

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CARACTÉRISATION DE RoBP1 ET ÉTUDE FONCTIONNELLE DES
RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro CONTENANT L'ARN hY5**

Par

François Bolduc

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en biochimie

Septembre 2001

Table des matières

<i>Table des matières</i>	<i>i</i>
<i>Liste des tableaux et figures</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>v</i>
1. Introduction	1
1.1 <i>Tolérance et auto-immunité</i>	<i>1</i>
1.1.1 Tolérance des lymphocytes B	2
1.1.2 Tolérance centrale des lymphocytes T	3
1.1.3 Tolérance périphérique des lymphocytes T	4
1.1.4 Défaut au niveau de la tolérance	5
1.2 <i>Lupus érythémateux disséminé et syndrome de Sjögren</i>	<i>7</i>
1.3 <i>Les ribonucléoprotéines Ro</i>	<i>10</i>
1.3.1 Les ARN Y	11
1.3.2 La protéine Ro60	11
1.3.3 La protéine La	14
1.3.4 Autres partenaires potentiels des RNP Ro	15
1.4 <i>La protéine RoBP1</i>	<i>17</i>
1.4.1 RoBP1/ PUF60/ FIR	18
1.4.2 RoBP1/PUF60 et épissage	22
1.4.3 RoBP1/FIR et régulation transcriptionnelle du gène c-myc	29
1.5 <i>Objectifs de recherche</i>	<i>33</i>
2. Matériels et méthodes	35
2.1 <i>Constructions des vecteurs</i>	<i>35</i>
2.1.1 Culture bactérienne et préparation de l'ADN	35
2.1.2 Visualisation sur gel d'agarose et ligation plasmide/insert	35
2.1.3 Vecteurs utilisés pour la localisation cellulaire	36
2.1.3.1 Construction des mutants de délétion	36
2.1.4 Vecteurs utilisés pour la traduction <i>in vitro</i>	41
2.1.5 Vecteurs utilisés pour le système d'expression inductible à l'hormone d'insecte ecdysone chez des cellules de mammifères	41
2.2 <i>Culture cellulaire et transfection</i>	<i>42</i>
2.3 <i>Traduction in vitro</i>	<i>44</i>
2.4 <i>Microscopie confocale</i>	<i>44</i>
2.5 <i>Production d'anticorps anti-RoBP1 chez le lapin</i>	<i>45</i>
2.5.1 Préparation de vaccin à ADN	45
2.5.2 Immunisation des lapins	46
2.6 <i>Analyse des protéines</i>	<i>46</i>
2.6.1 Préparation d'extraits cellulaires	46

2.6.2	Migration en gel SDS-PAGE	47
2.6.3	Détection par anticorps d'antigènes séparés par SDS-PAGE	47
2.6.4	Immuno-précipitation	48
2.6.4.1	Couplage d'anticorps à des billes de protéine A-sépharose	48
2.6.4.2	Incubation des billes avec l'extrait protéique	49
2.7	<i>L'essai RITA</i>	50
2.7.1	Construction des vecteurs	50
2.7.2	Interaction des isoformes de RoBP1 en RITA	50
2.7.3	Culture des levures	51
2.7.4	Transformation des levures	52
2.7.5	Essai X-gal sur filtre	53
2.8	<i>Épissage in vitro</i>	54
2.8.1	Préparation de l'ADN à transcrire	54
2.8.2	Transcription <i>in vitro</i> et préparation du pré-ARNm	55
2.8.3	Essai d'épissage <i>in vitro</i>	56
2.8.4	Immunodéplétion	58
3.	Résultats	59
3.1	<i>Études de localisation de RoBP1 et des mutants de délétion</i>	59
3.1.1	Microscopie confocale	59
3.1.2	Traduction <i>in vitro</i> de RoBP1 et des mutants de délétion	69
3.1.3	Analyse Western	71
3.2	<i>Production d'un anticorps anti-RoBP1</i>	75
3.3	<i>Interaction de RoBP1, FIR et PUF60 avec les RNP Ro^{hys}</i>	79
3.4	<i>Essais d'épissage in vitro</i>	81
3.4.1	Étude de co-immunoprécipitation du pré-ARNm	81
3.4.2	Epissage avec des extraits nucléaires déplétés en Ro60	87
3.5	<i>Immunoprécipitation de RoBP1 et système d'expression à l'ecdysone chez des cellules de mammifères</i>	90
4.	Discussion	95
	Remerciements	101
	Références	102

Liste des tableaux et figures

Figures

Figure 1 :	Représentation schématique des quatre ARN hY selon Zucker	12
Figure 2 :	Séquence nucléotidique et peptidique de RoBP1	20
Figure 3 :	Représentation schématique de RoBP1, PUF60 et FIR	21
Figure 4 :	La voie d'assemblage du spliceosome sur le pré-ARNm	27
Figure 5 :	Interactions entre l'ARN U2 et le point de branchement	28
Figure 6 :	Modèle proposé pour la modulation du gène c-myc via FIR	32
Figure 7 :	Stratégie utilisée pour la construction des mutants de délétion de RoBP1	38
Figure 8 :	Principaux vecteurs	40
Figure 9 :	Principales étapes permettant d'obtenir des cellules NIH 3T3 qui expriment les différentes protéines fusionnées à la GFP	63
Figure 10 :	Imagerie confocale de RoBP1 et des mutants de délétion fusionnés à la GFP	64
Figure 11 :	Représentation schématique des mutants de délétion et traduction <i>in vitro</i>	70
Figure 12 :	Analyses Western à partir d'extraits de cellules qui expriment les protéines de fusion	73

Figure 13 :	Capacité des sérums de lapins à reconnaître RoBP1 par immunobuvardage	78
Figure 14 :	Interaction entre RoBP1, FIR et PUF60 avec les RNP Ro^{hY5} en essai d'interaction dans la levure (RITA)	80
Figure 15 :	Pré-ARNm de hnRNP A1 et les différents produits générés lors de son épissage par un extrait nucléaire	84
Figure 16 :	Essai d'épissage <i>in vitro</i> suivi d'une immunoprécipitation avec un sérum anti-Ro60	85
Figure 17 :	Essai d'épissage <i>in vitro</i> en utilisant un extrait nucléaire déplété en Ro60	88
Figure 18 :	Immunoprécipitation de RoBP1 à partir d'extraits de cellules EcR-293 induits à la ponastérone A	94

Tableaux

Tableau 1 :	Anticorps antinucléaires retrouvés dans le sérum de patients atteints de LED et du syndrome de Sjögren	9
Tableau 2 :	Description des amorces utilisées pour la construction des mutants de délétion	39

Liste des abréviations

'	Minute
"	Seconde
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ANA	Anticorps antinucléaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
CLAP	Inhibiteur de protéases : C : chymostatin, L : leupeptine, A : antipaïne, P : pepstatine
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
cpm	coups par minute
CTD	«Connective tissue diseases»
DiD (ou D-307)	«1,1'-dioctadecyl-3,3',3'- tetramethylindodicarbocyanine perchlorate»
Δ	Delta, délétion
DMEM	Milieu de culture DMEM («Dulbecco's Modified Eagle Medium»)
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
D.O.	Densité optique
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EtBr	Bromure d'éthidium
FBP	«FUSE-Binding Protein»
FBS	Sérum foetal bovin («Foetal bovine serum»)
FIR	«FBP interacting factor»
FUSE	«Far upstream element»
G418	Généticine
GFP	«Green Fluorescent Protein»
h	Heure

Ig	Immunoglobuline
IPP	Immunoprécipitation
IRES	«Internal ribosome entry sequence»
kDa	KiloDalton
LB	Milieu de culture Luria-Bertani
LiAc	Acétate de lithium
LED	Lupus Érythémateux Disséminé
MCS	Site de clonage multiple («Multiple Cloning Site»)
ME	β-mercaptoéthanol
NE	Extrait nucléaire
NRS	Sérum normal de lapin («Normal rabbit serum»)
pb	Paire de bases
PCR	«Polymerase Chain Reaction»
PEG	Polyéthylène glycol
PMSF	Fluorure de méthanesulfonyle
PUF60	«Polyuridilate Factor 60»
RITA	«RNP Interaction Trap Assay»
Rnase	Ribonucléase
RNP	Ribonucleoprotéine
RoBP1	«Ro Binding Protein I»
RPM	Révolutions par minute
RRM	Motif de liaison à l'ARN («RNA Recognition Motif»)
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-Page	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS («SDS polyacrylamide gel electrophoresis»)
SLE	«Systemic Lupus Erythematosus»
5'-UTR	Région 5' non-traduit («5' untranslated region»)
μF	MicroFarad
g	Force centrifuge
X-gal	5-bromo-4-chloro-3indolyl-b-β-galactoside
YNB	Milieu «Yeast Nitrogen Base»
YPD	Milieu «Yeast peptone dextrose»

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CARACTÉRISATION DE RoBP1 ET ÉTUDE FONCTIONNELLE DES
RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro CONTENANT L'ARN hY5**

Par

François Bolduc

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en biochimie

RÉSUMÉ

Les Ribonucléoprotéines Ro (RNP Ro) sont la cible d'autoanticorps présents dans le sérum de patients atteints de maladies du tissu conjonctif comme le syndrome de Sjögren et le lupus érythémateux disséminé. Cependant, la fonction des RNP Ro demeure encore obscure. Deux protéines lient les ARN hY (hY1, 3, 4 et 5), soit la protéine Ro60 (60 kDa) et la protéine La de 48 kDa. En utilisant une modification du système triple hybride (RITA) en levure où une recombinante de la protéine Ro60 liée à l'ARN hY5 sert d'appât, une nouvelle protéine se liant au complexe a été identifiée (Bouffard et al., 2000). Elle fut nommée Ro RNP binding protein 1 (RoBP1).

Dans le but de caractériser ce nouveau partenaire, des études de localisation en cellules eucaryotes ont été réalisées. L'ADNc de RoBP1 a été

cloné à l'extrémité carboxy terminale de la GFP. Le plasmide pEGFP/RoBP1 a été par la suite transfecté dans des cellules de souris NIH 3T3. La microscopie confocale montre une distribution nucléaire de RoBP1. Une étude similaire a été faite avec des mutants de délétion. Tout comme RoBP1, les mutants de délétion Δ RRM2 et Δ RRM3 se localisent préférentiellement dans le noyau de ces mêmes cellules alors que le mutant Δ RRM1 est retrouvé autant dans le cytoplasme que dans le noyau.

Des études d'épissage *in vitro* ont été réalisées dans le but de vérifier un rôle possible des RNP Ro au niveau de cette fonction cellulaire. Les résultats démontrent que l'efficacité d'épissage d'un extrait nucléaire déplié en protéine Ro60 se compare à celle d'un extrait nucléaire complet. Également il ne semble pas y avoir d'interaction stable entre Ro60 et le pré-ARNm ou ses intermédiaires d'épissage lors du processus d'épissage. Des études de co-immunoprécipitation n'ont pas permis de révéler la présence d'ARN co-immunoprécipité avec la protéine Ro60.

Finalement, les études de localisation ont démontré qu'une surexpression de RoBP1 ralentit la croissance cellulaire. Le système d'expression eucaryote inductible à l'ecdysone a alors été utilisé dans le but de réguler l'expression de RoBP1. Nous avons mis sur pied ce système et obtenu un clone chez qui l'expression de la protéine RoBP1, auquel nous lui avons fusionné une séquence HA, est observée en présence d'inducteur. En présence de 5 mM de ponastérone A, un analogue de l'ecdysone, la protéine Ha-RoBP1 est synthétisée. Ainsi, il sera possible d'entreprendre des études visant l'identification de partenaires protéiques et nucléiques de RoBP1.

1. Introduction

1.1 Tolérance et auto-immunité

Dans les années 60, on croyait que tous les lymphocytes auto-réactifs étaient éliminés au cours de leur développement et qu'un défaut au niveau de leur élimination menait inévitablement à des conséquences auto-immunes. Cependant, depuis la fin des années 70, plusieurs études ont réfuté cette hypothèse, démontrant que les lymphocytes auto-réactifs n'étaient pas tous éliminés lors de la maturation des cellules B et des cellules T. En effet, il a été démontré que des individus sains possèdent des lymphocytes auto-réactifs en circulation (Hooper et al., 1972 ; Mackay, 1983). La spécificité immunologique des récepteurs d'antigènes des cellules B et des cellules T est le résultat d'un réarrangement aléatoire des gènes qui codent pour le site de liaison de ces récepteurs (Tonegawa, 1983 ; Delves et Roitt, 2000). Théoriquement ce processus pourrait générer plus de 10^9 récepteurs de cellules T différents dont quelques-uns peuvent lier des auto-antigènes. La tolérance est le processus qui élimine ou neutralise ces cellules auto-réactives et un défaut dans la régulation de ce système peut mener à l'auto-immunité.

1.1.1 Tolérance des lymphocytes B

Les auto-anticorps sont caractéristiques de plusieurs maladies auto-immunes et peuvent être la cause directe des lésions dans quelques-unes de ces manifestations. Dans le cas de la maladie de Graves, les auto-anticorps vont lier directement le récepteur de la TSH ce qui a pour effet de stimuler la production d'hormones thyroïdiennes par la thyroïde. Par contre, dans certains cas, les auto-anticorps dirigés contre des antigènes intracellulaires ne sont pas nécessairement pathogéniques (Naparstek et Plotz, 1993) mais sont plutôt considérés comme étant des conséquences secondaires au processus auto-immun. Cette observation a été remise en question récemment : chez un modèle murin d'arthrite, le transfert d'igG d'un animal atteint peut induire l'arthrite chez un hôte sain (Korganow et al., 1999). Les auto-anticorps pathogéniques lient l'isomérase glucose-6-phosphate, un antigène intracellulaire et ubiquitaire (Matsumo et al., 1999).

Plusieurs mécanismes sont en place afin de filtrer les cellules B auto-réactives du répertoire des cellules B. La délétion clonale des cellules B immatures dans la moelle osseuse (Nemazee et Burki, 1989), la délétion des cellules B auto-réactives dans les zones des cellules T de la rate et des ganglions lymphatiques (Rathmell et al., 1996), l'inactivation fonctionnelle (anergie) (Goodnow et al., 1988) et l'édition du récepteur, un mécanisme qui change la spécificité du récepteur des cellules B lorsqu'un auto-antigène est rencontré (Nemazee, 2000). L'importance de ces mécanismes pour la prévention des maladies auto-immunes demeure obscure. Il y a évidence que la tolérance

des cellules B soit due à une insuffisance de l'aide des lymphocytes T. Des souris manipulées génétiquement afin d'exprimer un antigène étranger (lysozyme du blanc d'œuf) à la surface des cellules épithéliales de la glande thyroïde, produisent une quantité de cellules B avec des récepteurs pour le lysozyme du blanc d'œuf. Ces animaux ne montrent cependant aucun signe de thyroïdite, peut-être à cause de la tolérance des cellules T (Akkaraju et al., 1997). D'autres études tendent à démontrer que sous certaines circonstances, les cellules B peuvent surmonter la tolérance en absence d'aide venant des cellules T ; les conclusions demeurent cependant ambiguës (Kouskoff et al., 2000 ; Fagarasan et Honjo, 2000).

1.1.2 Tolérance centrale des lymphocytes T

Le principal mécanisme de la tolérance des cellules T est la délétion des lymphocytes autoréactifs dans le thymus. Les cellules T immatures migrent de la moelle osseuse vers le thymus, où ils rencontrent des peptides dérivés de protéines endogènes liés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Delves et Roitt, 2000). Les cellules T dont les récepteurs ont une faible affinité pour les complexes CMH-peptide ne reçoivent pas les signaux permettant de prévenir l'apoptose et ces cellules vont alors mourir dans le thymus. Les cellules T possédant un récepteur qui a une forte affinité pour ces complexes subissent l'apoptose et meurent selon un processus appelé sélection négative. Quant aux cellules T restantes, qui possèdent un récepteur ayant une affinité intermédiaire, elles mûrissent dans le thymus et migrent à la périphérie, un

processus appelé sélection positive. L'induction de la tolérance dite centrale requiert la présence d'auto-antigènes dans le thymus (Klein et al., 2000).

1.1.3 Tolérance périphérique des lymphocytes T

Plusieurs auto-antigènes exprimés dans les tissus périphériques n'ont jamais accès au thymus ; par conséquent, leurs lymphocytes T respectifs ne peuvent pas être éliminés (Stockinger, 1999). Cela implique qu'il y a des mécanismes en place qui permettent d'éviter l'activation de ces cellules auto-réactives. La plus simple des possibilités consiste à éviter le contact entre la cellule T et l'auto-antigène correspondant dans les tissus périphériques ; c'est ce qu'on appelle l'ignorance immunologique. Plusieurs mécanismes peuvent causer l'ignorance immunologique : le niveau d'antigène peut être sous le seuil nécessaire pour activer les cellules T (Akkaraju et al., 1997), l'antigène peut être physiologiquement isolé (p.e. : barrière hémato-encéphalique) (Barker et Billingham, 1977) ou encore l'antigène présenté par la molécule du CMH en absence de signaux de co-stimulation ne peut activer la réponse des cellules T (Janeway, 1992).

La présentation des antigènes en absence de co-stimulation ne fait pas qu'empêcher la prolifération des cellules T, mais peut également les éliminer. Ce mécanisme est appelé la délétion (Akkaraju et al., 1997 ; Critchfield et al., 1994). Les cellules meurent alors par apoptose.

L'anergie est un autre mécanisme qui permet la tolérance périphérique des cellules T. Certaines cellules T ne produisent pas d'interleukine-2 lorsqu'elles

rencontrent leur antigène (donc pas d'activation complète). Ces cellules sont dites anergiques (Falb et al., 1996).

Finalement il existe un dernier mécanisme qui est encore mal compris, il s'agit de la suppression. En fait la suppression des cellules T auto-réactives est possible par l'intermédiaire de cellules T régulatrices CD4+ (Olivares-Villagomez et al., 1998 ; Van de Keere et Tonegawa, 1998). Il y aurait plus d'un type cellulaire impliqué ainsi qu'une variété de molécules (Chen et al, 1994 ; Seddon et Mason, 1999) qui participent à cette régulation et qui modifient la susceptibilité aux maladies auto-immunes (Takahashi et al., 2000).

1.1.4 Défaut au niveau de la tolérance

Comment la tolérance des cellules T, induite dans le thymus et par la suite renforcée par de multiples mécanismes extra-thymiques, peut être surmontée et ainsi donner naissance à une maladie auto-immune ? Une première explication est l'activation de cellules T potentiellement autoréactives au niveau du répertoire « normal » par un agent infectieux.

De plus en plus de travaux impliquent l'infection comme étant une cause des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques et le diabète de type 1 (Kurzke, 1993). Les mécanismes qui pourraient mener d'une infection à une maladie auto-immune, incluent la relâche d'un auto-antigène séquestré provenant d'un tissu endommagé (Miller et al., 1997), l'activation d'une large fraction d'une population de cellules T par un superantigène (Perron et al., 1997) et l'induction de cytokines inflammatoires et de molécules de co-stimulation par

des produits microbiens (Tough et al., 1997; Infante-Duarte et al., 2000, Kamradt et al., 1991 ; Cella et al., 1999).

Alternativement, une similarité structurale entre un antigène microbien et un autoantigène peut jouer un rôle dans l'activation des cellules T auto-réactives. C'est ce qu'on appelle le mimétisme moléculaire (Albert et Inman, 1999). Il y a des cellules T qui peuvent reconnaître un peptide microbien et un autopeptide avec une séquence similaire d'acides aminés (Jahnke et al., 1985 ; Fujinami et Oldstone, 1985). Cependant, les évidences in vivo que le mimétisme moléculaire précipite les maladies auto-immunes manquent toujours. En fait, un seul récepteur de cellule T peut reconnaître plusieurs peptides sans qu'il n'y ait une forte homologie de séquence entre les peptides (Hemmer et al., 1998 ; Grogan et al., 1999). L'idée que la réactivité croisée (cross reactivity) entre un peptide microbien et un autopeptide puisse causer l'auto-immunité a été proposée (Oldstone, 1987).

Depuis quelques années, il a été montré qu'une dérégulation de l'apoptose est impliquée au niveau de plusieurs maladies, dont les maladies auto-immunes (Lorenz et al., 2000). Cette hypothèse pourrait peut-être expliquer la présence des anticorps nucléaires retrouvés chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique (SLE). Des expériences basées sur un modèle murin de SLE semblent indiquer qu'un défaut génétique pourrait être à l'origine des maladies du genre lupus. En effet, les souris MRL/lpr sont déficientes au niveau de l'expression d'une molécule membranaire Fas/Apo-1 (CD-95). La liaison de cette molécule induit l'apoptose chez plusieurs cellules. Une élimination insuffisante des lymphocytes a été observée chez les animaux déficients en

Fas/Apo-1, menant à l'hypothèse que des lymphocytes auto-réactifs pourraient survivre et ainsi engendrer l'auto-immunité (Watson et al., 1992). Cependant une étude subséquente a montré que chez des humains atteints de LED, la voie d'apoptose dépendante de Fas/Apo-1 était normale (Mysler et al., 1994).

D'autres études ont tenté de montrer le lien entre l'apoptose et l'auto-immunité. Par exemple, on retrouve beaucoup d'auto-antigènes à la surface des cellules apoptotiques (ce qu'on appelle les « blebs » apoptotiques). Alors une insuffisance au niveau de la clairance de ces « blebs » pourrait rendre accessible les auto-antigènes au répertoire de cellules immunitaires compétentes (Casciola-Rosen et al., 1994 ; Rosen et al., 1995). De plus, on observe une réponse immunitaire chez des souris normales exposées à des cellules apoptotiques (Mevorach et al., 1998).

1.2 Lupus érythémateux disséminé et syndrome de Sjögren

Ces deux pathologies ont la même caractéristique soit la production d'auto-anticorps dirigés contre la ribonucléoprotéine Ro, dont il sera question à la section 1.3. On les nomme maladies du tissu conjonctif ou « CTDs » (connective tissue diseases).

Le lupus érythémateux disséminé ou LED est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps, particulièrement des anticorps antinuléaires (ANAs). Les symptômes sont des éruptions cutanées notamment au niveau du visage, des dommages aux reins qui se traduisent par des glomérulonéphrites ainsi que des douleurs articulaires. C'est une maladie qui

affecte 1 femme sur 2000 mais qui dans certaines populations peut toucher 1 femme sur 250 (par exemple ; femmes noires en Californie). Comme pour presque toutes les maladies auto-immunes, ce sont plutôt les femmes qui en sont atteintes ; le ratio femme : homme est de 9 :1.

La cause du LED est toujours inconnue mais l'existence d'un nombre limité d'anticorps dirigés contre les constituants du soi laisse croire que les causes fondamentales du LED sont dues principalement à une défaillance des mécanismes de tolérance. Les anticorps identifiés sont très utiles pour le diagnostic mais sont aussi responsables de certains aspects de la pathologie puisque se sont les complexes immuns qui provoquent les glomérulonéphrites.

Les ANAs sont dirigés contre différents antigènes nucléaires regroupés en quatre catégories : (1) anticorps contre l'ADN, (2) anticorps contre les histones, (3) anticorps contre les protéines non-histones qui lient l'ARN et (4) anticorps contre les antigènes nucléolaires. La tableau 1 résume les ANAs qui sont associés au LED.

Malgré la présence de tous ces auto-anticorps, on en sait toujours très peu sur les mécanismes de leur émergence. Aujourd'hui, les trois principales lignes directrices en ce qui a trait à la recherche sur le LED concernent les prédispositions génétiques, les facteurs environnementaux et les défaillances du système immunitaire.

Tableau 1 : Anticorps antinucléaires retrouvés dans le sérum de patients atteints de LED et du syndrome de Sjögren.

<i>Maladie, pourcentage de positif</i>		
Nature de l'antigène	LED	Syndrome de Sjögren
Plusieurs antigènes nucléaires	>95	50-80
ADN natif	40-60	<5
Histones	50-70	<5
Protéines Sm	20-30	<5
RNP U1	30-40	<5
RNP (Ro60)	30-50	70-95
RNP (La)	10-15	60-90
Topoisomérase 1 (Scl-70)	<5	<5
Protéines centromériques	<5	<5
Synthétase de l'histidyl-tRNA (Jo-1)	<5	<5

Tiré de Tan et al., 1988 ; McCarty, 1986 ; Bernstein et Matthews, 1987

Quant au syndrome de Sjögren, il se caractérise par une sécheresse au niveau des yeux et de la bouche. Ces symptômes sont le résultat d'une destruction des glandes lacrymales et salivaires par le système immunitaire. Les lymphocytes B et T_{helper} infiltrent ces deux glandes ce qui provoque une fibrose des tissus. Il n'est pas encore clair si les dégâts sont causés par les cellules T cytotoxiques ou par les auto-anticorps qui sont également retrouvés dans le sérum et produits localement dans les glandes affectées. Parmi tous les auto-anticorps connus, on retrouve dans 90% des cas, des anti-RNP Ro (anti-Ro et anti-La). On retrouve dans le tableau 1, un résumé des anticorps qui caractérisent le syndrome de Sjögren

1.3 Les ribonucléoprotéines Ro

Les ribonucléoprotéines Ro (RNP Ro) sont des RNP présentes dans toutes les cellules de mammifères incluant les érythrocytes matures (Rader et al., 1989) et les plaquettes (Itoh et Reichlin, 1991). On a également retrouvé des homologues des RNP Ro chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Labbé et al., 1995 ; van Horn et al., 1995) et chez la grenouille *Xenopus laevis* (O'Brien et al., 1993). Les RNP Ro sont formées d'un petit ARN appelé ARN Y, de la protéine La de 48 kDa et de la protéine Ro60 de 60 kDa.

1.3.1 Les ARN Y

Les ARN Y, constituants d'acide nucléique des RNP Ro, sont de petits ARN non codants transcrits par l'ARN polymérase III (Hendrick et al., 1981). La taille et le nombre des ARN de la famille Y varient selon l'espèce et les types cellulaires (Mamula et al., 1989a ; Rader et al., 1989 ; Itoh et Reichlin, 1991). Par exemple, chez toutes les cellules humaines nucléées, on retrouve les quatre ARN hY (hY1, hY3, hY4 et hY5). La localisation cellulaire des RNP Ro est controversée (Hendrick et al., 1981 ; Ben-Chetrit et al., 1988 ; Peek et al., 1993 ; Kelekar et al., 1994). Récemment au laboratoire, il a été observé que contrairement à toutes les autres RNP Ro humaines, celles contenant l'ARN hY5 sont retrouvées préférentiellement dans la fraction nucléaire des cellules (Gendron et al., 2001). Aucune fonction n'est actuellement associée aux ARN Y. On peut retrouver à la figure 1, une représentation selon Zucker des quatre ARN hY (Zucker et al., 1999 ; Mathews et al., 1999).

