen. Virol.* **70**: 881-891.

BACHMANN, M., FALKE, D. et MULLER, W.E.G. (1990a) Is La protein involved in autoimmunization and inflammatory events during disease? Characterization of La protein as an unwinding enzyme. *Mol. Biol. Rep.* **14**: 49-50.

BACHMANN, M., PFEIFER, K., SCHRODER, H.-C. et MULLER, W.E.G. (1990b) Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependant ATPase/dATPase with melting properties. *Cell* **60**: 85-93.

BARLOW, D.J., EDWARDS, M.S. et THORNTON, J.M. (1986) Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* **322**: 747-748.

BEN-CHETRIT, E., CHAN, E.K.L., SULLIVAN, K.F. et TAN, E.M.
(1988) A 52 Kd protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. J. Exp. Med. 167: 1560-1571.

BEN-CHETRIT, E., GANBY, B.J., SULLIVAN, K.F. et TAN, E.M.
(1989) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60 Kd component of the human SS-A Ro ribonucleoprotein autoantigen. J. Clin. Invest. 83: 1284-1292.

BERG, J.M. (1990) Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. J. Biol. Chem. 265: 6513-6516.

BINI, P., CHU, J.-L., OKOLO, C. et ELKON, K. (1990) Analysis of autoantibodies to recombinant La (SS-B) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome. J. Clin. Invest. 85: 325-333.

BOIRE, G. et CRAFT, J. (1989) Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. J. Clin. Invest. 84: 001-010.

BOIRE, G. et CRAFT, J. (1990) Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J. Clin. Invest.* **85**: 1182-1190.

BOIRE, G., LOPEZ-LONGO, F.-J., LAPOINTE, S. et MENARD, H.-A. (1991) Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60-Kd Ro/SS-A protein. *Arthritis Rheum.* **34**: 722-730.

BURNET, F.M. (1957) A modification of Jerne's theory of antibodies production using the concept of clonal selection. *Aust. J. Sci.* **20**: 67.

BUYON, J.P., SLADE, S.G., CHAN, E.K.L., TAN, E.M. et WINCHESTER, R. (1990) Effective separation of the 52 kDa SSA/Ro polypeptide from the 48 kDa SSB/La polypeptide by altering conditions of polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods* **129**: 207-210.

CELANDER, D.W. et CECH, T.R. (1991) Visualizing the higher order folding of a catalytic RNA molecule. *Science* 251: 401-407.

CHAMBERS, J.C. et KEENE, J.D. (1985) Isolation and analysis of cDNA clones expressing human lupus La antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2115-2119.

CHAMBERS, J.C., KENAN, D., MARTIN, B.J. et KEENE, J.D. (1988) Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J. Biol. Chem.* 263: 18043-18051.

CHAN, E.K.L., SULLIVAN, K.F. et TAN, E.M. (1989) Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA binding. *Nucleic Acids Res.* 17: 2233-2244.

CHAN, E.K.L., HAMEL, J.C., PEEBLES, C.L., BUYON, J.P. et TAN, E.M. (1990) Molecular characterization and cloning of the 52 kDa SS-A/Ro protein. *Mol. Biol. Rep.* 14: 53.

CHAN, E.K.L., HAMEL, H.C., BUYON, J.P. et TAN, E.M. (1991)
Molecular definition and sequence motifs of the 52-Kd
component of human SS-A/Ro autoantigen. J. Clin.
Invest. 87: 68-76.

CLARK, G., REICHLIN, M. et TOMASI, T.B. Jr (1969)
Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reac-
tive with sera from patients with
systemic lupus erythematosus. J. Immunol. 102: 117-122.

CRAFT, J., MIMORI, T., OLSEN, J.L. et HARDIN, J.A. (1988)
The U2 small nuclear ribonucleoprotein particle as an
autoantigen: analysis with sera from patients with
overlap syndromes J. Clin. Invest. 81: 1716-1724.

CUNNINGHAM, B.C. (1991) Dimerization of human growth hormone
by zinc. Science 253: 545-548.

DEUTSCHER, S.L., HARLEY, J.B. et KEENE, J.D. (1988)
Molecular analysis of the 60 kDa human Ro ribonucleo-
protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9479-9483.

DZIARSKI, R. (1988) Autoimmunity: polyclonal activation or antigen induction. *Immunol. Today* 9: 340-342.

ELENITSAS, R., BAIR, L.W. Jr, MEDSGER, TA et DENG, J.S. (1986) Discordance of SSA/Ro and SSB/La cellular antigens in synchronized cells. *J. Invest. Dermatol.* 87: 504-509.

ELKON, K.B. et CULHANE, L. (1984) Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J. Immunol.* 132: 2350-2356.