1.3.2 La protéine Ro60

On retrouve, chez toutes les espèces, la protéine Ro60 qui lie une région très conservée de l'ARN Y. Cette région résulte en l'appariement des extrémités 5' et 3' qui forment une tige (Wolin et Steitz, 1984 ; Green et al, 1998 ; Ben-Chetrit et al., 1989 ; Deutscher et al, 1988). Il y a deux isoformes connues de la protéine.

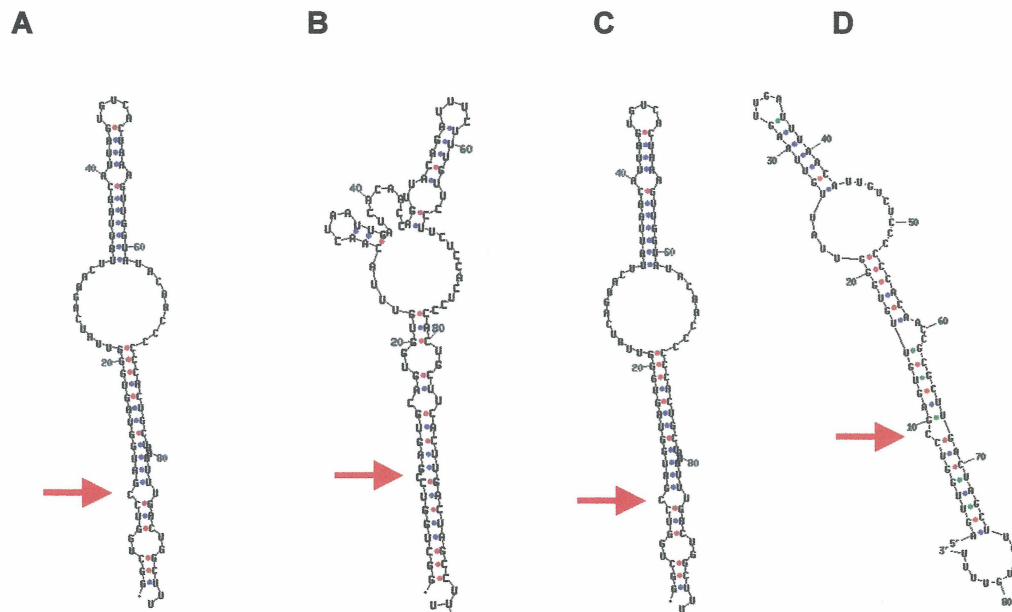


Figure 1 : Représentation schématique des quatre ARN hY selon Zucker.

(A) hY1 ; (B) hY3 ; (C) hY4 ; (D) hY5. Chez l'humain les ARN hY contiennent entre 83 et 112 nucléotides. La cytosine non appariée en position 9 essentielle à la liaison de Ro60 est représentée par une flèche rouge, au niveau de chaque ARN hY. La protéine La quant à elle ira lier l'extrémité 3' polyuridylée.

La première, l'isoforme α , contient 538 acides aminés et comprend un motif en doigt de zinc ainsi qu'un domaine de reconnaissance de l'ARN (appelé RRM ou RNP-80 motif) (Deutscher et al., 1988). La seconde isoforme dite β , contient 525 acides aminés (Ben-Chetrit et al., 1989) et est caractérisée par les mêmes domaines. La différence se situe à l'extrémité C-terminale, l'isoforme α contenant 13 acides aminés en moins ; cette région ne semble pas posséder de motifs particuliers. Comme il n'existe qu'une seule copie du gène encodant la protéine Ro60, on croit que ces deux isoformes sont le résultat de l'épissage alternatif d'un même transcrit.

Quelques fonctions ont été proposées pour Ro60, notamment un rôle dans une voie de contrôle de qualité et d'élimination des ARN ribosomiaux 5S défectueux avant leur incorporation dans le ribosome chez des ovocytes de *X. laevis* (O'Brien et Wolin, 1994 ; Shi et al., 1996) et chez *C. elegans* (Labbé et al., 2000). Cependant il n'y a aucune évidence quant à un rôle similaire chez l'humain. Également des travaux ont permis de mettre en évidence la liaison de Ro60, de la protéine La ainsi que d'un ARN non identifié à la région 5' UTR de l'ARNm de la protéine ribosomale L4 de *X. laevis* (Pellizoni et al., 1998). Ces résultats suggèrent un rôle de Ro60 au niveau de la régulation de la traduction de cet ARNm. Des clones de *C. elegans* dont les deux copies du gène de l'homologue de Ro60 ont été délétées (double knock outs) ne montrent aucune manifestation phénotypique sauf pour un niveau d'expression plus bas de l'ARN Y associé à l'homologue de Ro60, ce qui suggère un rôle pour Ro60 dans la régulation des ARN Y (Labbé et al., 1999). Plus récemment les travaux de Chen ont montré la présence d'un orthologue de Ro60 chez la bactérie radio-résistante *Deinococcus*

radiodurans. Cet orthologue appelé, Rsr, contribue à la résistance de la bactérie aux radiations UV. De plus, la protéine peut lier plusieurs ARN encodés en amont du gène *rsr* qui s'accumulent suite à l'irradiation aux UV. Un de ces ARN ressemble aux ARN Y (Chen et al., 2000).

1.3.3 La protéine La

Une fraction des RNP Ro lie la protéine La (Mamula et al., 1989b ; Boire et Craft, 1990). En fait, cette phosphoprotéine se lie au niveau de l'extrémité 3' polyuridylée de tous les transcrits de l'ARN polymérase III (Stefano et al., 1984 ; Slobbe et al., 1992), c'est pourquoi on la qualifie de facteur de terminaison de l'ARN pol III (Gottlieb et Steitz, 1989). On la qualifie également de protéine « multifonctionnelle » parce qu'elle est impliquée au niveau de plusieurs processus cellulaires. En plus des rôles énumérés ci-haut, elle participe au relâchement des transcrits, à la réinitiation et même à la modulation des transcrits naissants (Goodier et al., 1997 ; van Horn et al., 1997 ; Fan et al., 1998). On lui associe également un rôle au niveau de la régulation de la traduction de certains ARNm viraux (Meerovitch et al., 1993 ; Ali et Siddiqui, 1997) et cellulaires via une séquence IRES (Pellizoni et al., 1996, 1998 ; Ali et al., 2000 ; Holcik et Korneluk, 2000). La queue 3' polyuridylée de même que l'association de la protéine La sont perdues lors de la maturation des transcrits de l'ARN pol III (Maraia et al., 1994). Pour des raisons inconnues, l'extrémité 3' poly-U des ARN hY et des ARNm viraux n'est pas clivée et la protéine La demeure un partenaire stable d'une fraction des RNP Ro. Chez *X. laevis* et *C.*

elegans cette extrémité 3' des ARN Y est perdue lors de la maturation, ce qui suggère que les RNP Ro peuvent avoir acquis une nouvelle fonction au cours de l'évolution. De plus, certaines études ont décrit la protéine La comme hélicase ATP-dépendante de substrats d'ARN-ADN et d'ARN double brin (Bachmann et al., 1990 ; Xiao et al., 1994 ;Huhn et al., 1997), comme stabilisateur d'ARNm d'histones (McLaren et al., 1997) et comme transporteur cytoplasme-noyau (Pruijn et al., 1997). Finalement, l'homologue de la protéine La chez la levure module et participe à l'assemblage des précurseurs de snRNP U6 (Fan et al., 1998 ; Xue et al., 2000; Pannone et al., 2001)

1.3.4 Autres partenaires potentiels des RNP Ro

Comme la(les) fonction(s) cellulaire(s) des RNP Ro est(sont) toujours inconnue(s), rechercher de nouveaux partenaires pourrait permettre de trouver enfin une fonction à ces ribonucléoprotéines et d'éventuellement expliquer leur immunogénicité. C'est le but que s'est fixé un certain nombre de laboratoires de recherche dont celui du Dr Boire. Malgré les nombreuses fonctions attribuées à la protéine La et les quelques possibilités identifiées pour Ro60, personne n'a démontré un rôle pour le complexe entier (Ro60, La et l'ARN Y). La recherche de partenaires devient alors une façon intéressante d'aborder le problème. J'ai donc résumé dans les lignes qui suivent, les différents partenaires qui pourraient interagir avec les RNP Ro. Cependant beaucoup de controverses demeurent dans l'interprétation des résultats.

A partir de preuves immunologiques, il a été suggéré que les RNP Ro interagissent avec une protéine de 52 kDa (Ro52) (Ben-Chetrit et al., 1988). Cette interaction n'a toutefois pas été observée lorsque les techniques de biochimie ont été utilisées (Boire et al., 1995 ; Kelekar al., 1994). Le même résultat a été obtenu en utilisant les essais d'interaction double et triple-hybride en levures afin de vérifier l'interaction de Ro52 avec les RNP Ro. (Bouffard et al., 2000).

La calréticuline, une protéine de 43 kDa qui migre dans des gels SDS-PAGE comme un polypeptide de 60 kDa, a aussi été mentionnée comme partenaire des RNP Ro (McCauliffe et al., 1990). Cette hypothèse a été réfutée par la suite (Rokeach et al., 1991). Il y a aussi des essais d'interaction en levures comme le double-hybride qui ont permis d'identifier une protéine de 75 kDa (pp75) qui pourrait interagir avec Ro60 (Wang et al., 1999). Cependant l'interaction de cette protéine devra éventuellement être confirmée.

Très récemment, les groupes de Steiner et Pruijn ont identifié les protéines hnRNP I (ou PTB) et hnRNP K qui interagissent *in vivo* et *in vitro* avec les RNP Ro composées des ARN hY1 et hY3 biotinylés, lors d'essais triple-hybride en levures et par immunoprécipitation (Fabini et al., 2001). Aucune interaction n'a été observée avec les RNP Ro^{hY4, hY5}. Les auteurs ont également démontré la présence de trois autres protéines de masses moléculaires apparentes de 53, 65 et 80 kDa, qui précipitent avec les RNP Ro contenant les ARN hY1 et hY3. Leur identification ne devrait pas tarder. Selon les auteurs, le fait que les RNP Ro puissent lier fortement hnRNP K et faiblement hnRNP I, laisse croire qu'elles pourraient jouer un rôle au niveau de la régulation de la traduction de certains

ARNm (en effet, c'est la seule fonction biologique qui permettrait de relier Ro60, La, hnRNP K et hnRNP I).

Finalement il y a RoBP1 qui a été récemment identifiée comme un partenaire des RNP Ro^{hY5} (Bouffard et al., 2000). Comme cette protéine est le sujet central de ma maîtrise, la section 1.4 contient une description détaillée de ce partenaire et de son implication avec les RNP Ro.

1.4 La protéine RoBP1

Bouffard et al. (2000) ont mis en évidence l'interaction spécifique de RoBP1 avec les RNP Ro^{hY5} en utilisant une modification du système triple hybride en levures appelé RITA pour « RNP Interaction Trap Assay ». En se servant d'un appât composé de Ro60 et de l'ARN hY5, ils ont criblé une librairie et ainsi montré l'interaction du complexe avec une protéine nommée RoBP1 (Ro Binding Protein 1). Aucune interaction n'est possible si l'ARN hY5 est remplacé par les ARN hY1, hY3 ou hY4. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir plusieurs types de RNP Ro ou que la présence d'un ARN Y donné détermine les partenaires de la RNP Ro.

L'ARNm de RoBP1 a été retrouvé dans les 16 tissus humains testés avec une surexpression relative apparente au niveau des gonades. La protéine RoBP1 semble colocaliser avec Ro60 dans le noyau des cellules HeLa.

La séquence codante de RoBP1 compte 1593 nucléotides et contient trois domaines de reconnaissance de l'ARN (RRM). Finalement, en gel SDS-PAGE elle possède une masse moléculaire de 65 kDa. La séquence nucléotidique de

RoBP1 et la séquence peptidique de 530 acides aminés correspondante sont montrées à la figure 2.

1.4.1 RoBP1/ PUF60/ FIR

Jusqu'à aujourd'hui, deux autres groupes de recherche ont publié des résultats décrivant une protéine ayant la même séquence nucléotidique que RoBP1. Ces résultats ont été publiés pendant le cours de ma maîtrise, ce qui en a modifié le cheminement. Tout d'abord, il y a PUF60 (polypyrimidine tract binding factor 60) qui a été décrit comme étant un facteur d'épissage non essentiel (Page-McCaw et al., 1999). L'activité PUF60 a été purifiée et contient en plus de PUF60, une protéine SR appelée p54. L'activité conjuguée de ces deux protéines avec U2AF, faciliterait la liaison de snRNP U2 avec le pré-ARNm. Depuis la parution de l'article en décembre 1999, aucune autre information n'a été publiée par le laboratoire du Dr Sharp au sujet de PUF60.

Également il y a FIR (FBP interacting repressor) qui lie la protéine FBP (FUSE binding protein), un activateur du gène c-myc (Liu et al., 2000). De fait FIR cible FBP et TFIIH, au niveau de la sous-unité XPB, afin de réprimer l'activation de la transcription du gène c-myc. FIR serait donc considéré comme un répresseur.

Les trois protéines, RoBP1 / FIR / PUF60 se distinguent par la présence ou l'absence de deux séquences alternatives appelées A et B, à l'extrémité amino-terminale de la protéine (figure 3). La séquence A contient 87 nucléotides

alors que la séquence B contient 51 nucléotides. On croit que l'épissage alternatif de l'ARNm est responsable de la présence de ces isoformes.

A

```
1      ATG GCG ACG GCG ACC ATA GCT CTC GGC ACA GAC TCC ATC AAG ATG GAG
49     AAC GGG CAG AGC ACA GCC GCC AAG CTG GGG CTG CCT CCC CTG ACG CCC
97     GAG CAG CAG GAG GCC CTT CAG AAG GCC AAG AAG TAC GCC ATG GAG CAG
145    AGC ATC AAG AGT GTG CTG GTG AAG CAG ACC ATC GCG CAC CAG CAG CAG
193    CAG CTC ACC AAC CTG CAG ATG GCA GCA GTG ACA ATG GGC TTT GGA GAT
241    CCT CTC TCA CCT TTG CAA TCG ATG GCG GCT CAG CGG CAG CGA GCG CTG
289    GCC ATC ATG TGC CGC GTC TAC GTG GGC TCT ATC TAC TAT GAG CTG GGG
337    GAG GAC ACC ATC CGC CAG GCC TTT GCC CCC TTT GGC CCC ATC AAG AGC
385    ATC GAC ATG TCC TGG GAC TCC GTC ACC ATG AAG CAC AAG GGC TTT GCC
433    TTC GTG GAG TAT GAG GTC CCC GAA GCT GCA CAG CTG GCC TTG GAG CAG
481    ATG AAC TCG GTG ATG CTG GGG GGC AGG AAC ATC AAG GTG GGC AGA CCC
529    AGC AAC ATA GGG CAG GCC CAG CCC ATC ATA GAC CAG TTG GCT GAG GAG
577    GCA CGG GCC TTC AAC CGC ATC TAC GTG GCC TCT GTG CAC CAG GAC CTC
625    TCA GAC GAT GAC ATC AAG AGC GTG TTT GAG GCC TTT GGC AAG ATC AAG
673    TCC TGC ACA CTG GCC CGG GAC CCC ACA ACT GGC AAG CAC AAG GGC TAC
721    GGC TTC ATT GAG TAC GAG AAG GCC CAG TCG TCC CAA GAT GCT GTG TCT
769    TCC ATG AAC CTC TTT GAC CTG GGT GGC CAG TAC TTG CGG GTG GGC AAG
817    GCT GTC ACA CCG CCC ATG CCC CTA CTC ACA CCA GCC ACG CCT GGA GGC
865    CTC CCA CCT GCC GCT GCT GTG GCA GCT GCT GCA GCC ACT GCC AAG ATC
913    ACA GCT CAG GAA GCA GTG GCC GGA GCA GCG GTG CTG GGT ACC CTG GGC
961    ACA CCT GGA CTG GTG TCC CCA GCA CTG ACC CTG GCC CAG CCC CTG GGC
1009   ACT TTG CCC CAG GCT GTC ATG GCT GCC CAG GCA CCT GGA GTC ATC ACA
1057   GGT GTG ACC CCA GCC CGT CCT CCT ATC CCG GTC ACC ATC CCC TCG GTG
1105   GGA GTG GTG AAC CCC ATC CTG GCC AGC CCT CCA ACG CTG GGT CTC CTG
1153   GAG CCC AAG AAG GAG AAG GAA GAA GAG GAG CTG TTT CCC GAG TCA GAG
1201   CGG CCA GAG ATG CTG AGC GAG CAG GAG CAC ATG AGC ATC TCG GGC AGT
1249   AGC GCC CGA CAC ATG GTG ATG CAG AAG CTG CTC CGC AAG CAG GAG TCT
1297   ACA GTG ATG GTT CTG CGC AAC ATG GTG GAC CCC AAG GAC ATC GAT GAT
1345   GAC CTG GAA GGG GAG GTG ACA GAG GAG TGT GGC AAG TTC GGG GCC GTG
1393   AAC CGC GTC ATC ATC TAC CAA GAG AAA CAA GGC GAG GAG GAG GAT GCA
1441   GAA ATC ATT GTC AAG ATC TTT GTG GAG TTT TCC ATA GCC TCT GAG ACT
1489   CAT AAG GCC ATC CAG GCC CTC AAT GGC CGC TGG TTT GCT GGC CGC AAG
1537   GTG GTG GCT GAA GTG TAC GAC CAG GAG CGT TTT GAT AAC AGT GAC CTC
1585   TCT GCG TGA
```

B

```
1      MATATIALGT DSIKMENGQS TAAKLGLPPL TPEQQEALQK AKKYAMEQSI
51     KSVLVKQTIA HQQQQLTNLQ MAAVTMGFGD PLSPLQSMMA QRQRALAIMC
101    RYVYVGSIIYYE LGEDTIRQAF APFGPIKSID MSWDSVTMKH KGFAFVEYEV
151    PEAAQLALEQ MNSVMLGGRN IKVGRPSNIG QAQPIIDQLA EEARAFNR IY
201    VASVHQDLSDD DIKSVFEAF GKIKSCTLAR DPTTGKHKGY GFIEYEKAQS
251    SQDAVSSMNL FDLGGQYLRV GKAVTTPMPL LTPATPGGLP PAAAVAAAAA
301    TAKITAQEAV AGAAVLGTLG TPGLVSPALT LAQPLGTLPO AVMAAQAPGV
351    ITGVTPARPP IPVTIPSVGV VNPILASPPT LGLLEPKKKEK EEEELFPESE
401    RPEMLSEQEH MSIGSSARH MVMQKLLRKQ ESTVMVLRNM VDPKDIDDDI
451    EGEVTEECGK FGAVNRV IY QEKQGEEDA EIIVKIFVEF SIASETHKAI
501    QALNGRWFAG RKVVAEVDQ ERFDNSDLA
```

Figure 2 : Séquence nucléotidique et peptidique de RoBP1. (A) Séquence codante de RoBP1 contenant 1593 nucléotides. (B) Séquence peptidique correspondante. A noter les trois boîtes rouges qui représentent les trois RRM.

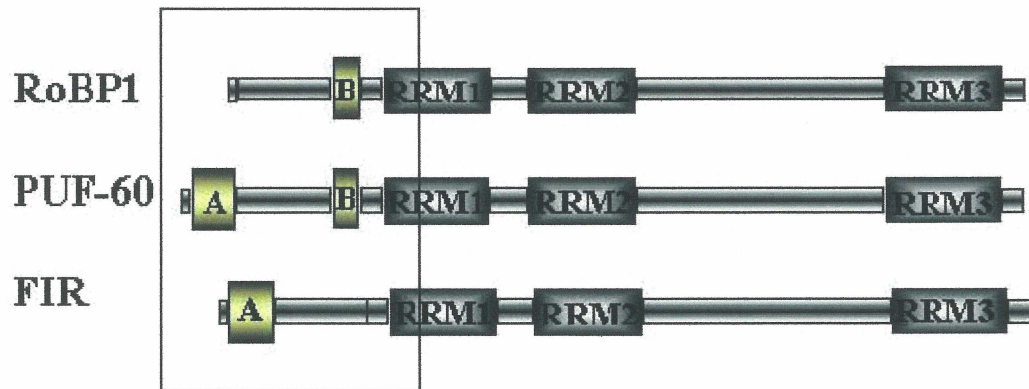


Figure 3 : Représentation schématique de RoBP1, PUF60 et FIR. Les trois protéines se distinguent par le présence ou l'absence des deux séquences alternatives A et B au niveau de l'extrémité amino-terminale.

1.4.2 RoBP1/PUF60 et épissage

Le fait que RoBP1/PUF60 puisse jouer un rôle au niveau de l'épissage est peut-être un indice que les RNP Ro puissent également participer à cette fonction cellulaire. Comme décrit par Page-McCaw et al. (1999), l'activité de PUF60 est étroitement reliée à celle de p54. En conjonction avec le facteur U2AF, le complexe p54-PUF60 faciliterait l'association de snRNP U2 avec le pré-ARNm ; cette réaction serait dépendante de la présence de la grosse sous-unité de U2AF, soit U2AF65. Afin de mieux saisir le rôle proposé pour RoBP1/PUF60, j'ai décrit brièvement dans les lignes qui suivent, les acteurs importants du spliceosome de même que les principales étapes permettant d'exciser un intron de son pré-ARNm chez les mammifères.

L'expression des gènes requiert l'excision précise de séquences non-codantes (introns) ainsi que la fusion concomitante des séquences codantes (exons). C'est le phénomène qu'on appelle épissage de l'ARN. La reconnaissance des sites d'épissage 3' et 5' s'effectue via le spliceosome, un complexe macromoléculaire constitué de ribonucléoprotéines snRNP et de protéines non-snRNP. Cinq snRNP jouent un rôle primordial au niveau de l'épissage. Elles permettent l'alignement des sites réactifs et la formation d'un noyau catalytique. Les snRNP sont constituées des snRNA (small nuclear RNAs) U1, U2, U3, U4/U6 et U5 associés avec plusieurs protéines Sm. Ces dernières sont des autoantigènes reconnus par le sérum de patients atteints de maladies auto-immunes.

La première étape dans l'assemblage du spliceosome sur le pré-ARNm consiste en la reconnaissance et la liaison de snRNP U1 sur le pré-ARNm, ce qui implique un pairage des bases de l'ARN U1 avec une séquence conservée GURAGU (ou R = purine) à l'extrémité du site d'épissage 5' (5' splice site), (figure 4). Au même moment, le facteur U2AF reconnaît une séquence riche en pyrimidines (pyrimidine tract) en aval du point de branchement (branch point) tout près du site d'épissage 3' (3' splice site). Ces deux étapes sont médiées par des protéines SR (ces protéines tirent leur nom d'une région riche en arginine et en sérine) et le complexe résultant est appelé complexe E. Les deux facteurs, snRNP U1 et U2AF, sont nécessaires pour la liaison de snRNP U2 au point de branchement. L'ARN de snRNP U2 contient une séquence complémentaire à celle du point de branchement et son arrivée crée le complexe A. Par la suite, U4/U6 et snRNP U5 interagissent avec le complexe A pour générer le complexe B qui est converti en un complexe (C) catalytique actif après un changement conformationnel. Ce changement de conformation déstabilise l'interaction entre les ARN U4 et U6. Même si U4 demeure associé au complexe, il n'est pas nécessaire aux étapes ultérieures. Les réactions de transestérification sont initiées par la suite libérant ainsi les introns auxquels demeurent liés les ARN U2, U5 et U6. L'ARNm épissé peut alors être exporté à l'extérieur du noyau (Kramer, 1996).

Ces quelques lignes ne font que résumer cette extraordinaire fonction cellulaire qu'est l'épissage. Il y a beaucoup d'autres facteurs qui participent à ce processus complexe et le but de ce résumé était d'attirer l'attention sur la liaison de U2AF au niveau de pré-ARNm.

Comme on peut le constater, RoBP1/PUF60 semble jouer un rôle dès les premiers instants de la formation du spliceosome i.e lors de la liaison de U2AF au niveau de la séquence riche en pyrimidines, c'est pourquoi j'aimerais revoir en détail chaque étape permettant la liaison de snRNP U2 au niveau du site d'épissage 3'. Tout d'abord, il y a trois éléments importants constituant le site d'épissage 3' : il y a le point de branchement (séquence reconnue par snRNP U2), la séquence de polypyrimidine et le dinucléotide AG marquant la fin de l'exon à son extrémité 3'. Le point de branchement est très conservé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (UACUAAG) et plutôt dégénéré chez les eucaryotes évolués (YNCURAY, Y = pyrimidine, R = purine, N = nucléotide quelconque). Le point de branchement établit des interactions de pairage avec l'ARN U2, ce qui entraîne le non-appariement d'un nucléotide (figure 5). Ce nucléotide, habituellement une adénosine, formera un lien phosphodiester avec l'extrémité 5' de l'intron (Wu et Manley, 1989 ; Zhuang et Weiner, 1989 ; Nelson et Green, 1989). La séquence riche en pyrimidines est très importante pour l'épissage chez les eucaryotes évolués.

L'association stable de snRNP U2 au niveau du pré-ARNm requiert l'activité de 2 facteurs : U2AF et SF1 (Kramer et Utans, 1991). U2AF est constitué de deux sous-unités de 65 et 35 kDa (Zamore et Green, 1989). U2AF65 lie directement la séquence riche en pyrimidines (Zamore et al., 1992) alors que U2AF35 reconnaît le dinucléotide AG et aide à stabiliser l'interaction de U2AF65 avec la séquence riche en pyrimidines (Wu et al., 1999 ; Merendino et al., 1999). SF1 aussi appelé BBP (branch point binding protein) a été purifié comme étant

un facteur de 75 kDa et reconnaît directement le point de branchement (Berglund et al., 1997).