ELKON, K.B. et JANKOWSKI, P.W. (1985) Fine specificities of autoantibodies directed against the Ro, La, Sm, RNP and Jo-1 proteins defined by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *J. Immunol.* 134: 3819-3824.

FORMAN, M.S., NAKAMURA, M., MIMORI, T., GELPI, C. et HARDIN J.A. (1985) Detection of antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and small cytoplasmic ribonucleoproteins using unlabeled cell extracts. *Arthritis Rheum.* **28**: 1356-1361.

FRANCOEUR, A.M. et MATHEWS, M.B. (1982) Interaction between VA RNA and the lupus antigen La: formation of a ribonucleoprotein particle *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6772-6776.

FURUKAWA, F. (1990) Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J. Invest. Dermatol.* **94**: 77-85.

GODING, J.W. (1976) Conjugation of antibodies with fluorochromes: Modifications to the standard methods. *J. Immunol. Methods* **13**: 215-226.

GOTTLIEB, E. et STEITZ, J.A. (1989a) The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription *in vitro*. EMBO J. 8: 841-850.

GOTTLIEB, E. et STEITZ, J.A. (1989b) Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. EMBO J. 8: 851-861.

HARDIN, J.A. et MIMORI, T. (1985) Autoantibodies to ribonucleoproteins. Clin. Rheum. Dis. 11: 485-501.

HARDIN, J.A. (1986) The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 29: 457-460.

HARMON, C.E., DENG, J.S., PEEBLES, C.L. et TAN, E.M. (1984) The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen/antibody system. Arthritis Rheum. 27: 166-173.

HENDRICK, J.P., WOLIN, S.L., RINKE, J., LERNER, M.R. et STEITZ, J.A. (1981) Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 1138-1149.

HOCH, S.O. et BILLINGS, P.B. (1984) Characterization of the La (SS-B) antigen from several mammalian sources. *J. Immunol.* **133**: 1397-1403.

HOET, R.M. et VAN VENROOIJ, W.J. (1992) B-cell epitopes of RNA autoantigens. *Mol. Biol. Rep.* **16**: 199-205.

ITOH, Y. et al. (1990) Heterogeneity of the Ro/SS-A antigen and autoanti-Ro/SS-A response: evidence of four antigenically distinct forms. *Clin. Exp. Immunol.* **81**: 45-51.

ITOH, K. et al. (1991) Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-Kd Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. *J. Clin. Invest.* **87**: 177-186.

KATO, N. et al. (1982) Nucleotide sequence of 4.5S RNA (C8 or hY5) from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**: 363-370.

KOFFLER, D. (1974) Polynucleotide immune complexes in serum and glomeruli of patients with systemic lupus erythematosus. *Am. J. Pathol.* **74**: 109-124.

KOHSAKA, H. et al. (1990) Fine epitope mapping of the human SS-B/La protein. Identification of a distinct autoepitope homologous to a viral gag polyprotein. *J. Clin. Invest.* **85**: 1566-1574.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* **227**: 680-685.

LANDSCHULZ, W.H. et al. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.

LEFEBER, W.P. et al. (1984) Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* **74**: 1545-1551.

LERNER, M.R. et al. (1981a) Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with proteins are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 805-809.

LERNER, M.R. et al. (1981b) Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* **211**: 400-402.

LERNER, M.R. et STEITZ, J.A. (1981) Snurps and Scurps. *Cell* **25**: 298-300.

LIEU, T-S. et al. (1988) Molecular characterization of human Ro/SS-A antigen. Amino terminal sequence of the protein moiety of human Ro/SS-A antigen and immunological activity of a corresponding synthetic peptide. *J. Clin. Invest.* **82**: 96-101.

LORENZ, R.G. et ALLEN, P.M. (1988) Processing and presentation of self proteins. *Immunol. Rev.* **106**: 115-127.

MAMULA, M.J. et al. (1989a) Human monoclonal anti-La antibodies. The La protein resides on a subset of Ro particles. *J. Immunol.* **143**: 2923-2928.

MAMULA, M.J. et al. (1989b) The Ro RNP particle: induction of autoantibodies and the detection of Ro RNAs among species. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **52**: 435-446.

MATHEWS, M.B. et FRANCOEUR, A.M. (1984) La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylate tail of a small RNA. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1134-1140.

MATTIOLI, M. et REICHLIN, M. (1974) Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* **17**: 421-429.

MCCAULIFFE, D.P. et al. (1990a) Molecular cloning, expression and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. *J. Clin. Invest.* **85**: 1379-1391.

MCCAULIFFE, D.P. et al. (1990b) A human Ro/SS-A autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with onchocercal RAL-1 antigen and an *Aplysia* «memory molecule». *J. Clin. Invest.* **86**: 332-335.