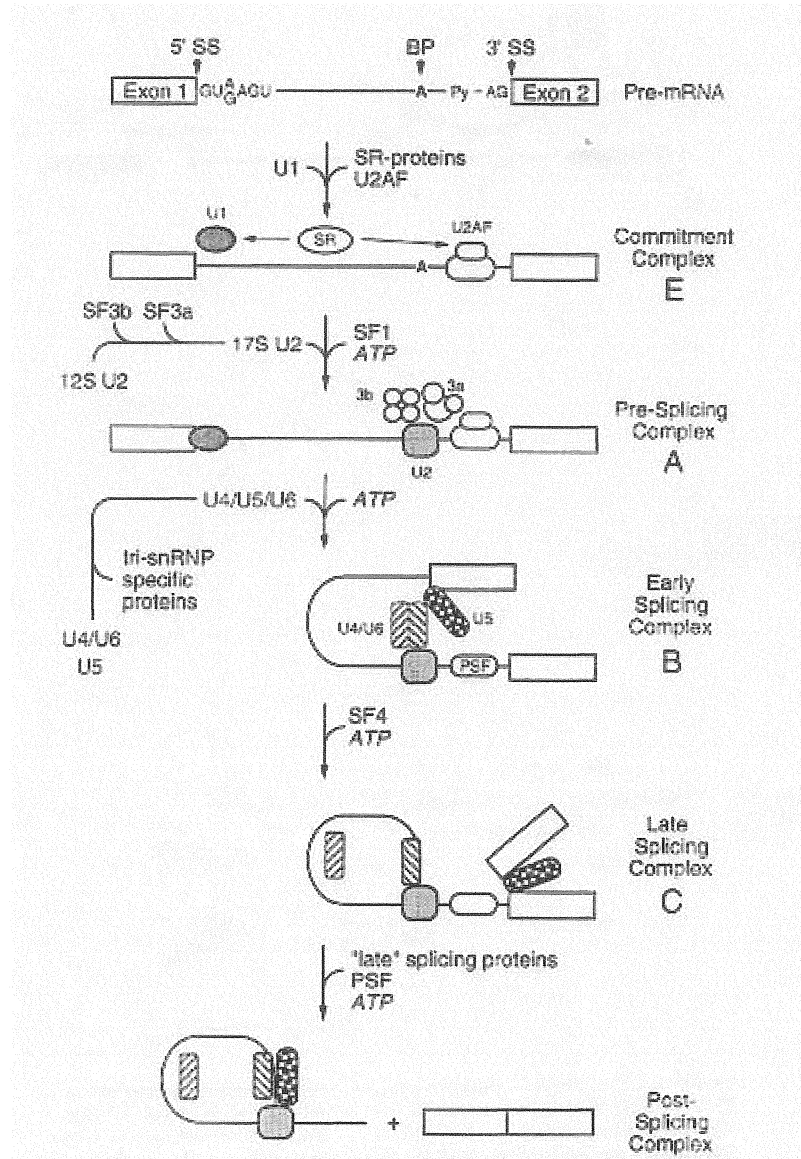
Le mécanisme par lequel U2AF et SF1/BBP facilitent l'interaction de snRNP U2 n'est pas très bien compris. L'extrémité amino-terminale (riche en arginine-sérine) de U2AF65 ferait contact avec le point de branchement. Il a été proposé que les résidus chargés positivement permettraient de stabiliser l'interaction faible (en raison du petit nombre de paires de bases formées) qui peut être établie entre l'ARN U2 et le point de branchement (Valcarcel et al., 1996). Il est aussi possible que SF1/BBP en conjonction avec U2AF65 aide à libérer le point de branchement de facteurs associés avec le pré-ARNm juste avant l'assemblage du spliceosome (Guth et Valcarcel, 2000).

L'activité de RoBP1/PUF60 est étroitement reliée avec la protéine p54, qui contient une région riche en arginine-sérine et qui est considérée comme une protéine SR (Zhang et Wu, 1996). Les protéines SR forment une famille de facteurs d'épissage qui sont très conservés chez les vertébrés et les invertébrés ; on en retrouve également chez les plantes (Birney et al., 1993 ; Lopato et al., 1996). Ces protéines jouent un rôle tant au niveau de l'épissage constitutif que de l'épissage alternatif. Par exemple, le facteur ASF/SF2 (une protéine SR) a été identifié comme facteur essentiel de l'épissage constitutif (Kraner et al., 1990) et comme facteur influençant l'utilisation de différents sites d'épissage 5' sur un même pré-ARNm (Ge et Manley, 1990). Certaines protéines SR favorisent la liaison de U2AF65 au niveau de sites 3' faibles, ce qui peut provoquer l'épissage alternatif d'un pré-ARNm (Wang et al., 1995).

Le facteur p54 a été décrit comme facteur d'épissage constitutif, i.e qu'il complète un extrait nucléaire S100 déplété (Zhang et Wu, 1996). Le même article décrit p54 comme facteur d'épissage participant aussi à l'épissage alternatif. Également p54, en conjonction avec U2AF participe à l'épissage de courts introns chez *Drosophila melanogaster* (Kennedy et al., 1998).

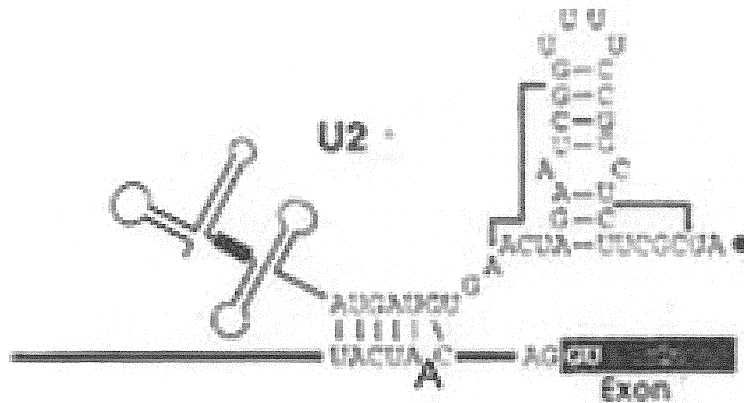
Finalement, le mécanisme exact permettant la liaison de snRNP U2 au niveau du point de branchement demeure obscur. Il reste beaucoup d'autres facteurs à identifier et il semble que la cellule est en mesure de développer beaucoup d'autres voies alternatives lui permettant d'exciser les introns, et ce même si certains facteurs considérés comme essentiels ont été déplétés (Guth et Valcarcel, 2000).

La découverte récente de p54, qui participe tant au niveau de l'épissage alternatif que de l'épissage constitutif via une interaction à U2AF65, est probablement une piste sur la découverte du mécanisme de liaison de snRNP U2 avec le point de branchement. Le fait que p54 soit étroitement liée à l'activité de RoBP1/PUF60 en est peut-être une autre quant à une fonction possible des RNP Ro^{HY5}.



Tiré de Kramer, 1996

Figure 4 : La voie d'assemblage du spliceosome sur le pré-ARNm. Les snRNP sont représentées par des symboles pleins alors que les facteurs d'épissage sont représentés par des symboles vides.



Tiré de Kramer, 1996

Figure 5 : Interactions entre l'ARN U2 et le point de branchement. La liaison de l'ARN U2 au niveau du point de branchement provoque le non-appariement d'une adénosine (A) qui formera un lien phosphodiester avec l'extrémité 5' de l'intron.

1.4.3 RoBP1/FIR et régulation transcriptionnelle du gène *c-myc*

FIR a récemment été décrit comme répresseur de l'activation de la transcription du gène *c-myc* (Liu et al., 2000). Cependant, avant de passer au rôle proposé pour RoBP1/FIR, je pense important de décrire le proto-oncogène *c-myc* de même que les facteurs influençant son expression au niveau de la région FUSE (far upstream element).

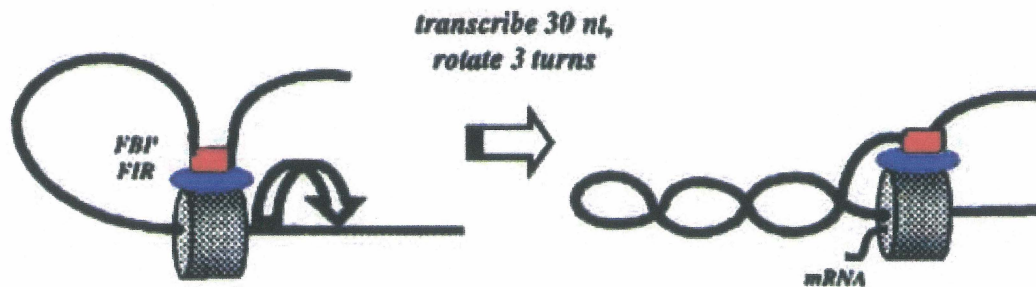
Le proto-oncogène *c-myc* encode pour un facteur de transcription impliqué dans la croissance cellulaire, la prolifération et l'apoptose. La dérégulation de *c-myc* dans une variété de néoplasies, qui est nécessaire à la pathogénèse des tumeurs, résulte la plupart du temps d'une perturbation des mécanismes de contrôle de sa transcription. *c-myc* répond à une foule de signaux intracellulaires et extracellulaires incluant des hormones, des cytokines, des lymphokines, des agents pharmacologiques, des dommages à l'ADN ainsi qu'une variété de processus biologiques (Cole, 1986 ; Spencer et Groudine, 1991). Ces signaux agissent à travers une collection de facteurs transcriptionnels qui procèdent au niveau de régions situées de part et d'autre du gène *c-myc*. Les règles par lesquelles ces signaux sont intégrés afin d'ajuster le niveau de transcription de *c-myc* demeurent inconnues. Des études utilisant des fragments aussi longs que 60 kilobases centrés autour de la région codante de *c-myc* n'ont pas permis de résoudre le patron d'expression de *c-myc* (Lavenu et al., 1994 ; Mautner et al., 1996), ce qui suggère que des éléments impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *c-myc* peuvent se situer sur de longues distances.

Des progrès ont été réalisés et on commence à mieux comprendre les facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *c-myc*. Une région située à 1.5 kb du promoteur porte le nom de FUSE et a la particularité d'être simple brin lorsque le gène est exprimé (Avignan et al., 1990 ; Duncan et al., 1994 ; Michelotti et al., 1996). De plus, quand le gène *c-myc* est actif, l'arrangement nucléosomal de cette région FUSE est brisé (Michelotti et al., 1996). La protéine FBP (FUSE-binding protein) reconnaît spécifiquement ce site et stimule l'expression du gène (Duncan et al., 1994). Les niveaux d'expression de FBP et de *c-myc* sont en corrélation (Duncan et al., 1994 ; Bazar et al., 1996), ce qui suggère que FBP et la transcription de *c-myc* sont liées *in vivo*. Également, des études récentes ont démontré que lorsqu'on interfère avec les niveaux d'expression de FBP (ou son activité), cela éteint par le fait même l'expression de *c-myc* et arrête la croissance cellulaire (He et al., 2000).

Les mécanismes d'action de FBP sont encore mal connus, c'est pourquoi l'équipe du Dr Levens s'est intéressée aux facteurs pouvant interagir avec FBP. C'est dans le cadre de cette étude qu'il a identifié FIR (ou RoBP1) (Liu et al., 2000). FIR/RoBP1 s'est avéré être un répresseur opérant via des interactions avec FBP et TFIID.

Le Dr Levens a mis au point un modèle intéressant quant à l'implication de FIR au niveau de la transcription de *c-myc* (Liu et al., 2000). Ce modèle est représenté schématiquement à la figure 6. Brièvement, la protéine FBP se lie à l'ADN simple brin en amont (environ 1500 pb) au niveau de la région FUSE de *c-myc*. La liaison de FBP active la transcription. Par contre si FIR peut lier simultanément TFIID et FBP au niveau du promoteur, il y aurait formation d'une

boucle. L'engagement de l'appareil de transcription provoquerait des torsions de stress derrière la polymérase II, empêchant ainsi la transcription complète du gène. C'est un des premiers exemples de répression mécanique. Tant et aussi longtemps que le pont protéine-protéine est maintenu, la transcription ne peut se terminer. Toujours selon Levens, ce processus serait réversible si le pont est brisé.



Tiré de Liu et al., 2000

Figure 6 : Modèle proposé pour la modulation du gène *c-myc* via FIR. La protéine FBP (rouge) se lie à la région simple brin appelée FUSE « Far upstream element » située à 1500 pb en amont du promoteur. Cette liaison permet d'activer la transcription. Par contre, lorsque FIR (bleu) va lier simultanément FBP et TFIID au niveau de la l'holoenzyme de la polymerase II, il y a formation d'une boucle. Lorsque le complexe de transcription s'engage et démarre la transcription, il y aurait des supertours négatifs induits. Ce stress empêcherait la progression de la pol II. La répression active de FIR mènerait à la régulation des pauses observées chez les polymérase comme il a été remarqué au niveau du promoteur de *c-myc* et d'autres promoteurs (Krumm et al., 1995).

1.5 Objectifs de recherche

A mesure que la recherche sur l'auto-immunité progresse, plusieurs questions importantes demeurent. Une question urgente concerne la nature de l'antigène car jusqu'à maintenant il est incertain si les auto-anticorps de même que leurs antigènes correspondants ont quelque chose à voir avec la cause primaire des maladies. C'est pourquoi le laboratoire du Dr Boire s'intéresse aux RNP Ro dans le contexte des maladies auto-immunes.

Le but du laboratoire est en fait de trouver la (les) fonction(s) du complexe RNP Ro. Comme la prévalence des anti-RNP Ro est très élevée chez les patients atteints de maladies auto-immunes (jusqu'à 80-90% des patients atteints de syndrome de Sjögren), que la quantité d'anticorps produite est très importante et que ces mêmes anticorps sont absents chez des modèles animaux auto-immuns, la structure et la fonction des RNP Ro humaines ont de fortes chances de jouer un rôle majeur dans certaines pathologies du tissu conjonctif. Jusqu'à maintenant, l'approche utilisée au laboratoire fut d'identifier des partenaires du complexe (par exemple, utilisation du système RITA en levures). Si l'on peut identifier des partenaires dont on connaît le rôle cellulaire, il devient alors possible d'imaginer des stratégies afin de démontrer un rôle pour la RNP Ro et de la relier à son immunogénicité. L'ARN hY5 semble jouer un rôle important car il est spécifique aux primates, ce qui distingue les RNP Ro humaines des autres RNP Ro. Les particularités de cet ARN sont que les RNP qui le contiennent sont nucléaires (Gendron et al., 2001) et que l'ARN hY5 lui-même semble responsable de la liaison à RoBP1 (Bouffard et al., 2000). Nous sommes donc en

présence d'un élément important dont la fonction cellulaire pourrait peut-être révéler quelques secrets au sujet des RNP Ro.

Les objectifs de mon projet consistaient tout d'abord à caractériser RoBP1 en déterminant sa localisation cellulaire et en identifiant des protéines et des acides nucléiques avec lesquelles elle peut interagir. Cette deuxième partie implique le développement d'un anticorps qui permet d'immunoprécipiter RoBP1.

Suite aux articles publiés sur les activités possibles de RoBP1 au niveau de l'épissage (PUF60) et de la transcription (FIR), nous avons dû donner une nouvelle orientation au projet. Nous avons alors tiré profit de ces informations afin d'évaluer le rôle possible des RNP Ro au niveau de l'épissage.

2. Matériels et méthodes

2.1 Constructions des vecteurs

2.1.1 Culture bactérienne et préparation de l'ADN

Les bactéries *Escherichia coli* DH10B sont rendues compétentes et transformées par la méthode de CaCl_2 (Ausubel et al., 1993). Par la suite, elles sont étalées sur milieu LB stérile contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline ou de kanamycine (selon le plasmide utilisé). La croissance bactérienne s'échelonne sur 16 heures à 37°C avec agitation. Les colonies obtenues sont repiquées afin d'ensemencer une culture liquide LB stérile contenant les mêmes concentrations d'ampicilline ou de kanamycine. On isole les plasmides par la méthode de lyse alcaline (LeGouill et al., 1994).

2.1.2 Visualisation sur gel d'agarose et ligation plasmide/insert

Tous les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (Southern, 1979) à 120 volts pendant 35 min. dans le tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 1mM EDTA). Afin de révéler les bandes d'ADN, le gel est coloré au bromure d'éthidium (EtBr, 1 mg/mL) et placé sous lampe ultra-violet à 300 nm. Les bandes d'intérêt sont excisées et purifiées à l'aide de la trousse *QIAX II Gel Extraction Kit* (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada) selon les recommandations du fabricant. Quant aux ligations plasmide/insert, elles sont

réalisées à l'aide de la trousse *Rapid Ligation Kit* (Boehringer-Mannheim, Laval QC, Canada) toujours selon les recommandations du fabricant.

2.1.3 Vecteurs utilisés pour la localisation cellulaire

Tous les gènes étudiés ont été clonés dans le plasmide pEGFP-c1 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) (figure 8) à l'extrémité C-terminale de la GFP, i.e que le gène de la GFP est exprimé en premier. Le gène de RoBP1 provient du clone 2.1 (Bouffard et al., 2000). Il a été digéré du vecteur pGad GH (Clontech Laboratories) à l'aide des enzymes EcoR1 et Apa1 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfée, QC, Canada). Le vecteur résultant a été nommé pEGFP/RoBP1. Quant aux mutants de délétion, dont la construction est détaillée à la section 2.1.3.1, ils ont été insérés également avec les deux mêmes enzymes.

2.1.3.1 Construction des mutants de délétion

Les mutants de délétion, Δ RRM1, Δ RRM2 et Δ RRM3 ont été construits à l'aide du PCR à partir du clone 2.1 contenu dans le plasmide pGAD GH (Bouffard et al., 2000). Les PCR ont été réalisés selon la stratégie illustrée à la figure 7. Dans une première étape, les bases contenues en amont et en aval de la région à éliminer ont été amplifiées par PCR. La solution d'amplification consiste en 50 pmol des amorces appropriées (Gibco BRL/Life technologies, Burlington, ON, Canada) (tableau 2), 0.4 mM dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 5 unités

d'ADN polymérase Pwo, 5 µl de tampon de dilution 5X et 2 µL de DMSO dans un volume total de 50 µl. Le tampon ainsi que l'enzyme proviennent de la trousse *Pwo DNA polymerase* (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). La matrice était le plasmide pGAD GH contenant RoBP1; 2 µg ont été alors ajoutés à la solution d'amplification. Les réactions de PCR ont été effectuées, en parallèle, dans un appareil Perkin-Elmer 9600 (Applied Biosystems, Mississauga, ON, USA). Les conditions des deux premières réactions de PCR ont été les suivantes : 94°C/5', (94°C/30", 55°C/90", 72°C/60")^{25X}, 72°C/7', 4°C. La différence entre les deux premiers PCR provient des amorces utilisées. La première réaction contient les amorces spécifiques à la partie en amont de la région à déléter (amorces 1a et A) et le deuxième contient les amorces spécifiques à la partie en aval (amorces 2a et B). Après séparation des fragments sur gel d'agarose et purification de l'ADN, une deuxième étape de PCR a été faite. Dans cette réaction, 1 µl des deux fragments purifiés provenant des deux premiers PCR a été utilisé comme matrice dans la solution d'amplification. Les amorces utilisées sont les amorces extérieures (amorces 1b et 2b). Les conditions de PCR sont les suivantes 94°C/5', (94°C/30", 60°C/90", 72°C/60")^{10X}, (94°C/30", 65°C/90", 72°C/60")^{25X}, 72°C/7', 4°C. Le fragment de bonne longueur a été visualisé sur gel d'agarose puis purifié. Il a ensuite été digéré pour être incorporé dans le plasmide approprié. Les amorces 1a et 1b contiennent un site EcoR1 alors que les amorces 2a et 2b contiennent un site Apa1. A noter que le mutant Δ RRM3 a été construit en un seul PCR, les 48 nucléotides en aval du troisième RRM ont été éliminés.

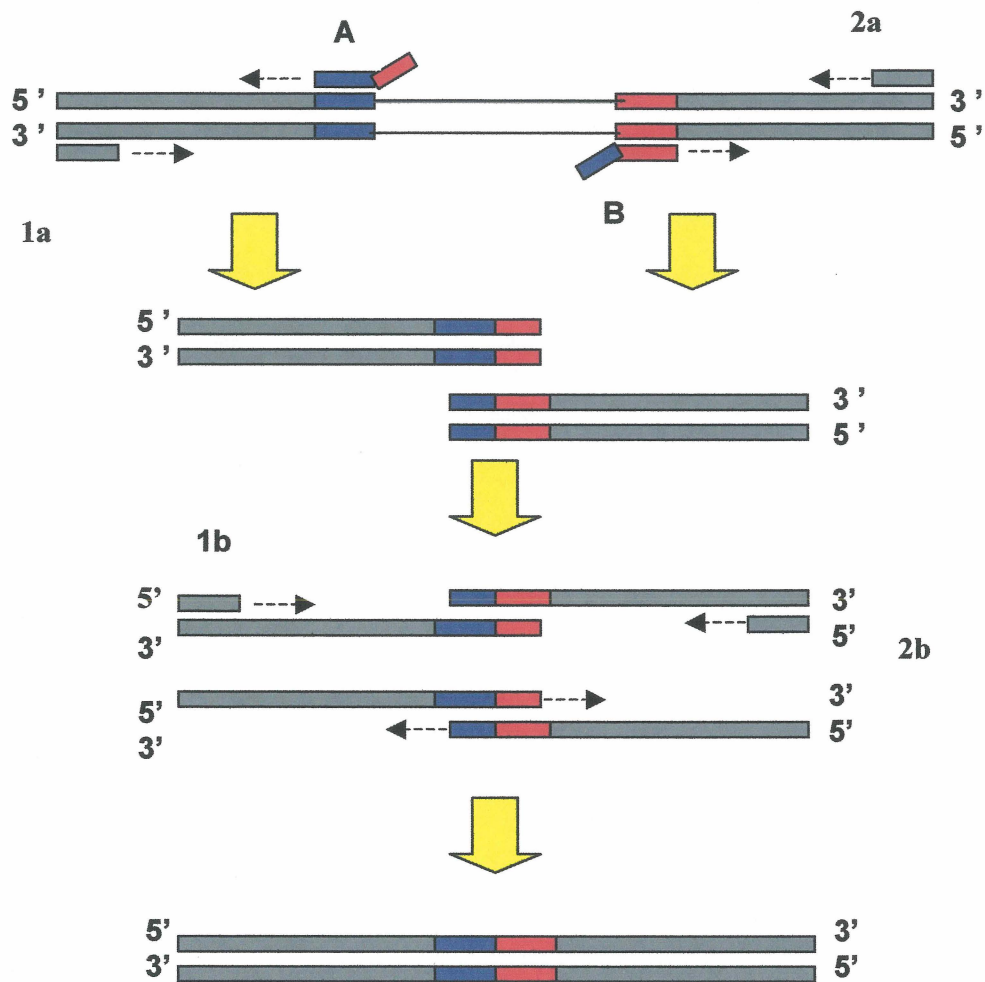


Figure 7 : Stratégie utilisée pour la construction des mutants de délétion de RoBP1. Trois PCR différents sont nécessaires pour générer les mutants. Les deux premiers PCR formeront les sections en amont et en aval de la région à déléter (ligne mince). Le troisième PCR réunira les deux fragments par une section complémentaire (régions en rouge et en bleue) et il y aura synthèse de nouveaux brins. Le produit final plus court ne contient plus la région à déléter.

Tableau 2 : Description des amorces utilisées pour la construction des mutants de délétion.

<i>Mutants</i>	<i>Amorce</i>	<i>Séquence de l'amorce (5'---3')</i>
Δ -RRM 1	A	gtctgcccgcggcacatgatggc
	B	catgtgccgggcccagaccagcaac
Δ -RRM 2	A	cttgcccgcggtgaaggcccg
	B	cttcaaccgcggcaaggctgtcacacc
Δ -RRM 3	Forward	Amorce 1a
	Reverse	atagggccctagctagccactgtagactcctgttgcg
	1a	ccggaattctgctagcatggcgacggcagaccata
	2a	atagggccctagctagccgagagaggtcactgtt
	1b	gaattctgctagcatggcgagc
	2b	atagggccctagctagcc

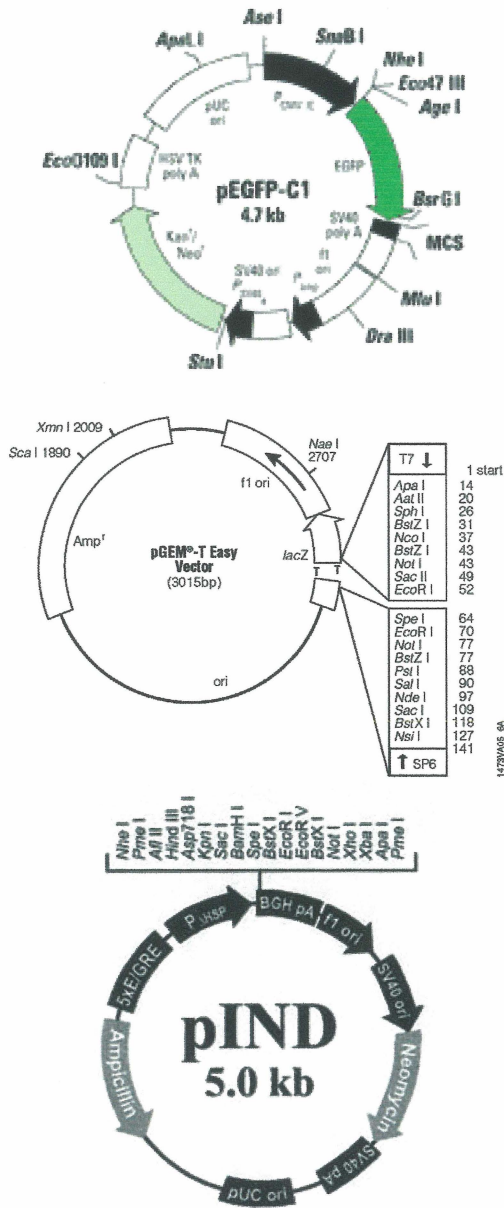


Figure 8: Principaux vecteurs. Représentation circulaire du vecteur pEGFP-c1 utilisé pour les études de localisation, du vecteur pGEM-T pour les essais de traduction *in vitro* et du vecteur pIND utilisé pour les essais d'expression dans le système ecdysone.

2.1.4 Vecteurs utilisés pour la traduction *in vitro*

Le plasmide utilisé est pGem-T (figure 8) de la trousse *pGem-T Easy vector* (Promega, Madison, WI, USA) car il possède un site SP6 nécessaire à l'essai de traduction *in vitro*. Il a été digéré EcoR1 et Apa1 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) afin d'y insérer RoBP1 provenant de pGad GH ou les mutants de délétion générés par PCR.

2.1.5 Vecteurs utilisés pour le système d'expression inductible à l'hormone d'insecte ecdysone chez des cellules de mammifères

Pour les travaux réalisés avec le système d'expression eucaryote inductible à l'ecdysone *Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System* (Invitrogen Corp, San Diego, CA, USA), nous devons ajouter une séquence HA à celle de RoBP1 dans le but de pouvoir immunoprécipiter la protéine ultérieurement. Tout d'abord, la séquence nucléotidique de RoBP1 (contenu dans pGad GH) a été amplifiée par PCR avec les amorces suivantes : ggatccgaattcatcgaggggaaggatggcgacggcgaccatagctctc et gtgcttcatggtgacggagtc. Les conditions d'amplification étaient 94°C/5', (94°C/30", 61.5°C/30", 72°C/30")^{20x}. L'essentiel de l'amplification par PCR est détaillée à la section 2.1.3.1. Cette étape de PCR permet de générer un fragment d'ADN de 500 paires de bases. En fait, le but de cette amplification est d'obtenir un gène qui sera dans le même cadre de lecture que celui de la séquence HA. Également on a pu ainsi insérer un site de coupure pour le facteur Xa qui pourra éventuellement servir à produire la protéine native. Finalement, nous voulions

limiter le nombre de mutations, c'est pourquoi nous avons amplifié seulement les 500 premières paires de bases au lieu du gène complet (environ 1700 pb).

Une fois le fragment obtenu, il a été digéré par EcoR1 et Asp1 et inséré dans pGad GH (auquel nous avons préalablement retiré le fragment correspondant de RoBP1). Le vecteur obtenu pGad GH/XaRoBP1, était maintenant prêt. L'absence de mutations a été confirmée par un séquençage effectué par le University Core DNA & Protein Services, Université de Calgary. Il fallait par la suite effectuer la fusion avec la séquence HA qui est insérée dans le vecteur pcDNA/Ha, un don du Dr Jean-Luc Parent (Université de Sherbrooke). Pour ce faire, les vecteurs ont été digérés EcoR1 et Apa1. Le vecteur pcDNA/Ha-RoBP1 a été digéré HindIII et Apa1 afin d'y exciser la séquence Ha-RoBP1 pour l'introduire par la suite dans pIND (Invitrogen Corp), (figure 8). Le vecteur pIND/Ha-RoBP1 a été transfecté dans les cellules Ecr-293 (section 2.2).

2.2 Culture cellulaire et transfection

Les cellules HeLa ont été maintenues en culture à 37°C supplémentée de 5% CO₂ avec agitation. Elles étaient cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL/Life technologies) supplémenté de 10% FBS (sérum foetal de boeuf) qui a été préalablement décomplémenté à la chaleur (56°C) pendant 30 minutes, ainsi que de 1% pénicilline et 1% streptomycine (Gibco BRL/Life technologies) .

Les cellules de souris NIH 3T3 et les cellules humaines Hek-293 ont été cultivées en boîte de pétris dans les mêmes conditions de température. La différence se situe au niveau du milieu de culture; dans ce cas-ci nous avons

utilisé du milieu DMEM (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) supplémenté de FBS (10%) et de pénicilline-streptomycine (1%).

Les cellules humaines EcR-293 (Invitrogen Corp.) ont été cultivées dans les mêmes conditions que les cellules NIH 3T3 et que les cellules Hek-293, sauf que le milieu de culture contient un antibiotique, la zéocin (Invitrogen Corp), afin de favoriser l'expression des récepteurs à l'ecdysone.

Les cellules EcR-293, NIH 3T3 et Hek-293 ont été transfectées par électroporation à l'aide d'un appareil Gene Pulser (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) à 220 volts et 960 μ F. En bref, une boîte de pétri dont les cellules sont 75% confluentes est lavée délicatement deux fois avec 2 mL de TBS stérile (150 mM NaCl; 10 mM tris-base, pH :7.4). A l'aide d'un policeman, les cellules sont récupérées et centrifugées (1000 RPM, 5 minutes) afin de les laver une autre fois dans le TBS. Puis elles sont lavées une dernière fois dans le tampon d'électroporation stérile (20 mM HEPES, pH : 7.0; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0.7 mM Na_2HPO_4 ; 6 mM glucose). Finalement, le culot de cellules est resuspendu dans 500 μ l de tampon d'électroporation auquel on a ajouté 15 μ g d'ADN plasmidique. Une fois la transfection faite, les cellules sont étalées dans une boîte de pétri et cultivées à 37°C dans du milieu DMEM incomplet i.e. sans FBS pendant 24 h. Par la suite, le milieu incomplet est changé par du milieu complet. Lorsque les cellules poussent bien et que la confluence du pétri a atteint 75% environ, l'antibiotique généticine (G418) a été ajouté afin de sélectionner pour les cellules exprimant le gène d'intérêt. La concentration en G418 est maintenue à 1000 μ g/mL jusqu'à ce que les cellules non transfectées soient

toutes mortes. Par la suite, afin de maintenir l'expression du gène, les cellules sont cultivées dans 400 µg/ml de G418.

A noter que la sélection des EcR-293 se fait en absence de zéocin lorsque la concentration en G418 se situe à 1000 µg/ml. Par la suite, lorsque cette concentration est abaissée à 400 µg/ml, la zéocin est maintenue à une concentration de 200 µM.

2.3 Traduction in vitro

Les essais de traduction *in vitro* ont été réalisés à l'aide de la trousse *TNT coupled reticulocyte lysate systems* (Promega) selon les recommandations du manufacturier. Les protéines traduites et marquées au ³⁵S ont été par la suite séparées sur un gel SDS-PAGE 15% (section 2.6.1). Après le séchage, les gels ont été exposés pendant 16 h à -80 °C sur film Biomax MR (Eastman-Kodak Company, Rochester, NY, USA).

2.4 Microscopie confocale

Les cellules ont été étalées et cultivées sur lamelles stériles circulaires de 25 mm (VWR Scientific inc. Media, PA, USA). Les cellules sont marquées au D-307 (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindodicarbocyanine perchlorate ou DiIC₁₈(5) oil) (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) à une concentration de 2.5 µg/ml de DMEM pendant 30 min. à 37°C. Par la suite, le milieu contenant du D-307 a été changé par du milieu DMEM frais. Afin de pouvoir visualiser les

cellules au microscope, la lamelle sur laquelle ont poussé les cellules, a été placée sur un portoir auquel on a ajouté du milieu DMEM.

Les cellules sont examinées avec un microscope confocal à balayage (NORAN Instruments Inc., Middleton, WI, USA) muni d'un laser au krypton/argon et couplé à un microscope inversé avec un objectif 40X (Nikon, Tokyo, Japon) à immersion d'huile. Les échantillons sont excités à 488 nm et 586 nm et l'émission est mesurée à 525-550 nm et >590 nm pour la GFP et le D-307 respectivement. Les sections optiques sont captées à des intervalles de 1.00 μm avec une ouverture de 10 μm de l'objectif du laser. Les images numériques sont obtenues avec une moyenne effectuée sur 256 prises d'images et sont accentuées et traitées avec le logiciel INTERVISION (NORAN Instruments Inc.) sur une station informatique Silicon Graphics O2.

2.5 Production d'anticorps anti-RoBP1 chez le lapin

2.5.1 Préparation de vaccin à ADN

Le vecteur utilisé est pEGFP/RoBP1 (section 2.1.3). Il a été purifié à partir d'une culture de bactéries DH10B transformées avec pEGFP/RoBP1 en utilisant la trousse *Endo Free Plasmid Mega Kit* (Qiagen Inc.) selon les recommandations du fabricant.

2.5.2 Immunisation des lapins

Deux lapins blancs de Nouvelle-Zélande âgés de 5 semaines ont été immunisés intramusculairement avec l'ADN (plasmide pEGFP/RoBP1) (section 2.1.3) à raison de 500 µg d'ADN (dans l'eau distillée) par immunisation. Les lapins ont reçu des injections à tous les 2 semaines pendant 10 semaines. Le sérum a été par la suite vérifié en immunobuvardage (section 2.6.3) pour la présence d'anti-RoBP1.

2.6 Analyse des protéines

2.6.1 Préparation d'extraits cellulaires

Les cellules (2.5 ou 5 X 10⁶ cellules) sont lavées 2 fois dans du TBS. Le culot est resuspendu dans du tampon NET-2/CLAP (50 mM Tris-base, pH :7.4; 150 mM NaCl; 0.05% NP-40; 0.1% CLAP). Si l'extrait protéique est utilisé directement en western blot, le culot est suspendu dans 30 µl alors que si l'extrait est utilisé pour une immuno-précipitation, il est suspendu dans 500 µl. Les extraits protéiques sont préparés par sonication (5 fois 15 sec.) sur glace dans du tampon NET-2/CLAP (50 mM Tris-base, pH :7.4; 150 mM NaCl; 0.05% NP-40; 0.1% CLAP) suivi d'une centrifugation (13000 RPM, 20 min., 4°C). Le surnageant est gardé et utilisé directement en western blot, dans ce cas 30 µl de tampon d'application SDS 2X (100 mM Tris, pH :6.8; 2% SDS; 20% glycérol; 10% ME)

sont ajoutés. L'extrait peut également être utilisé en immuno-précipitation, dans ce cas il est ajouté aux billes couplées avec un anticorps (section 2.6.4).

2.6.2 Migration en gel SDS-PAGE

La séparation des protéines a été effectuée sur gel SDS-PAGE discontinu en conditions réductrices et dénaturantes (Laemmli, 1970). La composition du gel concentrateur est de 4% acrylamide pH 6.8 alors que celle du gel séparateur est de 15% acrylamide pH 8.8 (ratio acrylamide : bis-acrylamide de 177 :1). Les protéines sont dénaturées dans le tampon d'application SDS 1X (50 mM Tris, pH 6.8; 2% SDS; 10% glycerol; 5% ME) pendant 3 minutes à 95°C dans un bain-marie. L'électrophorèse est réalisée à 150V pendant 60 min. dans le tampon d'électrophorèse (1% SDS; 25 mM Tris; 0.25 M glycine).

2.6.3 Détection par anticorps d'antigènes séparés par SDS-PAGE

Les protéines sont transférées (Towbin et al., 1979) du gel vers la membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) à 100V et à 4°C. L'électrotransfert s'effectue pendant 1 h dans le tampon de transfert (25 mM Tris; 0.2 M glycine; 20% méthanol). Il est vérifié par coloration des bandes protéiques avec une solution de Ponceau S (3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-phenylazo) phenylazo]-2,7-naphtalene disulfonic acid) pendant 5 min. avec agitation à température de la pièce. Cette solution est constituée de Ponceau S 0.2%, de 3% d'acide trichloroacétique et 3% d'acide sulfosalicylique. Par la suite, la membrane est lavée avec du TBS jusqu'à ce que les bandes colorées soient

complètement disparues (Salinovich et Montelaro, 1986). Le blocage est effectué dans du TBS contenant 5% gélatine de poisson pH 7.4 pendant 16 h à 4°C.

Les membranes de nitrocellulose préalablement bloquées sont lavées deux fois pendant 10 min. dans le Tampon 1 (TBS pH 7.4, 0.5% gélatine de poisson; 0.1% Tween-20) avant d'être placées dans un appareil « Miniblotter » (Immunetics, Cambridge, MA, USA). Chaque puits de l'appareil contient 42 µl des solutions de sérum diluées dans le tampon 1. L'incubation se passe à la température de la pièce pendant 1 h sous légère agitation. Par la suite les membranes sont lavées avec le tampon 1 et incubées avec une solution de protéine-A peroxydase de raifort (Sigma) diluée 1/5000 dans le tampon 1 ou une solution d'anticorps anti-igG de souris (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) couplés à la peroxydase de raifort diluée 1/1000. Les membranes sont soumises à trois lavages de 10 min. avec le tampon 2 (TBS pH 7.4; 0.1% Tween-20) suivi de deux lavages de 5 min. dans le TBS. La révélation est effectuée avec le réactif de chimioluminescence ECL (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) selon les recommandations du fabricant. L'exposition se déroule dans l'obscurité sur un film X-Omat AR (Eastman-Kodak Company).

2.6.4 Immuno-précipitation

2.6.4.1 Couplage d'anticorps à des billes de protéine A-sépharose

Pour chaque IPP, 12 µl de sérum sont liés sur 10 mg de billes de protéine A-sépharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) dans du tampon d'IPP (10

mM Tris-base, pH 7.4; 500 mM NaCl; 0.1% NP-40) pendant 16 h à 4°C, sous agitation rotative. Ensuite les billes sont centrifugées pendant 1 min. à 13000g, lavées 2 fois avec 10 volumes de tampon d'IPP et lavées 2 fois avec le tampon NET-2.

Dans certains cas, la réticulation des anticorps avec les billes est nécessaire. La réticulation est effectuée selon la méthode décrite par Harlow et Lane (1988). En fait après l'incubation de 16 h à 4°C, les billes sont lavées 2 fois avec le tampon d'IPP et deux fois avec 10 volumes d'une solution 0.2 M borate de sodium pH 9.0. Les anticorps liés sont réticulés dans 10 volumes d'une solution 0.2 M borate de sodium pH 9.0, 20 mM diméthylpimélimidate (Sigma) pendant 30 min. à la température de la pièce, sous agitation rotative. Finalement les billes sont centrifugées pendant 2 min. à 13000g et lavées 2 fois dans 10 volumes de tampon NET-2. Elles sont resuspendues dans 500 µl de NET-2 contenant 0.02% NaN₃ et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.6.4.2 Incubation des billes avec l'extrait protéique

Chaque expérience d'IPP utilise 500 µl d'extrait protéique dans le tampon NET-2/CLAP (section 2.6.1). L'incubation des billes avec les extraits cellulaires se déroule pendant 2 h à 4°C, sous agitation rotative. Par la suite, les billes sont centrifugées à 13000g pendant 1 min. et lavées 5 fois dans 10 volumes de NET-2. Les protéines immunoprécipitées sont éluées des billes en ajoutant 30 µl de tampon SDS 2X et en les laissant à 95°C pendant 3 minutes dans un bain-marie.

Une dernière centrifugation permet de récupérer le surnageant contenant les protéines immunoprécipitées qui sont prêtes à être analysées.

2.7 L'essai RITA

2.7.1 Construction des vecteurs

Les clones 3, 26, 47.3, 63.1, 127.2, 137.2 et 144.2 ont été séquencés par le University Core DNA & Protein Services, Université de Calgary. Tous ces clones ont été obtenus par le criblage d'une librairie (Bouffard et al., 2000) et sont tous insérés dans le plasmide pGAD GH. Les clones 3 (A-, B-), 47.3 (A+, B-) et 144.2 (A+, B+) possèdent une séquence complète et représentent les 4 isoformes de la protéine. Ils ont été utilisés directement dans le système RITA. Quant aux vecteurs pGAD GH contenant RoBP1 (clone 2.1), pGAD GH contenant la protéine La, pBTMRo60 et pEX hY5, ils sont décrits dans Bouffard et al. (1999; 2000).

2.7.2 Interaction des isoformes de RoBP1 en RITA

Le système RITA a été utilisé afin de vérifier et de comparer l'interaction des isoformes ((A+, B+); (A+, B-); (A-, B+); (A-, B-)) de RoBP1 avec les RNP Ro. Pour ce faire, trois plasmides ont été transformés dans les levures *Saccharomyces cerevisiae* L40Ura3 (SenGupta et al., 1996), un don du Dr Marvin Wickens (Université de Wisconsin, Madison, WI). Le génotype est MAT α ,

ura3-52, leu2-3,112, his3 Δ 200, trp1 Δ 1, LYS2 ::(lexAop)-HIS3 ::(lexAop)-lacZ. Dans un premier temps, les levures ont été transformées avec les plasmides pBTM-Ro60 et pEX hY5 en utilisant la méthode de transformation au LiAc (voir section 2.7.4) Elles ont été sélectionnées à 30°C sur milieu ne contenant pas de tryptophane (Trp-) ni d'uracil (Ura-). Une colonie a été sélectionnée pour une deuxième ronde de transformation avec le plasmide contenant l'isoforme étudiée, la protéine La (témoin positif) ou le plasmide vide (témoin négatif). Les transformants ont été sélectionnés à 30°C sur un milieu déficient en tryptophane (Trp-), en uracil (Ura-) et en leucine (Leu-). L'interaction a été vérifiée par le test X-gal sur papier-filtre (section 2.7.5)

2.7.3 Culture des levures

Les levures peuvent être cultivées sur milieu riche ou déficient pour un ou plusieurs acides aminés en autant qu'elles contiennent un plasmide encodant pour le gène de l'enzyme lui permettant de synthétiser l'acide aminé en question; dans les deux cas le milieu peut être liquide ou solide. Pour obtenir la forme solide, il suffit d'ajouter du bacto-Agar (Difco Laboratories, Fisher Scientific Ltd) au milieu liquide, juste avant la stérilisation à une concentration finale de 15%.

Le milieu riche est le milieu YPD (20g/l de Bacto-Peptone (Difco Laboratories), 10 g/l Yeast Extracts (Difco Laboratories), 2% dextrose à pH 5.8). Le dextrose est préparé à l'avance sous la forme d'une solution de 40% et filtrée sur 0.22 μ M. Il est ajouté après stérilisation du milieu.

Le milieu déficient en un ou plusieurs acides aminés est le milieu « Drop Out ». La base est constituée de 1.2 g/l de la base azotée YNB sans acides aminés ni sulfate d'ammonium (Difco Laboratories), 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g/l d'acide succinique, 6 g/l de NaOH, 2% dextrose. A cela on ajoute le mélange d'acides aminés requis. Les quantités utilisées pour faire le mélange sont indiquées dans *le Current Protocols in Molecular Biology* (section 13.1) (Sherman et al., 1987). Le mélange varie selon la restriction désirée.

2.7.4 Transformation des levures

Les levures sont transformées en utilisant une modification du protocole de Transy et Legrain (1995). A l'aide d'un manche de Koch, une colonie est piquée pour ensemercer 50 ml de YPD ou de milieu déficient (pour un ou plusieurs acides aminés) selon le cas. On laisse pousser à 30°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une culture à saturation (24-48h, D.O._{600 nm}>1.5). Cette culture devient la culture mère et peut être conservée à 4°C pour une période d'un mois. La veille de la transformation, 50 ml de milieu de culture sontensemencés avec 0.5 mL de la culture mère. Après croissance pendant 20 h à 30°C sous agitation (D.O.₆₀₀ 0.5-1.0), les levures sont lavées une première fois dans 50 ml d'eau stérile et déionisée sur membrane Milli-Q (Millipore Canada Ltd, Nepean, Ont). Elles sont ensuite lavées dans 5 ml d'une solution TE/LiAc (Tris 10 mM; pH 8.0; EDTA 1 mM; LiAc 100 mM) et suspendues dans 0.25 ml d'une solution TE/LiAc. A ce point, les levures sont dites compétentes et peuvent être gardées à la température de la pièce pour 2 h. Pour chaque transformation effectuée, un tube

de 1.5 ml est identifié dans lequel on ajoute 0.1-1.0 µg d'ADN de chaque plasmide à transformer, 50 µg d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé (Schiestl et Gietz, 1989), 50 µl de levures compétentes et 400 µl d'une solution 40% PEG4000 dans 1X LiAc/TE. Après avoir resuspendu le mélange avec une pipette, les tubes sont incubés 30 min. à 30°C avec agitation. Par la suite, on ajoute 45 µL de DMSO 100% à chaque tube et on incube 15 min. à 42°C sans agitation. Les levures sont récoltées par centrifugation à 13000g, le culot est lavé une fois dans 1 ml d'eau ultra-pure et suspendu dans 100 µl d'eau. On étale ensuite les levures sur milieu déficient correspondant au marqueur de sélection des plasmides. Les pétris sont scellés et incubés à 30°C jusqu'à apparition des colonies (5-7 jours).

2.7.5 Essai X-gal sur filtre

L'interaction entre l'appât Ro60/hY5 et un partenaire protéique est démontrée par la production de la β -galactosidase par les levures. L'essai qualitatif pour démontrer l'expression de la β -galactosidase dans le système RITA est l'essai X-gal sur papier-filtre.

Plusieurs colonies contenues sur un même pétri sont prélevées à l'aide d'un manche de Koch et sont étalées sur un papier-filtre VWR410. Il est possible de vérifier plusieurs produits sur un même filtre en prenant soin de laisser une bonne distance entre les stries. Une fois les levures étendues sur le filtre, celui-ci est trempé trois fois pendant 10 secondes dans un bain d'azote liquide. On doit laisser le filtre dégeler à la température ambiante entre chaque passage dans

l'azote liquide. Cette technique perméabilise les levures. On place ensuite un second filtre dans un pétri de 150 X 20 mm. Ce second filtre doit être imbibé d'une solution de tampon Z (60 mM Na₂HPO₄(7 H₂O), 46 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂-7H₂O, pH 7.0) à laquelle sont ajoutés 38.6 µM de β-mercaptoéthanol et 330 µg/ml de X-gal. Pour un filtre de 75 mm de diamètre, 3 ml de cette solution suffisent. À la fin des trois cycles de congélation et décongélation, le filtre contenant les levures est déposé (levures sur le dessus) sur le filtre imbibé de tampon Z/β-mercaptoéthanol/X-gal. Le développement du phénotype bleu se fait sur une période de 30 minutes.

2.8 Épissage *in vitro*

2.8.1 Préparation de l'ADN à transcrire

Le plasmide pC5' 4/4, un don du Dr Benoît Chabot (Université de Sherbrooke) (Blanchette et Chabot, 1999), contenant l'ARNm à transcrire doit d'abord être linéarisé. Pour ce faire, 15 µg d'ADN provenant d'une préparation (section 2.1.1) sont digérés par l'enzyme Sca1 (Amersham Pharmacia Biotech inc) à 37°C pendant 2,5 h. Avant de poursuivre, la digestion est vérifiée par migration d'une aliquote sur gel d'agarose. Une digestion complète génère deux bandes de 2400 pb et 1800 pb. Cette digestion est suivie d'un traitement à la protéinase K (10µg/mL), au CaCl₂ 0.1 M et au SDS 20%. Le traitement consiste à ajouter 1% du volume de digestion de chaque solution (protéinase K, CaCl₂ et SDS) et d'incuber le tout à 37°C pendant 20 min. L'ADN est isolé par extraction

au phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Le culot obtenu est resuspendu dans 8 μL de tampon TE (1 mM tris-base, pH 8.0; 0.1 mM EDTA) ce qui donne une concentration d'environ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.8.2 Transcription *in vitro* et préparation du pré-ARNm

La transcription est effectuée avec la polymérase ARN T3 (Amersham Pharmacia Biotech inc.) en présence d'un analogue de la coiffe 5' et de [α - ^{32}P] UTP. Le mélange réactionnel comprend les éléments suivants : 1 μl d'ADN plasmidique (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 5 μl de tampon 5X (Tris 200 mM, pH :7.5; MgCl_2 30 mM; Spermidine 20 mM; DTT 50 mM), 2.5 μL de UTP (100 μM) (Amersham Pharmacia Biotech), 2.5 μl de rNTP (A :C :G, 5 :5 :1 mM) (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 1 μl d'analogue de coiffe 7mG(5')ppp(5')G (2.5 mM) (New England BioLabs inc, Mississauga, ON, Canada), 1 μl de RNAGuard (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 1 μl ARN polymérase T3 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 5 μl de [α - ^{32}P] UTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) pour un volume total de 25 μl . La réaction se déroule à 37 °C pendant 1 heure.

Une fois la transcription terminée, on ajoute au mélange réactionnel 25 μl d'une solution de colorants contenant du formamide (1% xylène cyanol, 1% bleu de bromophénol, 10 mM EDTA dans le formamide déionisé). Avant d'être déposé sur le gel, l'échantillon est placé dans l'eau bouillante pendant 3 minutes et laissé sur glace pendant 1 min.

L'électrophorèse s'effectue sur gel d'acrylamide 5% contenant 8 M d'urée. Le rapport acrylamide : bis-acrylamide utilisé était de 38 :2. La migration se passe à 350 volts pendant 1.5 h. Le gel est exposé sur film X-Omat AR (Eastman-Kodak Company) pendant 15 secondes. Après révélation du film, on se sert de ce dernier afin d'identifier la région du gel où se situe le pré-ARNm en superposant le film sur le gel. En utilisant un scalpel, on isole du gel la bande contenant l'ARN recherché.

La dernière étape consiste à éluer le pré-ARNm du gel. Pour ce faire, on écrase le gel dans un tube Eppendorf à l'aide d'un petit bâton de plastique. On effectue cette opération jusqu'à ce que le gel soit broyé; ce qui facilite l'étape qui suit. Une fois la bande de gel bien écrasée, on ajoute une solution d'acétate de sodium (CH_3COONa 300 mM; SDS 0.2%) afin d'éluer l'ARN. Le tube Eppendorf est par la suite placé sous rotation pendant 30 minutes à la température de la pièce. Après une légère centrifugation (30 sec. à 2000 RPM), la phase aqueuse est récupérée et on lui ajoute 400 μl de phénol-chloroforme. L'ARN est finalement précipité à l'éthanol. Le culot est resuspendu dans un volume d'eau suffisant pour obtenir 25 000 cpm/ μl .

2.8.3 Essai d'épissage *in vitro*

Le mélange réactionnel pour l'épissage contient les éléments suivants : 2.5 μl de tampon D (HEPES 20 mM, pH 7.9; KCl 100 mM; glycérol 20%; EDTA 200 mM; PMSF 0.5 mM; DTT 0.5 mM), 0.5 μl créatine phosphate (500 mM), 0.5 μl MgCl_2 (80 mM), 0.5 μl ATP (12.5 mM); 2.5 μl polyvinyl alcool (13%), 0.25 μl DTT,

0.25 μ l RNAGuard. A cela, on ajoute 5 μ l d'extrait nucléaire préparé selon Digman et al. (1983) (don de Dr Benoît Chabot, Université de Sherbrooke) et 0.5 μ l de pré-ARNm radio-marqué (section 2.8.2), ce qui fait un volume total de 12.5 μ l. L'incubation se déroule à 30°C pendant 2 heures. Une fois la réaction complétée, on ajoute 430 μ l de la solution d'acétate de sodium et 3 μ l d'ARN de levure (Roche Diagnostics). On mélange à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes puis on effectue une extraction au phénol-chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol. Le culot est resuspendu dans 10 μ l d'une solution de colorants contenant du formamide (section 2.8.2). Les échantillons sont incubés à 95°C pendant 3 minutes dans un bain-marie avant d'être déposés sur le gel. La migration a lieu pendant 16 heures sur un gel d'acrylamide 11%, contenant 8M urée. La révélation des bandes est effectuée sur film BioMax MR (Eastman-Kodak Company) pendant 16 heures à -80°C.

Dans le cas où l'épissage est suivi d'une immunoprécipitation à 0, 30, 60 et 120 minutes, le volume initial est multiplié par 5. Donc au lieu d'avoir un volume réactionnel de 12.5 μ l, on a un volume de 62.5 μ l. Le rapport des constituants demeure inchangé. A chaque prélèvement d'échantillon (0, 30, 60 et 120 minutes), on prélève 12.5 μ l et on l'ajoute à 5 mg de billes auxquelles on a couplé préalablement l'anticorps. L'incubation est d'une durée de 30 minutes à 4°C avec agitation. Les billes sont lavées 4 fois avec 1 ml de tampon Net-2. L'ARN est élué des billes avec la solution d'acétate de sodium suivi d'une extraction au phénol-chloroforme et d'une précipitation à l'éthanol. Les culots sont suspendus dans 10 μ L d'une solution de colorants contenant du formamide et sont prêts pour l'électrophorèse.

2.8.4 Immunodéplétion

L'immunodéplétion d'extraits nucléaires se fait en incubant 100 μ l d'extraits avec 10 mg de billes sur lesquelles on a réticulé les anticorps (section 2.6.4.1). L'incubation est effectuée pendant 1 heure à 4°C avec agitation. Une centrifugation de 30 secondes à 13 000 RPM permet de séparer les billes de l'extrait. Les extraits sont alors prêts à être testés en épissage *in vitro*.