MCNEILAGE, L.J. et al. (1990) Mapping of epitopes on the La (SS-B) autoantigen of primary Sjogren's syndrome. Identification of a cross-reactive epitope. *J. Immunol.* **145**: 3829-3835.

MCNEILAGE, L.J. et al. (1992) Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH₂ terminus of the La/SS-B Ribonucleoprotein autoantigen. *J. Clin. Invest.* **89**: 1652-1656.

O'BRIEN, C.A. et HARLEY, J.B. (1990) A subset of hy RNAs is associated with erythrocyte Ro RNPs. *EMBO J.* **9**: 3683-3689.

PAUL, W.E. Fundamental Immunology. Raven Press, New York (1984), p. 3-22.

PIZER, L.I. et al. (1983) Characterization of a phosphoprotein associated with the SS-B/La nuclear antigen in adenovirus-infected and -uninfected KB cells. Mol. Cell. Biol. 3 : 1235-1245.

Primer on the Rheumatic Diseases, 9ième édition, Editeurs: Schumacher, H.R. Jr, Klippel, J.H. et Robinson, D.R. Publié par la Fondation d'Arthrite, Atlanta, Georgie. (1988) p.32-33, 43, 48, 83-92, 96-105 et 136-138.

PRUIJN, G.J.M. et al. (1990) Structure and function of La and Ro RNPs. Mol. Biol. Rep. 14: 43-48.

PRUIJN, G.J.M. et al. (1991) Analysis of protein-RNA interaction within Ro ribonucleoprotein complexes. Nucleic Acids Res. 19: 5173-5180.

RADER, M.D. et al. (1989) Heterogeneity of the Ro/SSA antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J. Clin. Invest* 83: 1293-1298.

RAUH, A.J.G. et al. (1988) At least three distinct B cell epitopes reside in the C-terminal half of La protein, as determined by a recombinant DNA approach. *Eur. J. Immunol.* 18: 2049-2057.

REICHLIN, M. (1986) Significance of the Ro antigen system. *J. Clin. Immunol.* 6: 339-348.

RINKE, J. et STEITZ, J.A. (1982) Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies *Cell* 29: 149-159.

RINKE, J. et STEITZ, J.A. (1985) Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. *Nucleic Acids Res.* 13: 2617-2629.

ROGERS, S. et al. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364-368.

ROITT, I.M., BROSTOFF, J. et MALE, D.K. Immunologie fondamentale et appliquée. Médecine et Sciences Internationales, Paris (1985) p.1.1, 1.6, 8.6, 21.1 et 21.2.

SLOBBE, R.L. et al. (1991a) Ro (SS-A) and La (SS-B) ribonucleoprotein complexes: structure, function and antigenicity. *Ann. Med. Interne (Paris)* **142**: 592-600.

SLOBBE, R.L. et al. (1991b) Detection and occurrence of the 60- and 52-Kd Ro (SS-A) antigens and of autoantibodies against these proteins. *Clin. Exp. Immunol.* **86**: 99-105.

ST-CLAIR, E.W. et al. (1988) Analysis of autoantibody binding to different regions of the human La antigen expressed in recombinant fusion proteins. *J. Immunol.* **141**: 4173-4180.

ST-CLAIR, E.W. et al. (1990) Temporal correlation of antibody responses to different epitopes of the human La autoantigen. *J. Clin. Invest.* **85**: 515-521.

STEITZ, J.A. et al. (1982) Small ribonucleoproteins from eukaryotes: structures and roles in RNA biogenesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2**: 893-900.

STURGESS, A.D. et al. (1988) Characteristics and epitope mapping of a cloned human autoantigen La. *J. Immunol.* **140**: 3212-3218.

TAN, E.M. et al. (1988) Antinuclear antibodies: diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **47**: 121-141.

TAN, E.M. (1989) Do autoantibodies inhibit function of their cognate antigens in vivo? *Arthritis Rheum.* **32**: 924-925.

THEOFILOPOULOS, A.N. Autoimmunity. Basic and Clinical Immunology. Stites, Stobo and Wells, Appleton and Lange éd. (1987) p. 128-158.

TONEGAWA, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. Nature 302: 575-582.

TOWBIN, H. et al. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.

WELCH, M.J. (1983) Increased frequency of rheumatoid factor precursor B lymphocytes after immunization of normal adults with tetanus toxoid. Clin. Exp. Immunol. 51:299-304.

WERMUTH, D.J. et al. (1985) Anti-Ro/SSA antibodies. Association with a particulate (large speckledlike thread) immunofluorescence nuclear staining pattern. Arch. Dermatol. 121: 335-338.

WOLIN, S.L. et STEITZ, J.A. (1983) Genes for two small cytoplasmic Ro RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell* 32: 735-744.

WOLIN, S.L. et STEITZ, J.A. (1984) The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1996-2000.