3. Résultats

3.1 Études de localisation de RoBP1 et des mutants de délétion

3.1.1 Microscopie confocale

L'immunofluorescence indirecte a déjà démontré que RoBP1 co-localise avec la protéine Ro60 dans le noyau de cellules HeLa (Bouffard et *al.*, 2000). Dans le but de poursuivre la caractérisation de RoBP1, nous avons inséré l'ADNc de RoBP1 dans un vecteur codant pour la protéine GFP. Cette approche nous a permis d'étudier les régions pouvant être responsables de la localisation nucléaire de RoBP1, en insérant des mutants de délétion dans ce même vecteur. Également, le fait d'utiliser la GFP permettait d'observer des cellules vivantes au microscope. Les cellules ne devaient donc pas subir de traitements à la formaldéhyde et au triton afin de laisser passer les anticorps, comme c'est le cas en immunofluorescence indirecte. Cela diminuait la possibilité que certains constituants puissent changer de compartiments (noyau et cytoplasme) lors des traitements chimiques.

En plus de RoBP1 lui-même, nous avons exprimé trois mutants de délétion en choisissant d'éliminer les trois domaines de reconnaissance de l'ARN (RRM) comme première cible, dans l'espoir qu'un de ces mutants donne un patron de localisation différent de celui de RoBP1. La construction de mutants est détaillée à la section 2.1.3.1.

Une fois les plasmides construits (section 2.1.3), nous avons transfecté les cellules de souris NIH 3T3, les avons sélectionnées puis les avons visualisées au microscope confocal.

La figure 9 résume le cheminement qui permet d'obtenir des images des cellules qui expriment les différentes protéines de fusion. On peut retrouver le résultat de la localisation des différentes protéines de fusion à la figure 10. Dans chaque cas, le traceur lipophile D-307 (Molecular Probes) rouge permet de distinguer le noyau du cytoplasme car il ne peut traverser la membrane nucléaire de la cellule. Ainsi le traceur D-307 colore seulement le cytoplasme.

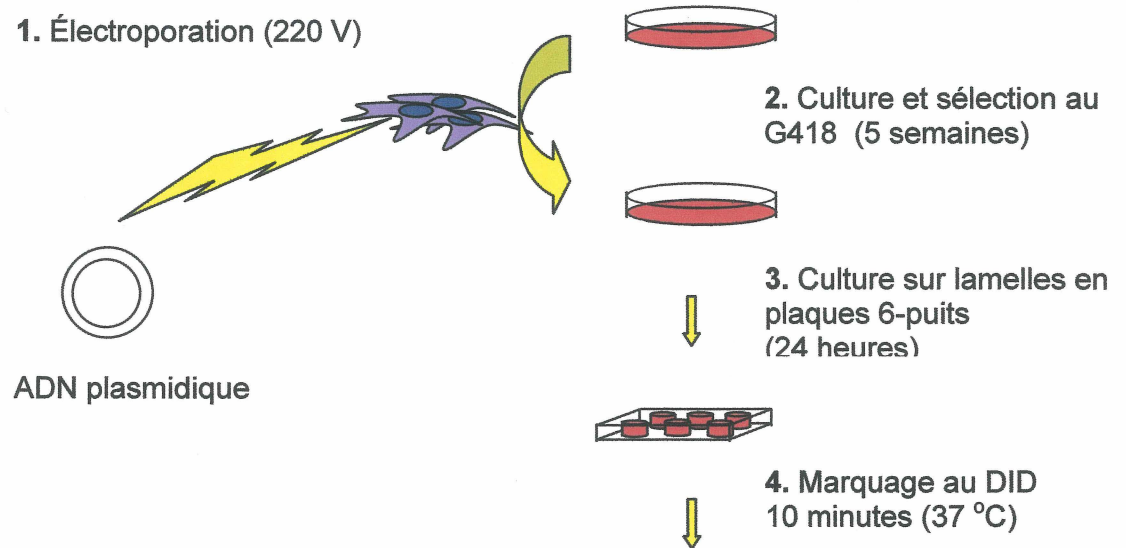
Lorsque fusionnées à l'extrémité C-terminale de la GFP, RoBP1 (fig. 10 A) et les mutants de délétion Δ RRM2 (fig. 10 D) et Δ RRM3 (fig. 10 E), ont une localisation préférentiellement nucléaire. On retrouve également ces protéines en faible quantité dans le cytoplasme, ce qui peut s'expliquer par le fait que les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme. Il est également possible que ce signal ne soit que le bruit de fond, ce qui expliquerait la fluorescence observée dans ce compartiment cellulaire. Nous n'observons pas le même patron de localisation pour le mutant Δ RRM1. En effet, le patron de localisation de ce mutant se compare aisément à celui de la GFP, i.e partout en cellule. Il ne semble pas y avoir de préférence pour le noyau ou le cytoplasme. Ces résultats suggèrent que la région de la protéine contenant le premier RRM est étroitement reliée à la localisation nucléaire de la protéine. Parallèlement à ces travaux de localisation, Jim Boulanger (2001) dans le cadre de sa maîtrise, a observé que le mutant Δ RRM1 ne peut interagir avec la RNP Ro^{hY5} en essai RITA (Mémoire de

Mairise, Université de Sherbrooke). L'importance biologique de ces observations complémentaires n'a cependant pas été investiguée ultérieurement.

Lors de ces études de localisation, nous avons pris conscience d'un problème important au niveau des cellules, occasionné par la surexpression de RoBP1. En effet, l'expression des gènes dans le vecteur pEGFP-c1 est sous le contrôle du promoteur du CMV, un promoteur efficace. Le fait que l'expression de RoBP1 soit très élevée semble ralentir considérablement la croissance cellulaire. Il se passe plus de cinq semaines entre la transfection et la prise d'acquisitions au microscope, malgré qu'aucune sélection clonale n'ait été effectuée sur les cellules transfectées. Avant de pouvoir effectuer la visualisation au microscope, nous devons laisser les cellules croître en présence de généticine jusqu'à l'obtention de la confluence en pétris, ce qui exige environ 5 semaines. Nous avons aussi observé que les cellules qui pouvaient survivre au-delà des cinq semaines de sélection exprimaient très faiblement les protéines de fusion GFP-RoBP1 et GFP-mutants. Ce qui n'était pas le cas des cellules exprimant GFP seule puisque ces cellules poussaient relativement bien.

A ce moment, nous n'avons pas encore connaissance de l'implication de RoBP1/FIR au niveau de la régulation transcriptionnelle du gène *c-myc*. Selon les articles publiés par la suite par le Dr Levens, RoBP1 serait un répresseur de l'activation de la transcription de *c-myc* en interagissant avec l'activateur FBP (Liu et al., 2000). La perte de fonction de FBP entraîne l'arrêt de la croissance cellulaire (He et al., 2000). Donc la surexpression de RoBP1 ou de ces mutants de délétion (toujours fonctionnels) expliquerait le ralentissement au niveau de la prolifération cellulaire. Ce phénomène pourrait également expliquer la raison du

**faible niveau d'expression observé chez les cellules résistantes à la généticine
au-delà des 5 premières semaines de croissance.**

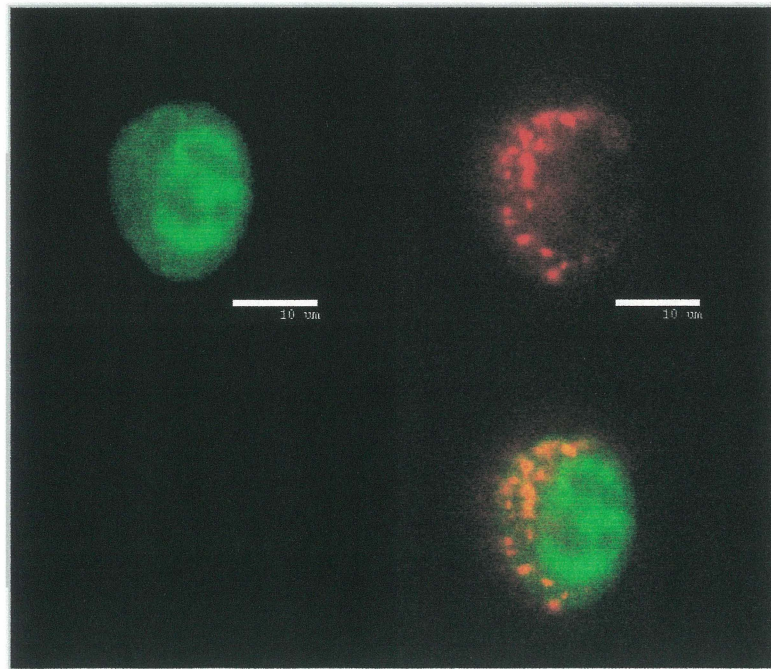
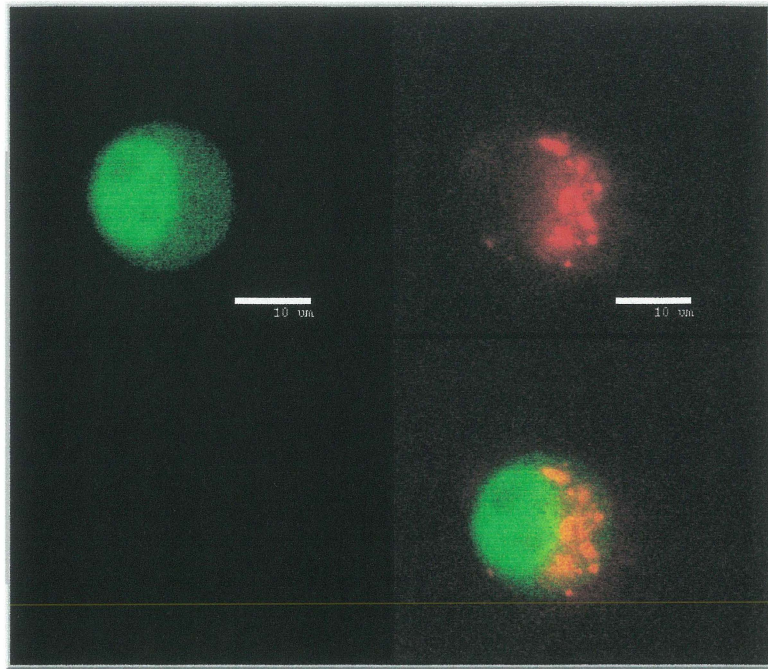


Microscopie Confocale

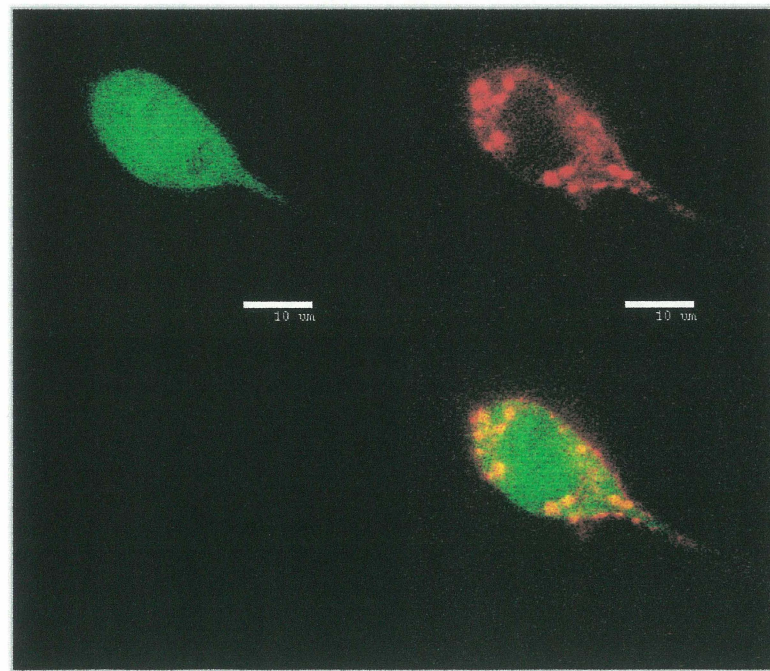
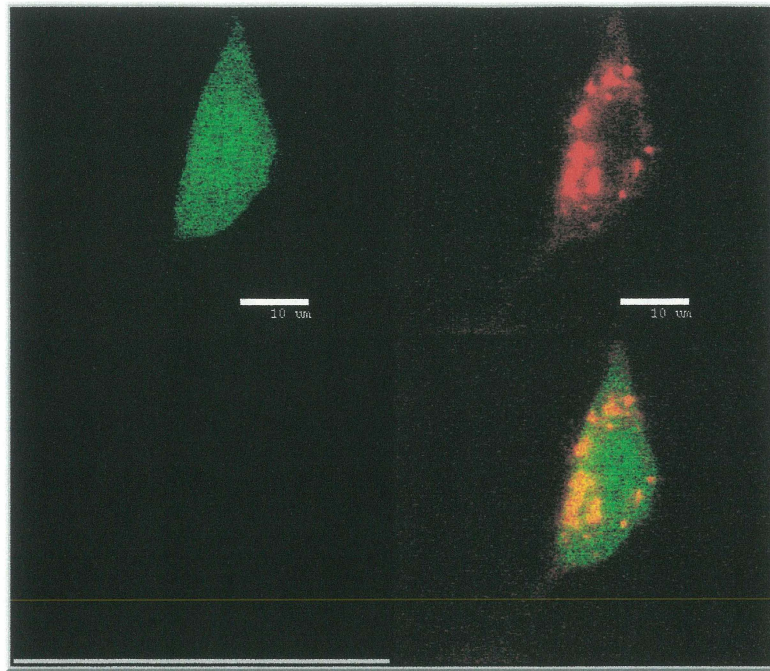
Figure 9 : Principales étapes permettant d'obtenir des cellules NIH 3T3 qui expriment les différentes protéines fusionnées à la GFP. Les plasmides sont transfectés par électroporation à 220 V. Les cellules sont par la suite cultivées dans le milieu DMEM contenant 10% FBS. Le G418 est ajouté au milieu de culture lorsque les cellules sont 75% confluentes. La sélection se déroule sur 4 semaines et le marquage au DiD (D-307) s'effectue pendant 10 minutes à 37°C.

Figure 10 : Imagerie confocale de RoBP1 et des mutants de délétion fusionnés à la GFP. Pour chaque figure, en haut à gauche est représentée la localisation de la protéine de fusion (vert) alors qu'en haut à droite est la localisation du traceur lipophile D-307 (Molecular Probes) en rouge. Ces deux images sont superposées dans la section de droite en bas. (A) GFP-RoBP1. (B) GFP. (C) GFP- Δ RRM1. (D) GFP- Δ RRM2. (E) GFP- Δ RRM3. Pour chaque situation, nous avons représenté deux acquisitions différentes.

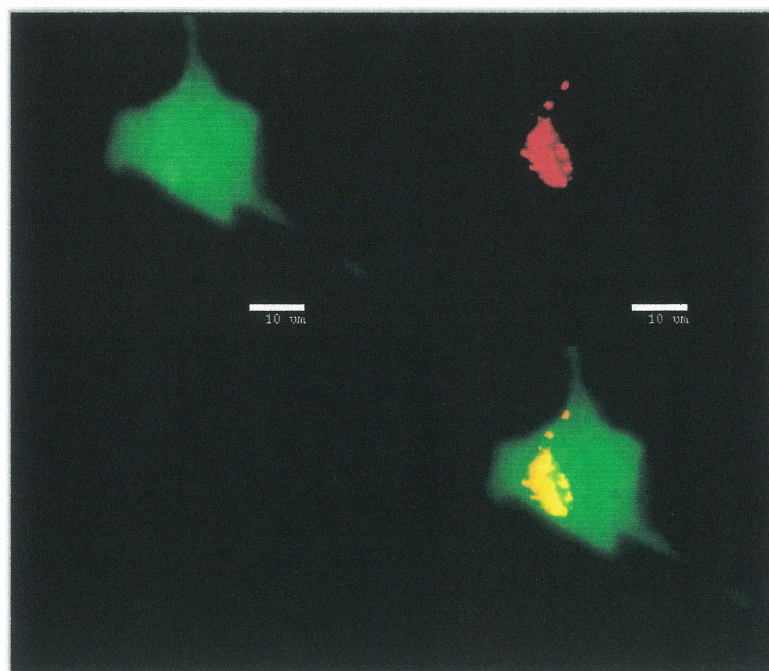
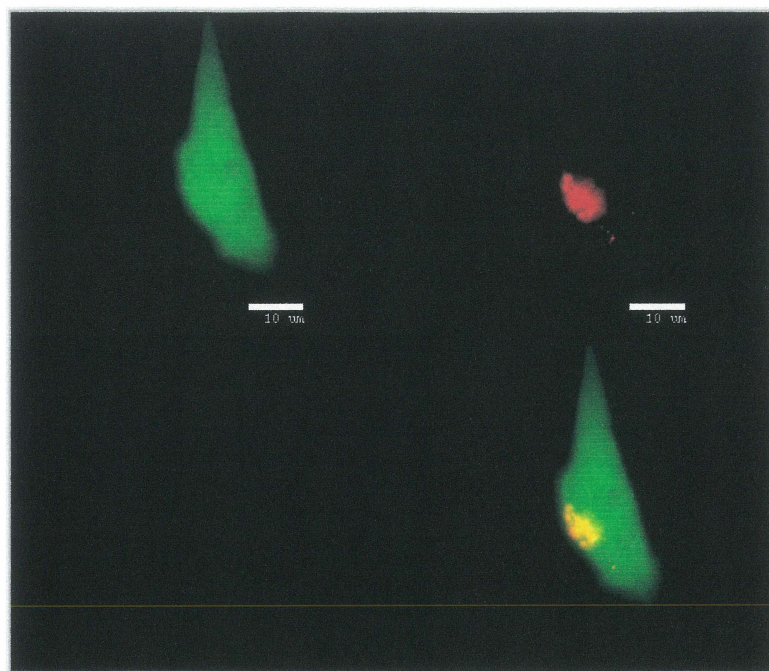
A



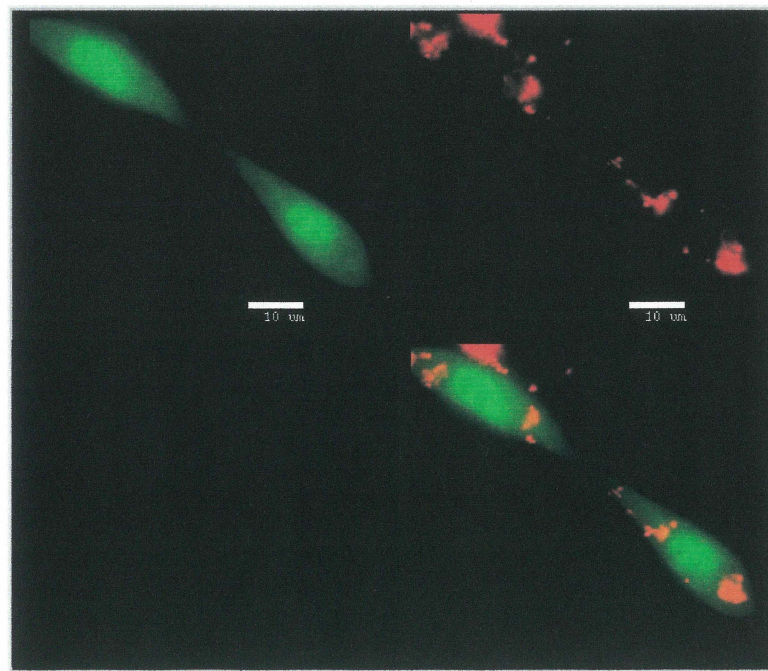
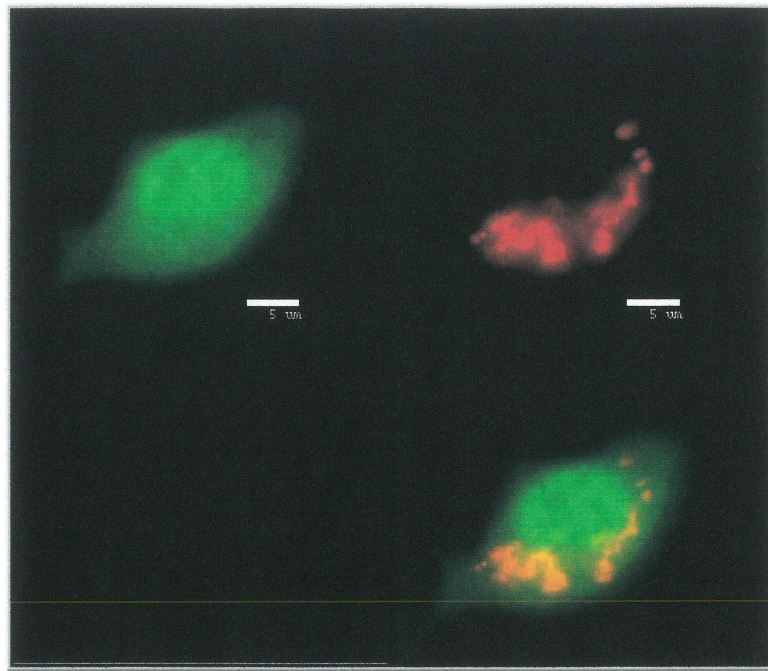
B



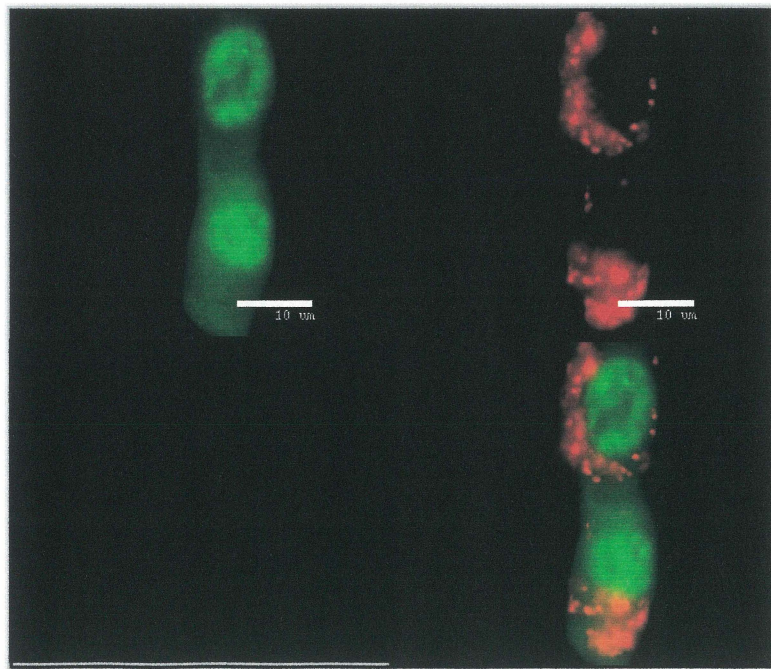
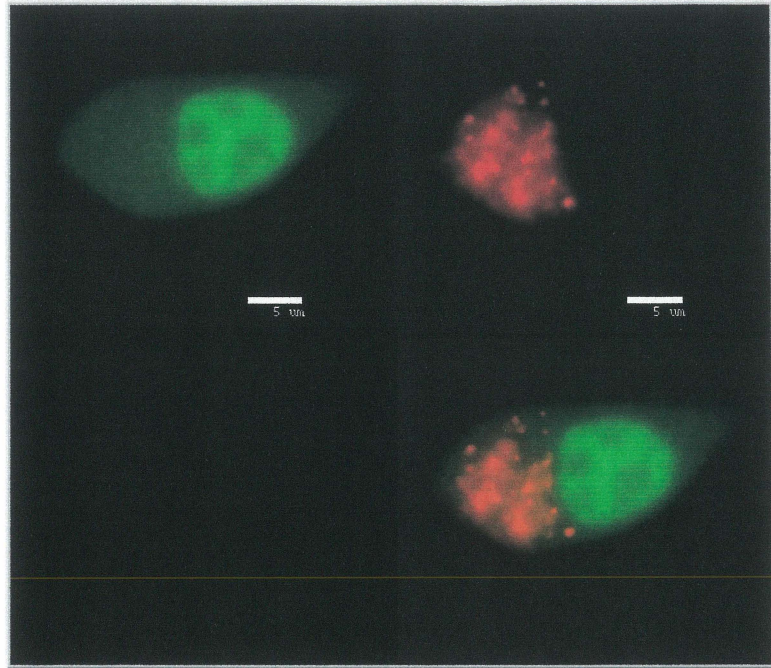
C



D



E



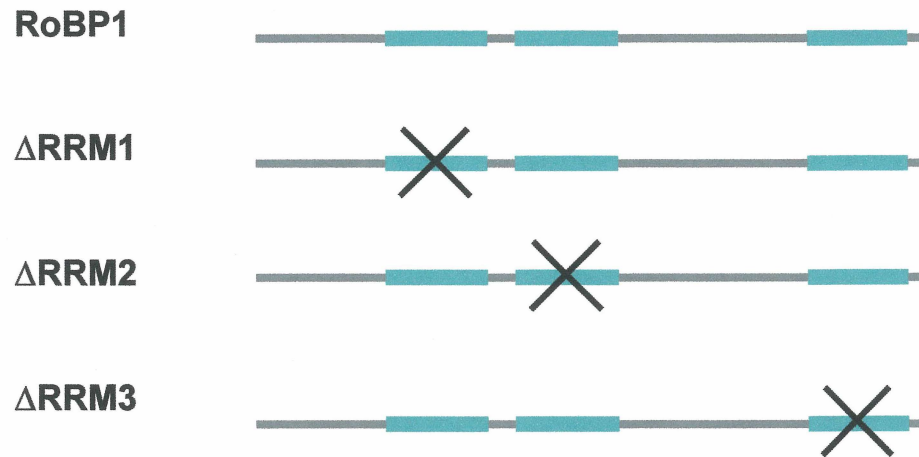
3.1.2 Traduction *in vitro* de RoBP1 et des mutants de délétion

Comme les mutants de délétion ont été construits par PCR, il est possible que certaines mutations aient été engendrées lors du processus. Dans le but de s'assurer qu'aucun codon STOP n'ait été introduit dans les ADNc, nous avons traduit *in vitro* les constructions avant de les fusionner à la GFP dans le vecteur pEGFP-c1 (Clontech). En même temps, nous en avons profité pour traduire RoBP1. Le résultat des traductions *in vitro* est représenté à la figure 11 B. Chaque construction a été traduite avec succès et les protéines obtenues (marquées au ³⁵S) possèdent les masses moléculaires prédites. RoBP1 est une protéine d'environ 65 kDa alors que les mutants Δ RRM1 et Δ RRM2 ont une masse moléculaire de 59 kDa. Quant à Δ RRM3, la protéine correspondante a une masse moléculaire de 55 kDa car le troisième RRM est un peu plus long que les deux autres.

Dans ce cas-ci, le témoin positif est un plasmide contenant le gène de la luciférase, une protéine de 66 kD, (fourni par le fabricant Promega) et le témoin négatif consiste en un essai réalisé en absence de plasmide. Ce résultat nous confirmait qu'il n'y avait pas de codons STOP introduits par les étapes de PCR.

Afin de bien se représenter les protéines traduites *in vitro*, j'ai inséré, à la figure 11 A, un dessin schématique des mutants et de RoBP1.

A



B

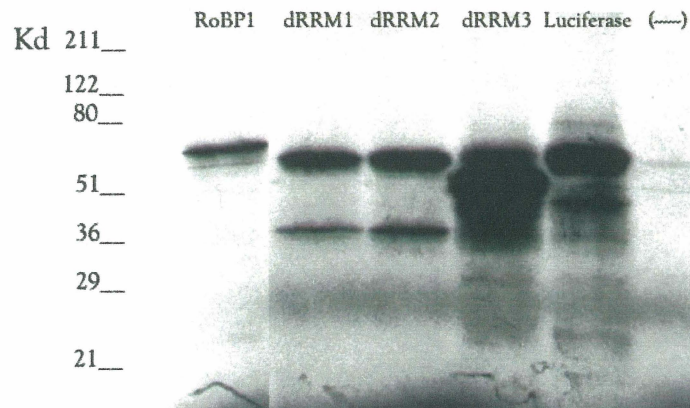


Figure 11 : Représentation schématique des mutants de délétion et traduction *in vitro*. (A) Représentation schématique de RoBP1 et des 3 mutants de délétion en gris. Les trois RRM sont représentés en bleu et le « X » indique la région qui a été déléetée par PCR. (B) Autoradiographie du gel SDS-PAGE 15% qui a permis de séparer les protéines (marquées au ^{35}S) obtenues de la traduction *in vitro* de l'ADNc de RoBP1 et celui des mutants de délétion.

3.1.3 Analyse Western

Comme mentionné à la section 3.1.1, la surexpression de RoBP1 en cellule semble induire un ralentissement très important sur la croissance cellulaire. Nous avons alors entrepris d'effectuer des analyses Western à partir d'extraits de cellules transfectées afin de vérifier l'expression des protéines de fusion et que la fluorescence enregistrée par le microscope était celle de la protéine de fusion complète et non celle de la GFP seule. La figure 12 illustre les résultats des immunoblots réalisés à partir des extraits de cellules qui expriment RoBP1 et les mutants de délétion fusionnés à la GFP.

Chaque membrane a été incubée avec un anti-RoBP1 et un anti-GFP. RoBP1 est une protéine de 65 kDa alors que la GFP est de 28kDa. Les mutants de délétion ont des masses moléculaires de 55 et 59 kD (figure 11 B). Ainsi les protéines de fusion possèdent des masses moléculaires d'environ 90-100 kD et sont reconnues simultanément par l'anti-GFP et l'anti-RoBP1. La présence de ces bandes rend compte de l'expression des protéines de fusion.

Comme l'indique la figure 12, les anticorps semblent reconnaître la protéine GFP et RoBP1. Si on analyse l'immunoblot réalisé à partir d'un extrait cellulaire transfecté avec la GFP seulement (A), on observe la présence d'une bande à 65 kDa (RoBP1) (ligne 1) et d'une bande à 28 kDa (GFP) (ligne 2). En B, dans l'extrait de cellules transfectées avec la construction plasmidique GFP-RoBP1, on observe une bande reconnue simultanément par l'anti-RoBP1 et par l'anti-GFP à environ 90 kD, nous indiquant que la protéine de fusion GFP-RoBP1 a été exprimée. Il y a également la présence de RoBP1 endogène à 65 kDa. A noter

que cette bande sera présente dans chaque extrait car elle est exprimée naturellement dans les cellules.

Les immunoblots C et D ont été réalisés à partir de cellules transfectées avec les constructions GFP- Δ RRM1 et GFP- Δ RRM2, respectivement. Dans chaque cas, les immunoblots, révèlent la présence de protéines reconnues par l'anti-RoBP1 mais aucune protéines ne semblent être reconnues par l'anti-GFP, suggérant que ces protéines de fusion sont trop faiblement exprimées pour être détectées lors d'analyses Western.

En E, nous avons l'immunoblot démontrant l'expression de la protéine de fusion GFP- Δ RRM3. Une protéine aux environs de 80 kDa semble être reconnue simultanément par l'anti-GFP et l'anti-RoBP1.

Finalement en F, nous avons un immunoblot réalisé à partir d'un extrait de cellules NIH 3T3 non transfecté. Ce témoin permet de s'assurer une fois de plus de la spécificité de l'anticorps anti-RoBP1.

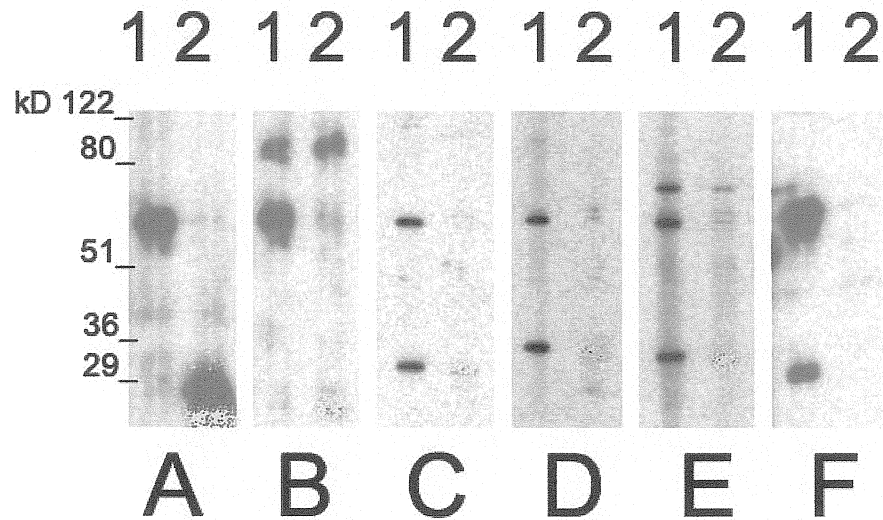


Figure 12 : Analyses Western à partir d'extraits de cellules qui expriment les protéines de fusion. Chaque immunoblot est réalisé à partir d'un pétri confluente (80%) ce qui correspond à environ 5×10^6 cellules NIH 3T3. Les protéines de l'extrait sont séparées sur gel SDS-PAGE 15% et transférées sur membrane de nitrocellulose. Cette membrane est placée dans un appareil « Miniblotter ». Les membranes ont été incubées avec un sérum de lapin anti-RoBP1 « 1 » dilué 1 :300 et un sérum de lapin anti-GFP (Invitrogen) dilué 1 :300 « 2 ». A; extrait de cellules exprimant GFP, B; extrait de cellules exprimant GFP-RoBP1, C; GFP- Δ RRM1, D; GFP- Δ RRM2, E; GFP- Δ RRM3. F; extrait de NIH 3T3 non transfecté.

En résumé, les protéines de fusion GFP-RoBP1 et GFP- Δ RRM3 sont suffisamment exprimées pour être détectées lors d'analyses Western à partir d'extraits cellulaires, contrairement aux constructions GFP- Δ RRM1 et GFP- Δ RRM2. Nous croyons que l'expression de ces protéines de fusion est sous le seuil de détection dans cet essai étant donné la trop faible expression. On pourrait penser que les deux protéines sont dans le mauvais cadre de lecture car il est possible que le clonage ait mal fonctionné, mais un séquençage de la construction GFP- Δ RRM1 nous a prouvé le contraire. Alors pourquoi les mutants Δ RRM1 et Δ RRM2 semblent avoir un niveau d'expression plus bas? Il est fort probable que la réponse se trouve au niveau de la régulation transcriptionnelle du gène *c-myc* car l'expression de *c-myc* est étroitement liée à la croissance cellulaire. Jusqu'à maintenant les données sont insuffisantes pour pouvoir répondre à cette question. A première vue, c'est comme si la pression de sélection forçait les cellules à ne pas exprimer ces protéines car elles empêchent la croissance cellulaire. Les cellules qui expriment fortement ces protéines finissent probablement par mourir. En effet, les cellules très fluorescentes, i.e celles qui expriment fortement les protéines de fusion, sont rondes et toutes petites et flottent dans le milieu de culture, caractéristique des cellules mortes. Alors après cinq semaines de sélection, on se retrouve avec une majorité de cellules qui n'expriment pas le gène d'intérêt.

3.2 Production d'un anticorps anti-RoBP1

Cette partie du projet visait à démontrer à nouveau l'interaction entre la RNP Ro et RoBP1 en utilisant une autre technique que le système triple hybride en levures (RITA). De plus, nous sommes intéressés à identifier des partenaires protéiques ou acides nucléiques à RoBP1. Également, l'obtention d'un anti-RoBP1 pouvant immunoprécipiter la protéine pourrait permettre des études fonctionnelles. Par exemple, un tel anticorps permettrait de dépleteder en RoBP1 un extrait cellulaire qui servira pour des études de transcription *in vitro* ou d'épissage *in vitro*. Par la suite cet extrait pourrait être comparé à un extrait non dépleteder quant à sa capacité à transcrire ou à épisser.

Pascal Bouffard avait tenté lors de ses études doctorales au laboratoire, de démontrer l'interaction entre Ro60 et RoBP1 en utilisant la co-immunoprécipitation. Il était possible avec des anti-Ro60 de co-immunoprécipiter RoBP1; cependant on doit d'abord réticuler des protéines cellulaires afin d'observer l'interaction (Bouffard et al., 2000). Maintenant, nous voulons tenter la même expérience mais en utilisant RoBP1 comme appât et non Ro60. Le problème c'était que nous ne possédions pas d'anticorps anti-RoBP1 qui pouvaient immunoprécipiter la protéine. Nous avons cependant un anticorps qui reconnaissait très bien RoBP1 en analyse Western mais qui était inefficace pour des études lorsque la protéine est native. Cet anticorps avait été obtenu grâce aux travaux de Élie Barbar. Il avait immunisé des lapins avec une protéine recombinante dont le troisième RRM avait été enlevé afin de maintenir la solubilité de la protéine recombinante. RoBP1, est en effet, très insoluble. Le fait d'enlever le troisième RRM l'empêche de dimériser (Page-McCaw et al., 1999) et

la rend plus soluble. La protéine déficiente en RRM3 devait tout de même être purifiée en conditions dénaturantes.

Nous avons tenté la même expérience mais cette fois en utilisant un vaccin à base d'ADN pour immuniser les lapins. Ainsi, l'ADN choisi fut le plasmide pEGFP-RoBP1 car nous savions, d'après les études de localisation et d'immunobuvardage, que ce plasmide permettait l'expression de la protéine intacte en cellules eucaryotes.

Deux lapins blancs de Nouvelle-Zélande furent immunisés avec le plasmide pEGFP-RoBP1 selon la méthode décrite à la section 2.5. Afin de vérifier la réponse immunitaire des sérums vis-à-vis cette immunisation, nous avons testé la capacité de ces sérums à reconnaître la protéine RoBP1 dans un extrait cellulaire par analyse Western (figure 13).

Le témoin utilisé (puits 1), contient l'anticorps anti-RoBP1 (obtenu par Élie Barbar). C'est le même sérum que celui utilisé à la figure 12. On peut remarquer que le sérum reconnaît RoBP1 (65 kDa) de même que le dimère à 120 kD. RoBP1 a la propriété de dimériser et quelque fois lors d'analyses Western, on peut observer ce dimère qui résiste au SDS (Page-McCaw et al., 1999). Deux lapins ont été immunisés pendant 16 semaines. A la figure 13, nous avons représenté la réponse immunitaire des sérums aux semaines 13 et 16. Avant cette période, il n'y avait toujours pas de réponse immunitaire contre RoBP1. On remarque que le sérum du lapin A semble reconnaître une protéine aux environs de 65 kDa après 13 semaines (puits 3). Cependant cette réponse a semblé disparaître à la 16^e semaine (puits 4 et 5). Quant au lapin B, il ne semble pas y avoir de réponse, même après 16 semaines.

C'était la troisième fois que des essais infructueux étaient entrepris dans le but de produire un anticorps anti-RoBP1 qui peut immunoprécipiter la protéine. La raison probable de ces difficultés avec RoBP1 est qu'elle est très conservée à travers l'évolution (95% d'homologie avec celle du rat). Cela pourrait expliquer la difficulté à générer une réponse immune contre cette protéine. Nous avons même tenté d'immuniser des lapins avec la protéine recombinante en conjonction avec le vaccin à ADN, mais sans succès.

Les résultats peu encourageants nous ont alors forcé à réorienter le projet. A ce moment, les travaux sur PUF60 et FIR venaient d'être publiés et nous en avons profité pour effectuer des expériences plutôt fonctionnelles. Ces expériences avaient pour but de définir une fonction au complexe RNP Ro^{hY5} en se servant des informations obtenues sur RoBP1.

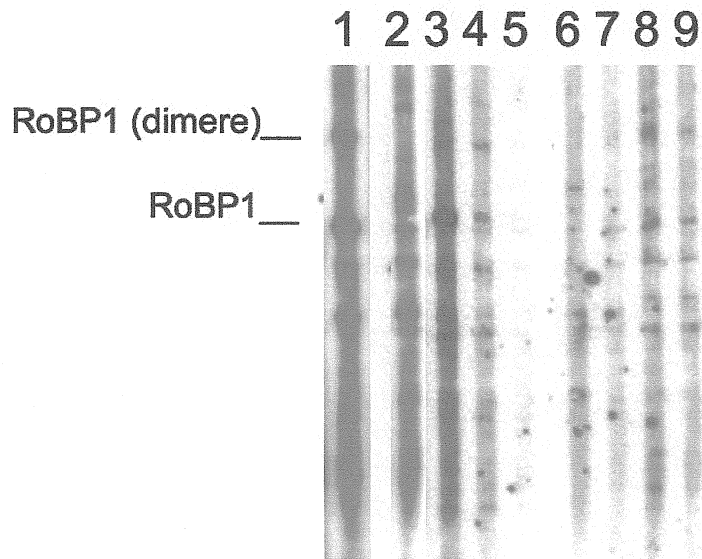


Figure 13 : Capacité des sérums de lapins à reconnaître RoBP1 par immunobuvardage. Après avoir fait migrer en gel SDS-PAGE l'extrait nucléaire, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Cette dernière fut placée dans un appareil « Miniblotter » afin de pouvoir y tester les différents sérums. Dans le puits 1, nous avons testé le sérum de lapin anti-RoBP1 (obtenu suite aux travaux de Élie Barbar). Dans les puits 2 à 5, nous avons testés le sérum du lapin A alors que dans les puits 6 à 9, nous avons testé le sérum du lapin B. Puits 2 et 6 : sérums pré-immuns T=0 (dilution 1/100); puits 3 et 7 : sérums T= 13 semaines (dilution 1/100); puits 4 et 8 : sérums T= 16 semaines (dilution 1/100); puits 5 et 9 : sérums T= 16 semaines (dilution 1/200).

3.3 Interaction de RoBP1, FIR et PUF60 avec les RNP Ro^{hY5}

Les publications parues au sujet de PUF60 (Page-McCaw et al., 1999) et de FIR (Liu et al., 2000), nous ont permis de proposer des fonctions pour les RNP Ro contenant l'ARN hY5. Nous avons donc la possibilité d'évaluer la fonction des RNP Ro au niveau de deux processus biologiques : soit au niveau de l'épissage, soit au niveau de la régulation transcriptionnelle du gène *c-myc*. Comme il est mentionné en introduction, les trois protéines sont presque identiques, la seule différence se situant au niveau de l'extrémité N-terminale. En fait, c'est par la présence ou l'absence de deux séquences alternatives (appelées A et B) que les protéines se distinguent (se référer à la figure 3). Avant d'opter pour l'une ou l'autre des possibilités, nous voulions nous assurer de l'interaction de la RNP Ro^{hY5} avec FIR et PUF60. Il serait possible que l'une ou l'autre ne puissent pas interagir avec la RNP Ro contenant l'ARN hY5. Afin de le vérifier, nous avons utilisé le système RITA qui peut nous renseigner en même temps sur la force de l'interaction qui existe au sein du complexe. Il est en effet possible de comparer qualitativement la force d'interaction des trois protéines (FIR, RoBP1 et PUF60) avec le complexe en comparant l'intensité de la couleur bleue (due à la présence de la β -galactosidase dans les levures) après ajout du substrat X-gal sur papier-filtre.

Les ADNc proviennent du criblage effectué par Bouffard et al. (2000). Parmi les clones obtenus, certains possédaient la même séquence nucléotidique que FIR et PUF60. Il s'agissait d'utiliser à nouveau ces clones dans un même essai RITA et de confirmer une fois de plus l'interaction (figure 14).

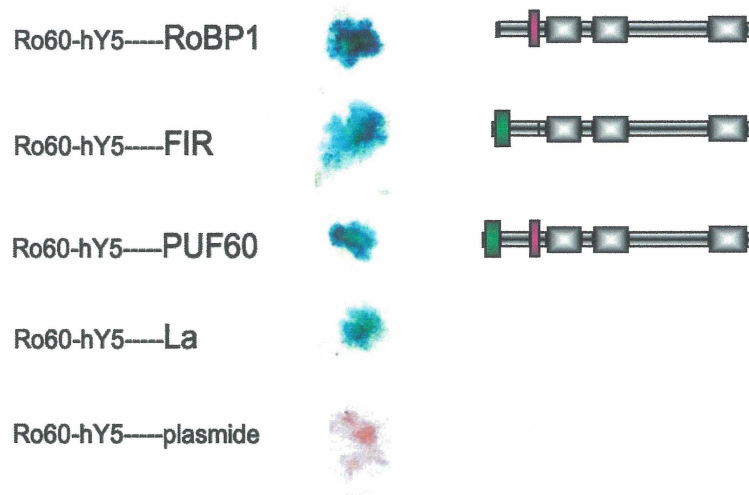


Figure 14 : Interaction entre RoBP1, FIR et PUF60 avec les RNP Ro^{hY5} en essai d'interaction dans la levure (RITA). Essai RITA, la couleur bleue indique la présence de l'enzyme β -galactosidase dans la levure; résultat de l'interaction entre Ro60, l'ARN hY5 et la protéine testée. Dans le cas où il n'y a pas d'interaction, les levures demeurent d'une teinte rosée. On observe une interaction positive avec l'appât constitué de Ro60 et de l'ARN hY5 avec RoBP1, FIR, PUF60 et La (témoin positif). Le témoin négatif est un essai réalisé avec le plasmide pGad GH sans insert. Représentation schématique de RoBP1, FIR et PUF60. En gris, les trois RRM; en vert, séquence alternative A; en violet, séquence alternative B.

Les résultats de l'interaction montrent clairement l'affinité de RoBP1 pour l'appât fait de Ro60 et de l'ARN hY5. L'interaction est également positive pour les protéines FIR et PUF60. Il est cependant difficile de dire si l'une des deux protéines a plus d'affinité que l'autre pour le complexe puisque l'intensité de la couleur est semblable. Finalement nous avons utilisé la protéine La et un essai avec le plasmide pGad GH comme témoin afin de nous assurer de la validité de l'essai.

3.4 Essais d'épissage in vitro

Les expériences reliées aux essais d'épissage in vitro avaient pour but de vérifier premièrement s'il y avait interaction entre la protéine Ro60 et le pré-ARNm ou un des sous-produits et deuxièmement de comparer l'efficacité d'un extrait nucléaire à épisser un pré-ARNm avec un extrait nucléaire n'ayant pas de protéine Ro60.

3.4.1 Étude de co-immunoprécipitation du pré-ARNm

Cette partie du projet fut réalisée en collaboration avec le laboratoire du Dr Benoît Chabot. La première étape consistait à effectuer une réaction d'épissage et à prélever des échantillons à différents intervalles de temps. Ces échantillons ont été par la suite placés en contact avec des anticorps anti-Ro60 afin d'immunoprécipiter la protéine Ro60 et par le fait même l'ARN qui est lié à la protéine. L'ARN marqué est par la suite isolé et séparé par électrophorèse.

Un essai d'épissage *in vitro* consiste à ajouter un pré-ARNm radiomarqué à un extrait nucléaire de cellules HeLa. Cet extrait contient la machinerie nécessaire (ou spliceosome) à l'épissage d'un pré-ARNm afin de générer un ARNm prêt à être exporté hors du noyau. L'électrophorèse permet de séparer les sous-produits générés lors de ce processus biologique, ce qui permet de suivre l'évolution de la réaction.

Comme pré-ARNm, nous avons choisi une section de celui de la protéine hnRNP A1 (figure 15A) (Blanchette et Chabot, 1999). Il contient les exons 7 et 7B ainsi qu'un exon provenant de l'ARNm d'un adénovirus. L'exon naturel du pré-ARNm de hnRNP A1 est l'exon 9, au lieu de celui d'un adénovirus. Lors de travaux d'étude sur l'épissage, on se doit d'avoir un ARN qui est épissé efficacement; l'exon provenant de l'ARNm d'un adénovirus contribue ainsi à augmenter l'efficacité d'épissage et donc améliorer le signal à détecter. Lorsque ce pré-ARNm est épissé, il génère plusieurs produits car il y a deux sites d'épissage 5' qui sont en compétition. Ainsi, on aura deux produits intermédiaires générés sous forme de lassos : selon le site d'épissage 5' utilisé par le spliceosome, il y aura un lasso distal et un lasso proximal (figure 15B). Habituellement, ces produits sont générés selon le rapport distal/proximal suivant : 10/90, selon l'extrait nucléaire utilisé. Dans certains cas, il est très difficile de mettre en évidence le produit distal.

L'expérience étudiée consistait à effectuer un essai d'épissage *in vitro* et à prélever une aliquote à intervalles de temps (0, 30, 60 et 120 minutes). Ces aliquotes étaient par la suite immunoprécipitées avec un sérum de lapin anti-Ro60, (don du Dr Mark Mamula, Université Yale), un sérum de lapin pré-immun,

qui est le témoin négatif et un sérum de lapin spécifique à la coiffe en 5' du pré-ARNm (sérum H20) qui est le témoin positif. Le sérum H20 est un don du Dr Chabot. Une fois l'ARN isolé, nous l'avons fait migrer sur gel SDS-PAGE + urée afin de déterminer s'il y a interaction entre le pré-ARNm et la protéine Ro60. Il est important de mentionner ici que nous utilisons un sérum de lapin afin d'immunoprécipiter Ro60 car on retrouve souvent chez les sérums de patients, des auto-anticorps dirigés contre des éléments de l'épissage (protéines Sm et U1 par exemple). L'utilisation d'un sérum de lapin augmente ainsi la spécificité envers Ro60 car nous ne voulons pas immunoprécipiter l'ARNm qui serait lié à d'autres protéines pouvant lier fortement le pré-ARNm lors de l'épissage.

Le résultat de cette expérience est représenté à la figure 16. Les incubations se sont déroulées en parallèle et des aliquotes furent prélevées aux temps indiqués en haut du gel pour être utilisés dans une réaction d'immunoprécipitation avec le sérum approprié. La figure de droite représente le gel d'électrophorèse sur lequel nous avons séparé l'ARN épissé obtenu d'une réaction d'épissage standard et qui n'est pas suivi d'une immunoprécipitation. Ces quatre puits sont indiqués NE 252. On voit clairement apparaître, après 60 minutes d'incubation, le lasso distal tout près de l'origine en haut du gel. Également la quantité de pré-ARNm décroît avec le temps ce qui démontre que l'épissage a fonctionné. Cependant l'extrait nucléaire utilisé ne semble pas favoriser l'utilisation du site d'épissage 5' proximal car on ne le voit pas le lasso proximal sur le gel.