XIA, P. et al. (1987) The particulate (speckled-like thread) nuclear staining pattern: species and cellular distribution of Ro/SSa antigen. *J. Clin. Lab. Immunol.* 22: 101-105.

8. ANNEXE

LISTE DU MATERIEL

- Acétate de sodium: J.T. Baker Chemical Co, Phillipsburg
New Jersey
- Acétone: Anachemia, Montréal
- Acide acétique: BDH Chemicals Limited, Toronto
- Acide borique: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey
- Acide citrique (anhydre): Fisher Scientific Company, Fair
Lawn, New Jersey
- Acide nitrique: Fisher Scientific Company, Fair Lawn,
New Jersey
- Acide phosphorique concentré: Fisher Scientific Company,
Fair Lawn, New Jersey
- Acide sulfurique: Fisher Scientific Company, Fair Lawn,
New Jersey
- Acide trichloroacétique: Fisher Scientific Company, Fair
Lawn, New Jersey
- Acrylamide: Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie
- Alcool isoamylique: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey
- Anti-IgG humains couplés à la peroxydase ou à la phosphatase
alcaline: Jackson Immuno Research Laboratories, Toronto
- Azote de sodium: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey
- BCIP: Promega, Madison, Wisconsin
- Bicarbonate de sodium: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey
- Bisacrylamide: Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie
- Bleu de bromophénol: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

Bleu de Coomassie R-250: Sigma Chemical Company, St-Louis
Missouri

BSA: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Carbonate de sodium: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

Carboxyméthyl-cellulose: Whatman Bio Systems Limited,
Angleterre

Chloroforme: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

4-chloro 1-naphtol: Sigma Chemical Company, St-Louis
Missouri

Chlorure de magnésium: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

Chlorure de sodium: BDH Chemicals Limited, Toronto

Chlorure de zinc: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

CLAP: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Dextran: Pharmacia, Uppsala, Sweden

Dichromate de potassium: Aldrich Chemical Company, Milwaukee
Wisconsin

Dithiothréitol: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

EDTA (sel sodique): Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

Ethanol: Les alcools de commerce Inc. Brampton, Ontario

Formaline (formaldéhyde) 37%: Fisher Scientific Company,
Fair Lawn, New Jersey

Gélatine de poisson: Norland Products Inc., New Brunswick
New Jersey

Glycérol: Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey

Glycine: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Glycogène: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Hydroxyapatite: Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie

Hydroxyde de sodium: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

8-hydroxyquinoline: Aldrich Chemical Company, Milwaukee
Wisconsin

β -Mercaptoéthanol: Calbiochem, San Diego, Californie

Merthiolate: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Méthanol: Anachemia, Montréal

NBT: Promega, Madison, Wisconsin

Nitrate d'argent: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

Nitrocellulose: Amersham Canada Limited, Oakville, Ontario

Nonidet P-40: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

OPD: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

[³²P]-orthophosphate: Amersham Canada Limited, Oakville
Ontario

Pénicilline: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Peroxyde d'hydrogène 30%: Mallinckrodt Canada Inc., Pointe-
Claire, Québec

Persulfate d'ammonium: Bio-Rad Laboratories, Richmond
Californie

Phénol: Gibco BRL, Burlington, Ontario

Phosphate de potassium: Fisher Scientific Company, Fair
Lawn, New Jersey

Phosphate de sodium: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

PMSF: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Polyéthylène glycol: Fisher Scientific Company, Fair Lawn
New Jersey

[¹²⁵I]-Protéine A: Amersham Canada Limited, Oakville
Ontario

Protéine A Sépharose CL-4B: Pharmacia, Uppsala, Sweden

Pyronine: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Résine DEAE: Whatman Bio Systems Limited, Angleterre

Résine QMA: Waters Chromatography Division, Milford
Massachusetts

RNasin: Promega, USA

RPMI 16RNasin: Promega, Madison, Wisconsin

SDS: Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey

Sep-Pak Silica, QMA, CN et C18: Waters Chromatography
Division, Milford, Mas-
sachusetts

Sérum de veau foetal: Flow Laboratories, Mississauga
Ontario

SP Séphadex C-50: Pharmacia, Uppsala, Sweden

Standards de poids moléculaire pour la filtration
sur gel: Pharmacia, Uppsala, Sweden

Streptomycine: Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Sucrose: Canadian Scientific Products Limited, Hyde Park
Ontario

TEMED: Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie

Tris-base: Boehringer Mannheim Biochemicals, Dorval, Québec

Tween-20: Sigma Chemicals Company, St-Louis, Missouri

Urée: Sigma Chemicals Company, St-Louis, Missouri

Xylène cyanol: International Biotechnologies Inc, New Haven
Connecticut