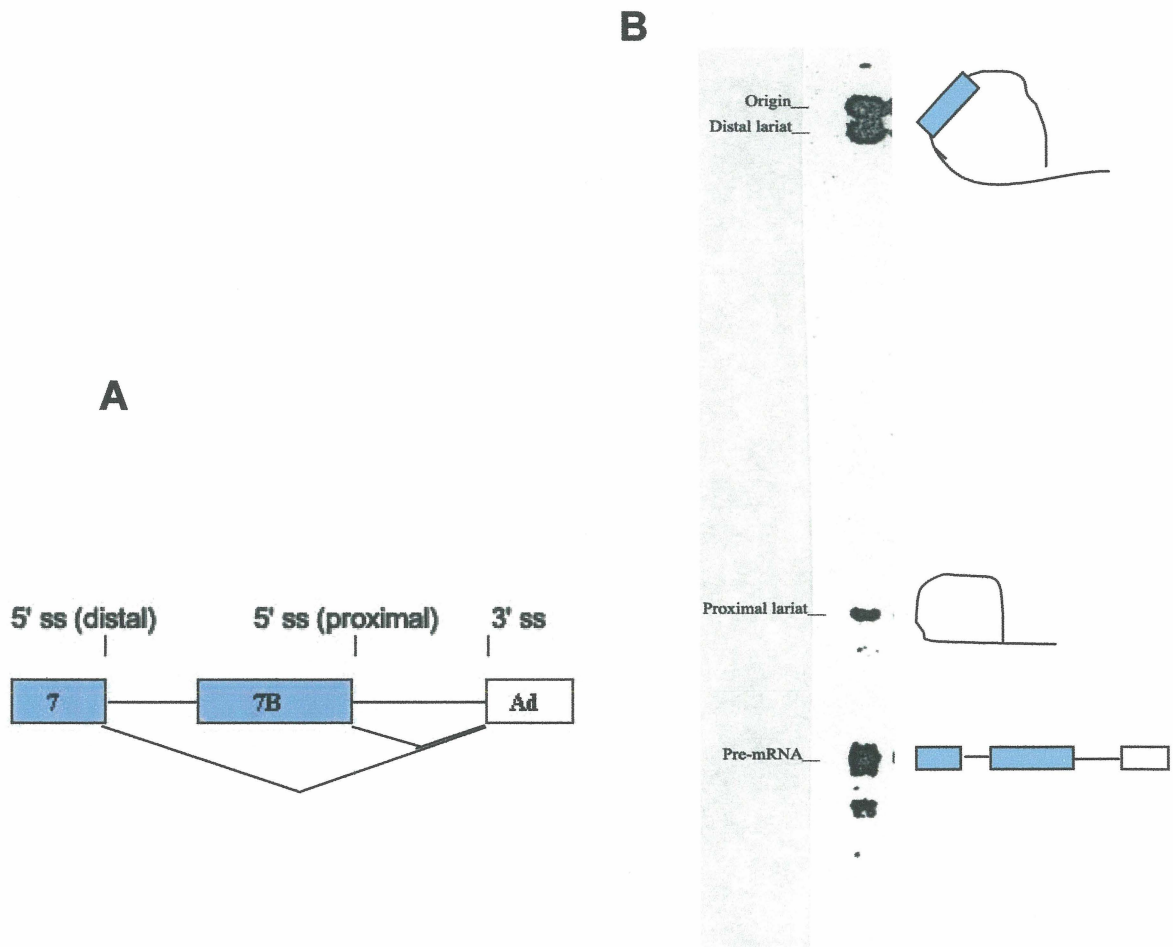
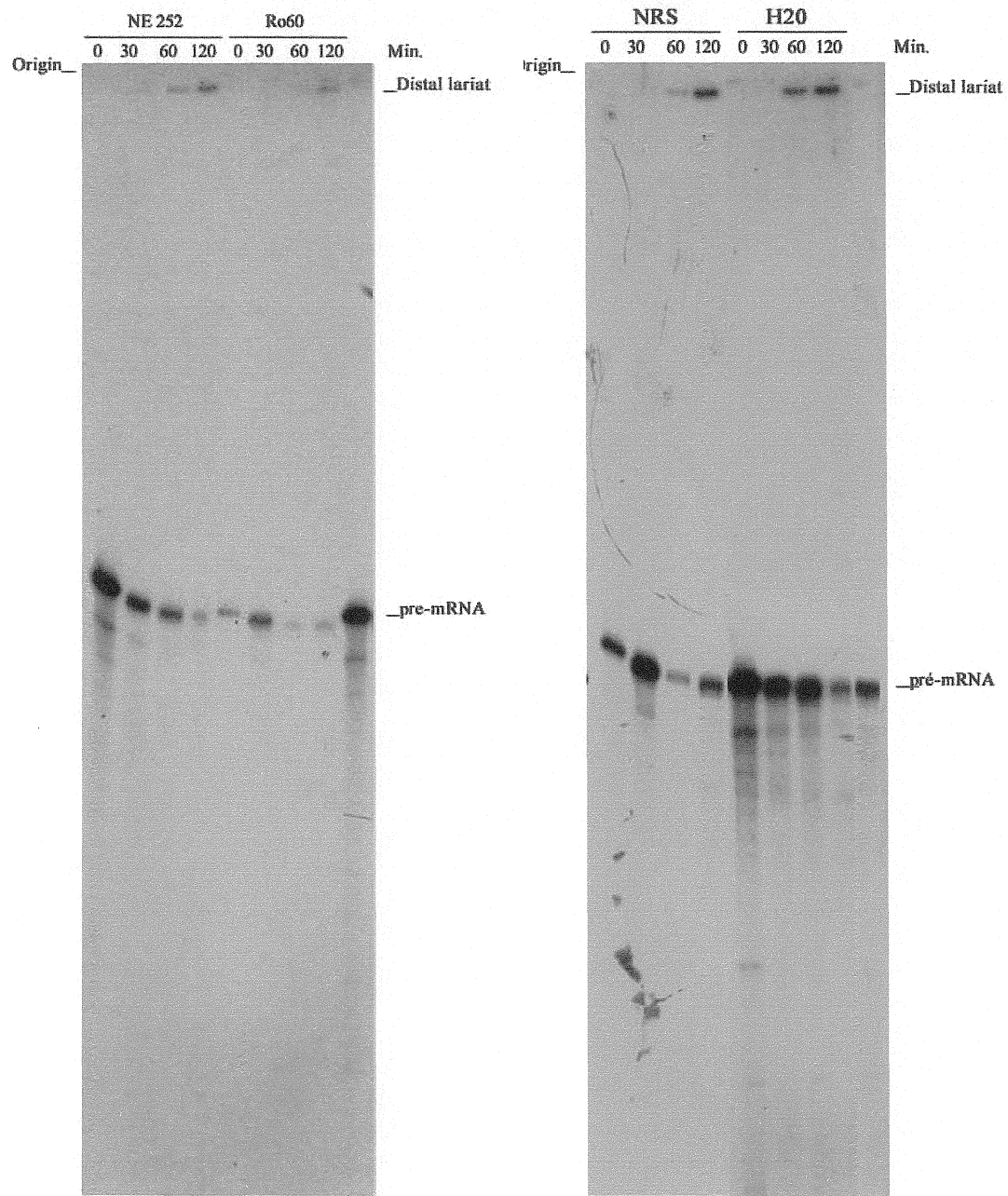


Figure 15 : Pré-ARNm de hnRNP A1 et les différents produits générés lors de son épissage par un extrait nucléaire. (A) Représentation du pré-ARNm de hnRNP A1. Les deux exons (7 et 7B) sont en bleus et le fragment d'un exon d'un adénovirus (Ad) incolore. Les deux sites 5' d'épissage qui sont en compétition y sont indiqués. (B) Gel d'électrophorèse des fragments générés suite à l'épissage de ce pré-ARNm. A droite, est représenté par schéma les sous-produits (lasso proximal, lasso distal, pré-ARNm).

Figure 16 : Essai d'épissage in vitro suivi d'une immunoprécipitation avec un sérum anti-Ro60. Quatre expériences effectuées en parallèle (Ro60, NHS, H2O et NE252). Des aliquotes ont été prélevées à 0, 30, 60 et 120 minutes d'incubation et traités par immunoprécipitation. L'ARN immunoprécipité est isolé et séparé sur gel SDS-PAGE 11% + urée. Figure de gauche : NE 252, épissage standard qui n'est pas suivi d'une immunoprécipitation. Ro60, épissage suivi d'une immunoprécipitation avec un sérum de lapin anti-Ro60. Le dernier puits à l'extrême droite, est le pré-ARNm seul, sans épissage. Figure de droite : Epissage suivi d'une immunoprécipitation avec un sérum de lapin pré-immun (NRS) et finalement épissage suivi d'une immunoprécipitation avec un sérum de lapin anti-coiffe 5' (H2O). Sur ce gel, nous avons également fait migrer un pré-ARNm seul dans un puits à l'extrême droite.



Lors des préparations d'extraits nucléaires, il est possible que certains facteurs permettant une plus grande utilisation du site d'épissage proximal soient perdus. Cela pourrait expliquer l'absence du lasso proximal sur le gel. Dans les quatre puits suivants nous avons fait migrer l'essai d'épissage suivi d'une immunoprécipitation avec le sérum anti-Ro60. A première vue, il semblerait y avoir une légère interaction entre le pré-ARNm, le lasso distal et Ro60. Cependant lorsqu'on analyse le gel de droite sur lequel nous avons fait migrer l'essai suivi d'une immunoprécipitation avec le sérum de lapin pré-immun (NRS), on voit que ce sérum immunoprécipite également le pré-ARNm et le lasso distal. Ce résultat laisse croire que l'ARN retrouvé sur le gel anti-Ro60 est le résultat d'une interaction non-spécifique. Finalement les quatre derniers puits de la figure de droite représentent l'essai suivi d'une immunoprécipitation avec le sérum anti-coiffe 5' (H20). C'est en fait le témoin positif qui nous démontre à quoi ressemble une interaction entre l'ARN et la protéine. Il y a beaucoup d'ARN co-immunoprécipité et le patron est identique à celui observé dans le cas de l'épissage standard NE 252.

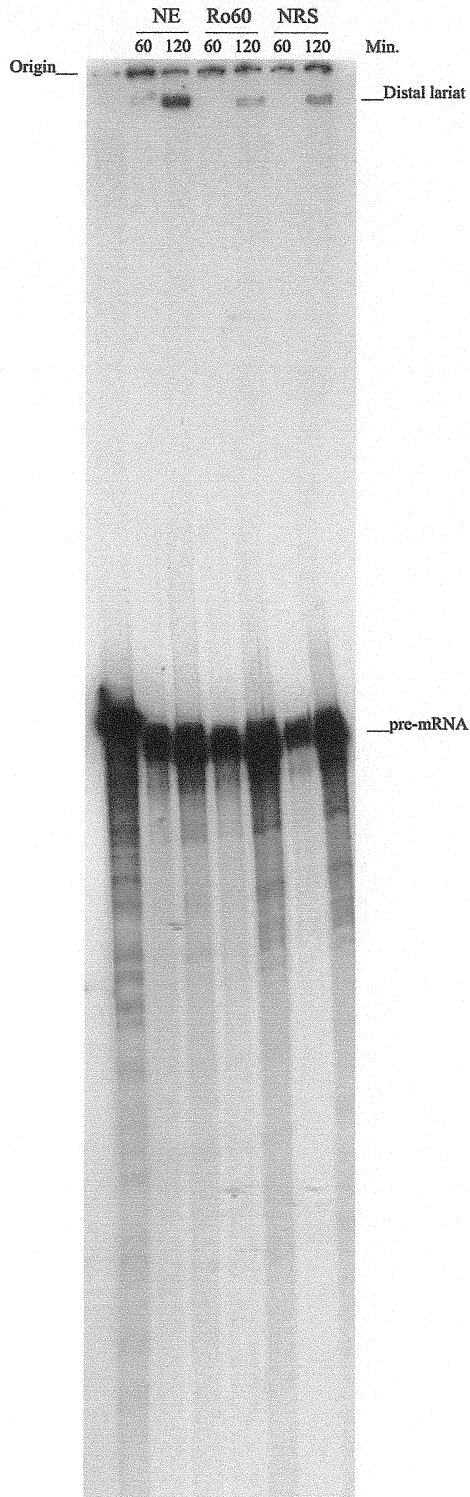
De ces résultats, nous avons conclu qu'il n'y a pas d'interaction spécifique entre Ro60 et le pré-ARNm ou un de ses sous-produits. Malgré cela, nous avons tout de même voulu connaître les conséquences de dépléter Ro60 d'un extrait et de réaliser un essai d'épissage avec cet extrait.

3.4.2 Epissage avec des extraits nucléaires déplétés en Ro60

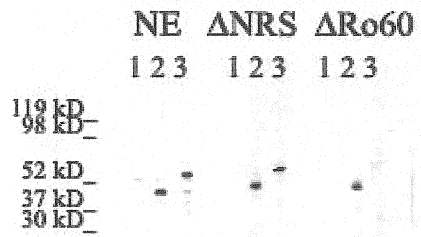
L'expérience consiste à comparer l'épissage d'un pré-ARNm (le même qu'à l'expérience précédente) en utilisant un extrait complet, un extrait traité avec un sérum normal de lapin et un extrait traité avec un sérum de lapin anti-Ro60. La déplétion consiste à incuber l'extrait nucléaire avec l'anticorps pendant 1 heure, de centrifuger afin d'isoler le surnageant qui consiste en l'extrait nucléaire déplété (section 2.8.4). Comme représenté à la figure 17, après 60 minutes d'épissage on commence à apercevoir le lasso distal dans le cas de l'extrait nucléaire complet (NE), évidence que l'épissage a débuté. Après 120 minutes, on voit clairement le lasso dans le haut du gel. Lorsqu'on analyse l'épissage avec un extrait déplété en Ro60, on observe qu'après 60 minutes, il n'y a toujours pas de lasso distal. Il apparaît plutôt après 120 minutes. L'épissage avec l'extrait complet semble être plus efficace qu'avec un extrait déplété en Ro60. Par contre, on observe le même phénomène avec l'extrait traité avec un sérum normal de lapin (NRS). Le patron d'épissage et l'intensité des bandes se comparent à l'épissage avec un extrait déplété en Ro60. La diminution d'efficacité semble être plutôt due à la déplétion elle-même qui dure 1 heure; l'extrait s'est peut-être détérioré pendant ce temps. Il est possible aussi que certains éléments utiles à l'épissage soient demeurés coincés entre ou adsorbés sur les billes.

Figure 17 : Essai d'épissage in vitro en utilisant un extrait nucléaire déplété en Ro60. (A). Épissage d'un pré-ARNm avec un extrait nucléaire complet (NE), avec un extrait nucléaire déplété avec un sérum normal de lapin (NRS) et avec un extrait nucléaire déplété avec un sérum de lapin anti-Ro60 (Ro60). (B) Analyse western démontrant la présence de Ro60 dans un extrait nucléaire complet (NE) et dans un extrait nucléaire déplété avec un sérum normal de lapin (Δ NRS) et l'absence de cette protéine dans l'extrait déplété avec un sérum anti-Ro60 (Δ Ro60). Pour chaque extrait nucléaire, le puits (1) représente un sérum normal humain (1/1000), le puits (2), un sérum de patient anti-La (1/1000) et le puits (3), un sérum de patients anti-Ro60 (1/1000).

A



B



Finaleme^{nt}, afin de s'assu^{rer} que l'extrait déplété en Ro60 ne contient vraiment plus de Ro60 détectable, nous avons réalisé un immunoblot en comparant la présence de Ro60 dans un extrait nucléaire complet (NE), dans un extrait traité avec un sérum normal de lapin (Δ NRS) et dans un extrait traité avec un sérum de lapin anti-Ro60 (Δ Ro60) (voir figure 17B).

Les résultats réalisés au niveau de l'épissage permettent de tirer certaines conclusions. Premièrement, il ne semble pas y avoir une interaction stable et forte entre Ro60 et le pré-ARNm de hnRNP A1 lors d'un essai d'épissage *in vitro*. Deuxièmement, le fait de dépléter en Ro60 un extrait nucléaire ne semble pas affecter de façon radicale l'épissage du même pré-ARNm. Cependant cela n'exclut pas que Ro60 joue un rôle au niveau de l'épissage. Il est possible que son rôle soit restreint à un petit nombre d'ARNm. Si tel était le cas, il devient assez difficile de prouver le rôle de Ro60 en épissage à moins d'utiliser le ou les pré-ARNm en question.

3.5 Immunoprécipitation de RoBP1 et système d'expression à l'ecdysone chez des cellules de mammifères

La dernière partie de mon projet consistait à trouver une façon d'immunoprécipiter la protéine RoBP1. Cette section se veut une alternative à la section sur la mise au point d'un anti-RoBP1 pouvant immunoprécipiter la protéine. Nous avons réalisé cette étude en collaboration avec le laboratoire du Dr Benoît Chabot et celui de Dr Raymund Wellinger.

La technique choisie consistait à fusionner une séquence peptidique contenue dans la protéine hémagglutinine (HA) à RoBP1 et d'utiliser un anticorps contre cette séquence afin d'immunoprécipiter la protéine. De plus, il fallait un système qui permette de contrôler étroitement le niveau d'expression de RoBP1, car une trop forte expression de cette protéine réduit considérablement la croissance cellulaire (section 3.1). C'est pourquoi nous avons opté pour le système d'expression inductible à l'ecdysone (InVitrogen). Ce système exploite les mécanismes d'expression du gène de l'hormone ecdysone retrouvé chez la drosophile. Cette hormone régule l'expression de d'autres gènes jouant un rôle essentiels lors du développement de l'insecte alors qu'il est sous forme de larve (Yamada et *al.*, 2000). Deux sous-unités d'un récepteur à l'ecdysone doivent d'abord être exprimées dans les cellules. Cela est rendu possible par la transfection des cellules avec un plasmide encodant le gène de ce récepteur. Les cellules sont co-transfectées avec un plasmide contenant le gène d'intérêt. Ce plasmide possède en amont du gène une séquence de liaison pour le récepteur lorsque celui-ci est lié l'ecdysone. Donc, lorsque l'ecdysone est présente dans le milieu de culture, il

y a induction de la transcription de l'ARN du gène d'intérêt. Dans le cas contraire, l'induction n'a pas lieu et la protéine n'est pratiquement pas synthétisée. InVitrogen vend des cellules qui expriment déjà le récepteur à l'ecdysone, ce qui évite des co-transfections laborieuses. Pour cette étude, nous avons utilisé des cellules humaines Ecr-293. Ces cellules sont des Hek-293 (human embryonic kidney) qui expriment le récepteur à l'ecdysone. Elles sont cultivées dans la zéocine afin de permettre l'expression stable du récepteur. Comme inducteur de transcription, nous avons utilisé la ponastérone A, un analogue de l'ecdysone.

Nous avons préparé le plasmide dont la construction est détaillée à la section 2.1.5 alors que les cellules exprimant la protéine de fusion Ha-RoBP1 ont été un don du laboratoire du Dr Benoît Chabot.

L'expérience consiste à vérifier s'il est possible d'immunoprécipiter la protéine Ha-RoBP1 à partir de cellules humaines Ecr-293 en utilisant un anticorps de souris anti-Ha (Bio/Can, Mississauga, Ont, Canada). Le résultat de cette expérience est représenté à la figure 18. Nous avons effectué quatre immunoprécipitations : à partir d'un extrait dont les cellules n'ont pas été induites, à partir d'un extrait dont les cellules ont été induites avec 5 mM de ponastérone A, à partir d'un extrait dont les cellules ont été induites avec 10 mM de ponastérone A et à partir d'un extrait dont les cellules ont été induites avec 5 mM de ponastérone A mais dont l'immunoprécipitation a été faite avec un sérum normal de souris. Les cellules ont été incubées avec la ponastérone A pendant 24 heures et chaque immunoprécipitation a utilisé environ 2.5×10^6 cellules. Après l'immunoprécipitation, les protéines ont été éluées des billes.

Les fractions protéiques obtenues ont été divisées en deux afin de produire des duplicatas. Une membrane a été révélée avec un anticorps anti-RoBP1 et l'autre a été révélée avec l'anti-Ha ayant servi à l'immunoprécipitation. Nous voulions effectuer l'immunoblot avec les deux anticorps afin de nous assurer que la protéine immunoprécipitée était RoBP1.

Si on analyse la figure 18, dans la partie de gauche révélée avec l'anti-RoBP1, on peut voir qu'en absence d'induction il n'y a pas de RoBP1 induit. Mais dès qu'il y a induction, que ce soit avec 5 mM ou avec 10 mM de ponastérone A, il est possible d'immunoprécipiter la protéine. On peut observer les bandes aux environs de 65 kD et le dimère à environ 130 kD. Quant au sérum normal de souris, il n'est pas en mesure d'immunoprécipiter Ha-RoBP1. En analysant la section de droite, i.e la membrane développée avec le sérum anti-Ha, on remarque essentiellement les mêmes bandes à 65 et 130 kD lorsqu'il y a eu induction (à 5 ou 10 mM). On observe aussi des bandes inférieures à 65 kD qui semblent être une reconnaissance non-spécifique de la part du sérum anti-Ha. Le fait que les deux anticorps identifient la même protéine confirme le fait que nous avons pu immunoprécipiter RoBP1.

Cette expérience est très encourageante car elle permettra d'étudier des partenaires cellulaires (ARN et protéines) de RoBP1. RoBP1 est une protéine difficile à étudier car elle est très insoluble sous forme recombinante, elle est très conservée à travers l'évolution ce qui rend difficile d'obtenir un anticorps qui peut l'immunoprécipiter, et lorsque surexprimée elle ralentit considérablement la croissance cellulaire. Mais avec la mise au point de son

expression contrôlée dans le cadre du système inductible à l'ecdysone, nous possédons maintenant les bases pouvant contourner certaines de ces limitations. De cette façon, il sera possible de vérifier si l'ARN hY5, la protéine Ro60 ou la protéine La peuvent lier RoBP1. De plus, nous devrions être en mesure d'identifier des partenaires de RoBP1. Est-ce que ces partenaires jouent un rôle majeur au niveau de la transcription de *c-myc* ou au niveau de l'épissage? Une telle question doit être répondue afin d'orienter les recherches à venir. Car jusqu'à aujourd'hui deux rôles ont été attribués à RoBP1 : transcription et épissage. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé l'information initialement disponible et tenté d'étudier son rôle dans l'épissage, en vérifiant l'implication des RNP Ro, sans trop de succès. Une meilleure connaissance des partenaires de RoBP1 permettrait de mieux cibler les expériences fonctionnelles qui devront être réalisées afin d'identifier une fonction pour la RNP Ro.

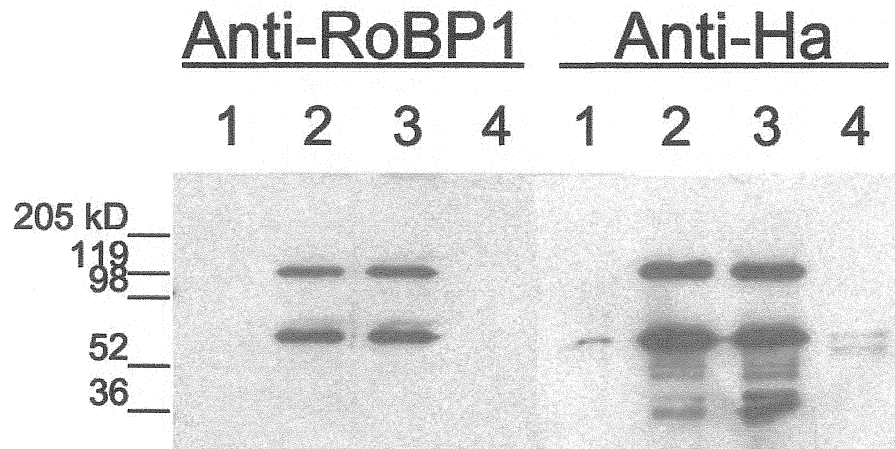


Figure 18 : Immunoprécipitation de RoBP1 à partir d'extraits de cellules EcR-293 induits à la ponastérone A. Quatre expériences parallèles (1,2,3,4) d'immunoprécipitation ont été faites avec un anticorps de souris anti-Ha (Bio/Can). Après séparation des protéines sur gel SDS-PAGE, les protéines furent transférées sur membrane de nitrocellulose. Dans la section de gauche, identifiée anti-RoBP1, la membrane a été incubée avec un anticorps de lapin anti-RoBP1 (1/300) alors que dans la partie de droite, identifiée anti-Ha, la membrane a été incubée avec le même anticorps anti-Ha (1/1000) utilisé pour l'immunoprécipitation. Le puits (1) représente l'extrait cellulaire non-induit, le puits (2), l'extrait cellulaire induit avec 5 mM de ponastérone A et le puits (3), l'extrait cellulaire induit avec 10 mM de ponastérone A. Le puits (4) représente l'extrait cellulaire induit avec 5 mM de ponastérone A mais dont l'immunoprécipitation a été réalisé à l'aide d'un sérum normal de souris.

4. Discussion

Nous ignorons toujours si les antigènes ciblés par le sérum de patients atteints de maladies auto-immunes ont un lien quelconque avec la cause primaire des pathologies. Cette question mérite d'être approfondie et le laboratoire du Dr Boire a choisi d'étudier les ribonucléoprotéines Ro dans ce contexte. Les auto-anticorps dirigés contre les RNP Ro humaines sont très caractéristiques des maladies du tissu conjonctif tel le lupus érythémateux disséminé, la polyarthrite rhumatoïde et le syndrome de Sjögren. Cependant nous ne connaissons pas encore la fonction cellulaire de ces RNP. Même si nos connaissances sur Ro60 et sur la protéine La s'accroissent, aucune recherche n'a pu mettre en relation l'action coordonnée des trois partenaires de la RNP Ro (Ro60, La et l'ARN hY) dans une seule et même fonction.

La récente découverte de RoBP1, un partenaire des RNP Ro^{hY5}, donne une lueur d'espoir quant à la possibilité d'associer une fonction cellulaire au complexe RNP Ro.

Dans le but d'approfondir nos connaissances sur RoBP1, nous avons donc voulu connaître les déterminants de sa localisation cellulaire. Nous avons fusionné l'ADNc de RoBP1 à celui de la GFP et transfecté des cellules de souris NIH 3T3 avec cet ADN recombinant. Nous avons ainsi déterminé que RoBP1 était une protéine nucléaire. Ce résultat est très intéressant car il a été démontré récemment que l'ARN hY5 était localisé préférentiellement au noyau de cellules HeLa et de cellules de souris NIH 3T3 alors que les autres ARN hY demeurent localisés dans le cytoplasme (Gendron et al., 2001). A la suite de ces études préliminaires, nous avons construit des mutants de délétion dans le but de

déterminer une région de la protéine RoBP1 qui serait responsable de la localisation nucléaire. Nous avons construit trois mutants de délétion en ciblant les trois domaines de reconnaissance de l'ARN, ie RRM1 à RRM3. Les résultats ont démontré que le premier motif de reconnaissance de l'ARN (RRM1) était responsable de la localisation nucléaire de la protéine recombinante. Il est toutefois impossible jusqu'à maintenant d'affirmer que l'ajout d'un marqueur GFP ou Ha affecte la fonction cellulaire de RoBP1. Cependant le fait que la protéine ralentisse la croissance cellulaire et qu'elle localise dans le noyau des cellules, supporte l'idée que la protéine demeure fonctionnelle lorsque fusionnée à la GFP.

Ces études ont également été très informatives car elles nous ont permis d'observer que RoBP1 pouvait jouer un rôle au niveau de la prolifération cellulaire. La croissance de cellules transfectées avec un plasmide dont un promoteur efficace, contrôle la transcription de RoBP1, était en effet particulièrement ralenti. Par contre, des cellules transfectées avec le même plasmide ne contenant pas l'ADNc de RoBP1 pouvaient croître au même rythme que la même lignée cellulaire non transfectée.

Parallèlement à ces recherches, nous avons tenté de produire un anticorps anti-RoBP1 en immunisant deux lapins avec un vaccin à ADN constitué d'un plasmide exprimant RoBP1. Nous voulions un sérum pouvant immunoprécipiter RoBP1 dans le but d'effectuer des études de co-immunoprécipitation afin d'identifier les partenaires de RoBP1. Malheureusement nous n'avons pu obtenir de réponse immunitaire satisfaisante de la part des lapins. RoBP1 est une protéine très conservée à travers l'évolution (95% d'homologie entre la protéine

humaine et celle du rat) et l'obtention d'un tel anticorps immunoprécipitant devient très difficile; c'était la troisième tentative infructueuse au laboratoire. Seul un anti-sérum reconnaissant RoBP1 en immunoblot a pu être obtenu (Elie Barbar, mémoire de maîtrise)

Le but d'identifier des partenaires protéiques et nucléiques de RoBP1 est d'associer une fonction à cette protéine. A partir du moment où une fonction pour RoBP1 est connue, il devient possible de mettre en place des expériences afin d'évaluer l'implication des RNP Ro dans ce contexte.

Au cours de ma maîtrise, deux autres groupes ont identifié une protéine ayant presque la même séquence nucléotidique que RoBP1. Dans le cadre d'études sur l'épissage de l'ARN, le groupe du Dr Philip Sharp a cloné PUF60, un facteur d'épissage non essentiel (Page-McCaw et al., 1999). Selon ces résultats, PUF60 agirait en conjonction avec p54, une protéine SR, afin de favoriser la liaison de U2AF au pré-ARNm. Il y a aussi les travaux du Dr David Levens qui ont permis d'identifier FIR comme facteur participant à la régulation transcriptionnelle du gène *c-myc* (Liu et al., 2000). Le rôle de FIR serait de réprimer l'activation de la transcription du gène en liant FBP et la perte de fonction de FBP entraîne un arrêt de la croissance cellulaire (He et al., 2000). Ces résultats ont permis de fournir une explication au ralentissement de croissance cellulaire que nous avons observé dans le cadre des études de localisation. Les travaux sur PUF60 et FIR nous ont permis d'élaborer des stratégies afin d'évaluer une fonction cellulaire pour les RNP Ro. Nous avons deux options : l'épissage ou la transcription.

Étant donné que FIR, PUF60 et RoBP1 diffèrent par la présence ou l'absence de deux séquences alternatives (A et B) à l'extrémité amino-terminale, nous

voulions nous assurer que l'interaction avec un appât fait de la protéine Ro60 et de l'ARN hY5 était toujours possible pour FIR et PUF60. Si la liaison avec l'une ou l'autre des protéines n'était pas possible, cela aurait pu orienter la suite des recherches et possiblement éliminer une fonction. Mais le résultat en RITA nous a suggéré que la liaison avec les deux nouvelles protéines était toujours possible et que de façon qualitative la force de l'interaction était très semblable. Nous avons finalement opté pour l'étude en épissage.

En collaboration avec le laboratoire du Dr Benoît Chabot, nous avons effectué des essais d'épissage *in vitro* suivis d'une immunoprécipitation avec un sérum anti-Ro60 afin d'évaluer l'interaction entre Ro60 et le pré-ARNm. Ces études de co-immunoprécipitation n'ont cependant pas permis de démontrer une interaction stable entre Ro60 et le pré-ARNm. Nous avons aussi utilisé des extraits nucléaires déplétés en Ro60. Ces extraits se sont avérés capables de réaliser efficacement l'épissage du pré-ARNm choisi. Malgré ces résultats négatifs, il n'est pas impossible que les RNP Ro jouent un rôle au niveau de l'épissage. Leur rôle peut être restreint à un petit nombre d'ARNm et celui que nous avons utilisé n'en ferait probablement pas partie. Également il se peut que l'interaction observée entre RoBP1 et la RNP Ro^{hY5} soit plutôt dans le cadre de la transcription de *c-myc* ou même dans le cadre d'une autre fonction encore inconnue aujourd'hui. Il ne faut pas oublier que les trois protéines, FIR/RoBP1/PUF60 sont quelque peu différentes à leur extrémité amino-terminale. Les recherches ont permis de trouver une fonction à FIR et PUF60, ce qui n'est pas le cas pour RoBP1. Il est en effet possible que les séquences

alternatives A et B pourraient avoir une implication importante quant aux rôles cellulaires de ces protéines.

La dernière partie de ce projet a consisté à utiliser le système ecdysone afin d'exprimer RoBP1, auquel nous avons fusionné un marqueur Ha dans le but de l'immunoprécipiter. Les résultats positifs sont encourageants et permettent d'orienter les recherches à venir. Nous possédons maintenant une lignée cellulaire EcR-293 qui exprime de façon contrôlée la protéine RoBP1. Cela permet de contourner les problèmes reliés au ralentissement de la croissance cellulaire lorsque la protéine est surexprimée tout en l'étudiant dans un contexte *in vivo*. Ainsi, nous pourrions effectuer des études de co-immunoprécipitation afin de confirmer l'interaction de Ro60 et de l'ARN hY5 avec RoBP1 que nous avons observée en RITA. Nous pourrions également identifier de nouveaux partenaires à RoBP1 et vérifier s'ils peuvent également lier FIR et PUF60. Il s'agirait pour cela de cloner les séquences nucléotidiques de ces deux protéines dans le vecteur pIND/Ha, le même vecteur que nous avons utilisé pour RoBP1, et de transférer des cellules EcR-293.

En plus de ces études de co-immunoprécipitation, il faudra évaluer le rôle des RNP Ro au niveau de la régulation transcriptionnelle de *c-myc*. Les premières études pourraient consister à vérifier l'interaction de Ro60 avec FBP ou XPB; deux partenaires de la protéine FIR. Il serait possible d'utiliser le double hybride en levure et les études de co-immunoprécipitation puisque nous possédons déjà plusieurs sérums pouvant reconnaître la protéine Ro60 native. Ces sérums proviennent de la banque de sérums de patients atteints de maladies du tissu conjonctif traités au Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke.

Le Dr Levens a semblé favorable à la possibilité d'utiliser la technologie qui lui a permis d'identifier FIR (Liu et al., 2000). Ainsi, dans une deuxième phase, nous pourrions évaluer le rôle des RNP Ro en effectuant des études de transcription *in vitro* et *in vivo* en utilisant des essais de chloramphénicol acetyl transferase (« CAT assays »).

La recherche de sérums anti-RoBP1 parmi des patients atteints de maladies auto-immunes est une autre avenue que la lignée cellulaire EcR-293 pourrait permettre. En effet, nous pourrions utiliser une colonne contenant des anti-Ha, afin de piéger la protéine Ha-RoBP1. Ainsi nous pourrions obtenir une protéine recombinante pure isolée à partir de cellules humaines. Cet antigène serait alors utilisé afin de tapisser une plaque ELISA et nous pourrions ainsi cribler plusieurs sérums autoimmuns pour la présence d'anti-RoBP1.

Les avancées importantes de ce projet ont permis de déterminer la localisation de RoBP1 en plus de permettre la mise sur pied d'un système d'étude de cette protéine. Présentement, des études en levure *S. cerevisiae* sont en cours afin d'identifier l'homologue fonctionnel de RoBP1. Un tel homologue pourrait s'avérer une percée majeure car la levure est un système « relativement simple » dans lequel il est possible d'effectuer des inactivations de gènes et où les recombinaisons homologues sont fréquentes. Les résultats de ces travaux de recherche pourraient également permettre de définir un nouveau rôle pour la protéine RoBP1/PUF60/FIR et ainsi ouvrir de nouveaux horizons quant à la fonction cellulaire des RNP Ro.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Gilles Boire qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a permis de mener à terme un projet de recherche très excitant. J'ai vraiment apprécié la latitude que l'on possède dans le laboratoire. Il y a aussi tous les membres du laboratoire avec qui j'ai passé deux belles années; Maryse Gendron, Francis Brière et Jim Boulanger. Je ne peux passer sous silence des stagiaires qui m'ont aidé dans mes recherches; Marie-France Lisée, Daniel Bellemare et Geneviève Laroche.

Je voudrais également remercier Léonid Volkov qui m'a enseigné l'utilisation du microscope confocal et qui m'a dépanné lorsque je ne voyais rien dans l'oculaire. Il y a aussi les membres du laboratoire du Dr Benoît Chabot, plus particulièrement Aline Simoneau et Stephen Hutchison qui m'ont permis de réaliser les essais d'épissage *in vitro* ainsi que tous les étudiants du Service de Rhumatologie.

Références

- Akkaraju, S., Canaan, K., Goodnow, C.C. (1997). Self-reactive B cells are not eliminated or inactivated by autoantigen expressed on thyroid epithelial cells. *J. Exp. Med.* **186**: 2005-2012.
- Albert, L.J., Inman, R.D. (1999) Molecular mimicry and autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* **341**: 2068-2074.
- Ali, N., Pruijn, G.J., Kenan, D.J., Keene, J.D., Siddiqui, A. (2000). Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J. Biol. Chem.* **275**: 27531-27540.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons inc.
- Avignan, M.I., Strober, B., Levens, D. (1990). A far upstream element stimulates *c-myc* expression in undifferentiated leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 18538-18545.
- Bachmann, M., Pfeifer, K., Schroder, H.C., Muller, W.E. (1990). Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell.* **60**: 85-93.
- Barbar, É. (1999). Mémoire de maîtrise. Université de Sherbrooke.
- Barker, C.F., Billingham, R.E. (1977). Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* **25**: 1-54.
- Bazar, L., Harris, V., Sunitha, I., Hartmann, D., Avignan, M. (1995). A transactivator of *c-myc* is coordinately regulated with the proto-oncogene during cellular growth. *Oncogene.* **10**: 2229-2238.
- Ben-Chetrit, E., Chan, E.K., Sullivan, K.F., Tan, E.M. (1988). A 52-kDa protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J. Exp. Med.* **167**: 1560-1571.
- Ben-Chetrit, E., Gandy, B.J., Tan, E.M., Sullivan, K.F. (1989). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J. Clin. Invest.* **83**: 1284-1292.
- Berglund, J.A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R., Rosbash, M. (1997). The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell.* **89**: 781-787.

Bernstein, R.M., Matthews, M.B. (1987). Autoantibodies to intracellular antigens, with particular reference to t-RNA and related proteins in myositis. *J. Rheumatol.* **14(Suppl. 13)**: 83-88.

Birney, E., Kumar, S., Krainer, A.R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5803-5816.

Blanchette, M., Chabot, B. (1999). Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J.* **18**: 1939-1952.

Boire, G., Craft, J. (1990). Human Ro ribonucleoprotein particles : Characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J. Clin. Invest.* **84**: 1182-1190.

Boire, G., Gendron, M., Monast, N., Bastin, B., Ménard, H-A. (1995). Purification of antigenically intact Ro ribonucleoproteins : biochemical and immunological evidence that the 52-kD protein is not a Ro protein. *Clin. Exp. Immunol.* **100**: 489-498.

Bouffard, P., Briere, F., Wellinger, R.J., Boire, G. (1999). Identification of ribonucleoprotein (RNP)-specific protein interactions using a yeast RNP interaction trap assay (RITA). *Biotechniques.* **27**: 790-796.

Bouffard, P., Barbar, E., Brière, F., Boire, G. (2000). Interaction cloning and characterization of RoBP1, a novel protein binding to human Ro ribonucleoproteins. *RNA.* **6**: 66-78.

Boulangier, J. (2000). Mémoire de Maîtrise. Université de Sherbrooke.

Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G., Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* **179**: 1317-1330.

Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., Lanzavecchia, A. (1999). Maturation, activation and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* **189**: 821-829.

Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J-L., Hafler, D.A., Weiner, H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* **265**: 1237-1240.

Chen, X., Quinn, A.M., Wolin, S.L. (2000). Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of *Deinococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* **14**: 777-782.

- Cole, M.D. (1986). The *myc* oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 361-384.
- Critchfield, J.M., Racke, M.K., Zuniga-Pflucker, J.C., Cannella, B., Raine, C.S., Goverman, J., Lenardo, M.J. (1994). T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* **263**: 1139-43.
- Delves, P.J., Roitt, I.M. (2000). The immune system. *N. Engl. J. Med.* **343**: 37-49.
- Deutscher, S.L., Harley, J.B., Keene, J.D. (1988). Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **85**: 9479-9483.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.***11**: 1475-1489.
- Duncan, R.D., Bazar, L., Michelotti, G., Tomonaga, T., Krutzsch, H., Avignan, M., Levens, D. (1994). A sequence-specific, single strand binding protein activates the far upstream of *c-myc* and defines a new DNA binding motif. *Genes Dev.* **8**: 465-480.
- Fabini, G., Raijmakers, R., Hayer, S., Fouraux, M.A., Pruijn, G.J., Steiner, G. (2001). The Heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins I and K interact with a subset of the Ro Ribonucleoprotein-associated Y RNAs in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**: 20711-20718.
- Falb, D., Briner, T.J., Sunshine, G.H., Bourque, C.R., Luqman, M., Geffer, M.L., Kamradt, T. (1996). Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur J. Immunol.* **26**: 130-135.
- Fan, H., Goodier, J.L., Chamberlain, J.R., Engelke, D.R., Maraia, R.J. (1998). 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3201-3211.
- Faragasan, S., Honjo, T. (2000). T-independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science.* **290**: 89-92.
- Fujinami, R.S., Oldstone, M.B. (1985). Amino acid homology between encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science.* **230**: 1043-1045.
- Ge, H., Manley, J.L. (1990). A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell.* **62**: 25-34.
- Gendron, M., Roberge, D., Boire, G. (2001). Heterogeneity of human Ro ribonucleoproteins (RNPS): nuclear retention of Ro RNPS containing the human hY5 RNA in human and mouse cells. *Clin. Exp. Immunol.* **125**: 162-168.

Goodier, J.L., Fan, H., Marais, R.J. (1997). A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5823-5832.

Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K., et al. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature.* **334**: 676-682.

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

Green, C.D., Long, K.S., Shi, H., Wolin, S.L. (1998). Binding of the 60 kDa Ro autoantigen to Y RNAs: Evidence for recognition in the major groove of a conserved helix. *RNA.* **4**: 750-765.

Grogan, J.L., Kramer, A., Nogai, A., Dong, L., Ohde, M., Schneider-Mergener, J., Kamradt, T. (1999). Crossreactivity of myelin basic protein-specific T cells with multiple microbial peptides: experimental autoimmune encephalomyelitis induction in TCR transgenic mice. *J. Immunol.* **163**: 3764-3770.

Guth, S., Valcarcel, J. (2000). Kinetic role for mammalian SF1/BBP in spliceosome assembly and function after polypyrimidine tract recognition by U2AF. *J. Biol. Chem.* **275**: 38059-38066.

He, L., Liu, J., Collins, I., Sanford, S., O'Connell, B., Benham, C.J., Levens, D. (2000). Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression. *EMBO J.* **19**: 1034-1044.

Hemmer, B., Vergelli, M., Gran, B., Ling, N., Conlon, P., Pinilla, C., Houghten, R., McFarland, H.F., Martin, R. Hemmer, B., Vergelli, M., Gran, B. (1998). Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology. *J. Immunol.* **160**: 3631-3636.

Hendrick, J.P., Wolin, S.L., Rinke, J., Lerner, M.R., Steitz, J.A. (1981). Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: Further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 1138-1149.

Holcik, M., Korneluk, R.G. (2000). Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 4648-4657.

Hooper, B., Whittingham, S., Matthews, J.D. (1972). Autoimmunity in a rural community. *Clin. Immunol.* **12**: 79-87.

Huhn, P., Pruijn, G.J.M., van Venrooij, W.J., Bachmann, M. (1997). Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme *Nucleic Acids Res.* **25**: 410-416.

Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C., Kamradt, T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* **165**: 6107-6115.

Itoh, Y., Reichlin, M. (1991). Ro/SSA antigen in human platelets. Different distributions of the isoforms of Ro/SS-A protein and the Ro/SS-A-binding RNA. *Arthritis Rheum.* **34**: 888-893.

Jahnke, U., Fisher, U.H., Alvord, E.C. Jr. (1985). Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science.* **229**: 282-284.

Janeway, C.A. Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today.* **13**: 11-16.

Kamradt, T., Soloway, P.D., Perkins, D.L., Geffer, M.L. (1991). Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *J. Immunol.* **147**: 3296-3302.

Kelekar, A., Saitta, M.R., Keene, J.D. (1994). Molecular composition of Ro small ribonucleoprotein complexes in human cells. Intracellular localization of the 60- and 52-kDa proteins. *J. Clin. Invest.* **93** : 1637-1644.

Kennedy, C.F., Kramer, A., Berget, S.M. (1998). A role for SRp54 during intron bridging of small introns with pyrimidine tracts upstream of the branch point. *Moll. Cell. Biol.* **18**: 5425-5435.

Korganow, A.S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelandra, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J.L., Benoist, C., Mathis, D. (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity.* **10**: 451-461.

Kouskoff, V., Lacaud, G., Nemazee, D. (2000). T cell-independent rescue of B lymphocytes from peripheral immune tolerance. *Science.* **287**: 2501-2503.

Kramer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:367-409.

Kramer, A., Utans, U. (1991). Three protein factors (SF1, SF3 and U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *EMBO J.* **10**: 1503-1509.

Krainer, A., Conway, G.C., Kozak, D. (1990). Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes. Dev.* **4**: 1158-1171.

Krumm, A., Hickey, L.B., Groudine, M. (1995). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. *Genes Dev.* **9**: 559-572.

Kurtzke, J.E. (1993) Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin. Microbial. Rev.* **6**: 382-427. [Erratum (1994) *Clin. Microbial. Rev.* **7**: 141.]

Labbé, J.C., Jannatipour, M., Rokeach, L.A. (1995). The *Caenorhabditis elegans* Rop-1 gene encodes the homolog of the human Ro60-KDa Ro autoantigen. *Gene.* **167**: 227-231.

Labbé, J.C., Hekimi, S., Rokeach, L.A. (1999). The levels of RoRNP-associated Y RNA are dependant upon the presence of RoP-1, the *Caenorhabditis elegans* ro60 protein. *Genetics.* **151**: 143-150.

Labbé, J.C., Burgess, J., Rokeach, L.A., Hekimi, S. (2000). ROP-1, an RNA quality-control pathway component, affects *Caenorhabditis elegans* dauer formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **97**: 13233-13238.

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

Lavenu, A., Pourin, S., Babinet, C., Morello, D. (1994). The *cis*-acting elements known to regulate *c-myc* expression *ex vivo* are not sufficient for correct transcription *in vivo*. *Oncogene.* **9**: 527-536.

Le Gouill, C., Parent, J-L., Rola-Pleszczynski, M., Stankova, J. (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal. Biochem.* **219**: 164.

Liu, J., He, L., Collins, I., Ge, H., Libutti, D., Li, J., Egly, J-M., Levens, D. (2000). The FBP interacting repressor targets TFIIH to inhibit activated transcription. *Mol. Cell.* **5**: 331-341.

Lopato, S., Mayeda, A., Krainer, A.R., Barta, A. (1996). Pre-mRNA splicing in plants: characterization of Ser/Arg splicing factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **93**: 3074-3079.

Lorenz, H-M., Herrmann, M., Winkler, T., Gaipf, U., Kalden, J.R. (2000). Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis.* **5**: 443-449.

MacKay, I.R. (1983). Natural autoantibodies to the fore- forbidden clones to the rear? *Immunol. Today.* **4**: 340-342.

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

Mamula, M.J., Silverman, E.D., Laxer, R.M., Bentur, L., Isacovics, B., Hardin, J.A. (1989b). Human monoclonal anti-La antibodies. The La protein resides on a subset of Ro particles. *J. Immunol.* **143**: 2923-2928.

Maraia, R.J., Kenan, D.J., Keene, J.D. (1994). Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 2147-2158.

Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., Turner, D.H. (1999). Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. *J. Mol. Biol.* **288**: 911-940.

Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C., Mathis, D. (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science.* **286**: 1732-1735.

Mautner, J., Behrends, U., Hortnagel, K., Brielmeier, M., Hammerschmidt, W., Strobl, L., Bornkamm, G.W., Polack, A. (1996). *c-myc* expression is activated by the immunoglobulin κ -enhancers from a distance of at least 30 kb but not by elements located within 50 kb of the unaltered *c-myc* locus *in vivo*. *Oncogene.* **12**: 1299-1307.

McCarty, G.A. (1986). Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. *Med. Clin. North Am.* **70**: 237-261.

McCauliffe, D.P., Zappi, E., Lieu, T.S., Michalak, M., Sontheimer, R.D., Capra, J.D. (1990). A human Ro/SS-A autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with onchocercal RAL-1 antigen and an aplasia "memory molecule". *J. Clin. Invest.* **86**: 332-335.

McLaren, R.S., Caruccio, N., Ross, J. (1997). Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3028-3036.

Meerovitch, K., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Lejbkowitz, F., Kenan, D.J., Chan, E.K., Agol, V.I., Keene, J.D., Sonenberg, N. (1993). La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J. Virol.* **67**: 3798-3807.

Merendino, L., Guth, S., Bilbao, D., Martinez, C., Valcarcel, J. (1999). Inhibition of *msl-2* splicing by *Sex-lethal* reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG. *Nature.* **402**: 838-841.

Mevorach, D., Zhou, J.L., Song, X., Elkon, K.B., (1998). Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J. Exp. Med.* **188**: 387-392.

- Michelotti, G.A., Michelotti, E.F., Pullner, A., Duncan, R.C., Eick, D., Levens, D. (1996). Multiple single-stranded *cis* elements are associated with activated chromatin of the human *c-myc* gene *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2656-2669.
- Miller, S.D., Vanderlugt, C.L., Begolka, W.S., Pao, W., Yauch, R.L., Neville, K.L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A., Kim, B.S. (1997). Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS auto-immunity via epitope spreading. *Nat. Med.* **3**: 1133-1136.
- Mysler, E., Bini, P., Drappa, J., Ramos, P., Friedman, S.M., Krammer, P.H., Elkon, K.B. (1994). The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **93**: 1029-1034.
- Naparstek, Y., Plotz, P.H. (1993). The role of auto-antibodies in auto-immune diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **11** : 79-104.
- Nelson, K.K., Green, M.R. (1989). Mammalian U2 snRNP has a sequence-specific RNA-binding activity. *Genes Dev.* **3**: 1562-1571.
- Nemazee, D. (2000). Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **18** : 19-51.
- Nemazee, D., Burki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature.* **337**: 562-566.
- O'Brien, C.A., Margelot, K., Wolin, S.L. (1993). Xenopus Ro ribonucleoproteins: Members of an evolutionarily conserved class of cytoplasmic ribonucleoproteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **90**: 7250-7254.
- O'Brien, C.A., Wolin, S.L. (1994). A possible role for the 60-kDa Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes and Dev.* **8**: 2891-2903.
- Oldstone, M.B. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell.* **50**: 819-820.
- Olivares-Villagomez, D., Wang, Y., Lafaille, J.J. (1998). Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **188**: 1883-1894.
- Page-McCaw, P.S., Amonlirdviman, K., Sharp, P.A. (1999). PUF60: a novel U2AF65-related splicing factor. *RNA.* **5**: 1548-1560.
- Pannone, B.K., Do Kim, S., Noe, D.A., Wolin, S.L. (2001). Multiple Functional Interactions Between Components of the Lsm2-Lsm8 Complex, U6 snRNA, and the Yeast La Protein. *Genetics.* **158**: 187-196.

- Peek, R., Pruijn, G.J., van der Kemp, A.J., van Venrooij, W.J. (1993). Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *J. Cell. Sci.* **106**: 929-935.
- Pellizoni, L., Cardinali, B., Linmarq, N., Mercanti, D., Pierandrei-Amaldi, P. (1996). A *Xenopus laevis* homolog of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs in vitro: Implication of a protein factor in complex formation. *J. Mol. Biol.* **259**: 904-915.
- Pellizoni, L., Lotti, F., Rutjes, S.A., Pierandrei-Amaldi, P. (1998). Involvement of the *Xenopus laevis* Ro60 autoantigen in the alternative interaction of La and CNBP proteins with the 5' UTR of L4 ribosomal protein mRNA. *J. Mol. Biol.* **261**: 593-608.
- Perron, H., Garson, J.A., Bedin, F. (1997). Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **94**: 7583-7588.
- Prujn, G.J., Simons, F.H., van Venrooij, W.J. (1997). Intracellular localization and nucleocytoplasmic transport of Ro RNP components. *Eur. J. Cell. Biol.* **74** : 123-132.
- Rader, M.D., O'brien, C., Liu, Y.S., Harley, J.B., Reichlin, M. (1989). Heterogeneity of the Ro/SSA antigen. Different molecular forms in lymphocytes and and red blood cells. *J. Clin. Invest.* **83**: 1293-1298.
- Rathmell, J.C., Townsend, S.E., Xu, J.C., Flavell, R.A., Goodnow, C.C. (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual role for CD40- and Fas(CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell.* **87**: 319-329.
- Rokeach, L.A., Haselby, J.A., Meilof, J.F. Smeenk, R.J. Unnasch, T.R., Greene, B.M., Hoch, S.O. (1991). Characterization of the autoantigen calreticulin. *J. Immunol.* **147**: 3031-3039.
- Rosen, A Casciola-Rosen, L.A., Ahearn, J. (1995). Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J. Exp. Med.* **181**: 1557-1561.
- Salinovich, O., Montelaro, R.C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**: 341-347.
- Seddon, B., Mason, D. (1999). Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor β and interleukin-4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4+CD45RC-cells and CD4+CD8- thymocytes. *J. Exp. Med.* **189**: 279-288.

- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **93**: 8496-8501.
- Schiestl, R.H., Gietz, R.D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**: 339-346.
- Sherman, F., Fink, G., Lawrence, C. (1987). *Methods in yeast.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Shi, H., O'Brien, C.A., Van, H.D., Wolin, S.L. (1996). A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *RNA.* **2**: 769-784.
- Slobbe, R.L., Pluk, W., van Venrooij, W.J., Pruijn, G.J. (1992). Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* **227**: 361-366.
- Southern, E. (1979). Gel electrophoresis of restriction fragments. *Meth. Enzymol.* **68**: 152-176.
- Spencer, C.A., Groudine, M. (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res.* **56**: 1-48.
- Stefano, J.E. (1984). Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell.* **36**: 145-154.
- Stockinger, B. (1999). T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv. Immunol.* **71**: 229-265.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+) CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**: 303-310.
- Tan, E.M., Chan, E.K., Sullivan, K.F., Rubin, R.L. (1988). Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward understanding systemic autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **47**: 121-141.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* **302**: 575-581.
- Tough, D.E., Sun, S., Sprent, J. (1997). T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J. Exp. Med.* **185**: 2089-2094.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354.

Transy, C., Legrain, P. (1995). The two-hybrid: an in vivo protein-protein interaction assay. *Mol. Biol. Rep.* **21**: 119-127.

Valcarcel, J., Gaur, R.K., Singh, R., Green, M.R. (1996). Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA [corrected]. *Science.* **273**: 1706-1709.

Van de Keere, F., Tonegawa, S. (1998). CD4(+) T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* **188**: 1875-1882.

Van Horn, D.J., Eisenberg, D., O'Brien, C.A., Wolin, S.L. (1995). *Caenorhabditis elegans* embryos contain only one major species of Ro RNP. *RNA.* **1**: 293-303.

Van Horn, D.J., Yoo, C.J., Xue, D., Shi, H., Wolin, S.L. (1997). The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: A conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. *RNA.* **3**: 1434-1443.

Wang, D., Buyon, J.P., Zhu, W., Chan, E.K. (1999). Defining a novel 75-kDa phosphoprotein associated with SS-A/Ro and identification of distinct human autoantibodies. *J. Clin. Invest.* **104**:1265-1275.

Wang, Z., Hoffman, H.M., Grabowski, P.J. (1995). Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity. *RNA.* **1**: 21-35.

Watson, M.L., Rao, J.K., Gilkeson, G.S., Ruiz, P., Eicher, E.M., Pisetsky, D.S., Matsuzawa, A., Rochelle, J.M., Seldin, M.F. (1992) Genetic analysis of MRI-lpr mice: Relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. *J. Exp. Med.* **176**: 1645-1656.

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

Wu, J., Manley, J.L. (1989). Mammalian pre-mRNA branch site selection by U2 snRNP involves base pairing. *Genes Dev.* **3**: 1553-1561.

Wu, S., Romfo, C.M., Nilsen, T.W., Green, M.R. (1999). Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature.* **402**: 832-835.

Xiao, Q., Sharp, T.V., Jeffrey, I.W., James, M.C., Pruijn, G.J., van Venrooij, W.J., Clemens, M.J. (1994). The La antigen inhibits the activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by sequestering and unwinding double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2512-2518.

Xue, D., Rubinson, D.A., Pannone, B.K., Yoo, C.J., Wolin, S.L. (2000). U snRNP assembly in yeast involves the La protein. *EMBO J.* **19**: 1650-1660.

Yamada, M., Murata, T., Hirose, S., Lavorgna, G., Suzuki, E., Ueda, H. (2000). Temporally restricted expression of transcription factor betaFTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development.* **127**: 5083-5092.

Zamore, P.D., Green, M.R. (1989). Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **86**: 9243-9247.

Zamore, P.D., Patton, J.G., Green, M.R. (1992). Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. *Nature.* **355**: 609-614.

Zhang, W.-J., Wu, J.Y. (1996). Functional properties of p54, a novel SR protein active in constitutive and alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5400-5408.

Zhuang, Y., Weiner, A.M. (1989). A compensatory base change in human U2 snRNA can suppress a branch site mutation. *Genes Dev.* **3**: 1545-1552.

Zuker, M., Mathews, D.H., Turner, D.H. (1999). Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. *RNA Biochemistry and Biotechnology.* 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers