

Université de Montréal

Expression et purification de la protéine
centromérique B (CENP-B)

par

Mélanie Arbour

Programme de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences biomédicales

Octobre, 2001

© Mélanie Arbour, 2001



W
4
U58
2002
v.041

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Expression et purification de la protéine
centromérique B (CENP-B)

présenté par :

Mélanie Arbour

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

John Di Battista, Ph.D.
président-rapporteur

Yves Raymond, Ph.D.
directeur de recherche

Jean-Luc Senécal, M.D.
codirecteur

Pierre Belhumeur, Ph.D.
membre du jury

SOMMAIRE

La sclérodermie est une maladie auto-immune systémique caractérisée par la présence d'auto-anticorps dirigés contre des protéines nucléaires. L'une d'elles est la protéine centromérique B. La purification de cette protéine s'avère importante pour diagnostiquer la forme limitée de la sclérodermie et purifier les auto-anticorps anti-CENP-B.

Dans cette étude, CENP-B fut purifiée sous sa forme complète, fusionnée à dix résidus histidine. Les bactéries exprimaient CENP-B grâce à un protocole d'expression des protéines toxiques. CENP-B fut purifiée par affinité à l'aide d'une résine d'agarose couplée au nickel. Les éluats furent utilisés pour une purification par électro-élution ou par élution chimique à partir d'une bande sur nitrocellulose.

De cette façon, CENP-B fut obtenue sous sa forme complète et pure. La technique devra être optimisée pour une production à grande échelle. Ainsi, des tests ELISA pourront être effectués afin de confirmer le diagnostic de sclérodermie limitée et les anti-CENP-B pourront être purifiés et étudiés.

Mots clés :

auto-immunité; maladie auto-immune; sclérose systémique;
sclérodermie; auto-anticorps; protéine toxique; *Escherichia coli*.

Scleroderma (systemic sclerosis) is a systemic autoimmune disease characterized by the presence of autoantibodies directed against nuclear proteins. One of these is the centromeric protein B. The purification of this protein could prove useful in the diagnosis of the limited form of scleroderma, and also to purify anti-CENP-B autoantibodies.

In this study, CENP-B was purified in its full length, fused to ten histidine residues. CENP-B was expressed in bacteria using a protocol developed for toxic proteins. CENP-B was purified by affinity chromatography using an agarose resin coupled with nickel. The eluates were used for purification by electro-elution or chemical elution from bands on nitrocellulose.

In this way, CENP-B was obtained in its complete and pure form. The technique will have to be optimized for production of CENP-B on a large scale. Hence, ELISA will be carried out in order to confirm the diagnosis of limited scleroderma and anti-CENP-B antibodies will be purified and studied.

Key words:

autoimmunity; auto-immune disease; systemic sclerosis;
scleroderma; autoantibody; toxic protein; *Escherichia coli*.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIERES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABREVIATIONS	xiii
REMERCIEMENTS	xvi
INTRODUCTION	1
1. Les maladies auto-immunes	2
2. La sclérodermie (sclérose systémique)	2
2.1 Aspects cliniques	3
2.2 Auto-anticorps	4
2.3 Épidémiologie	8
2.4 Pathogénèse des auto-anticorps	13
3. La protéine centromérique B (CENP-B)	18
3.1 Le complexe centromère-kinétochore	19
3.2 Structure et fonctions de CENP-B	20
3.3 Expression et purification de CENP-B	23
3.3.1 <i>Transcription et traduction in vitro</i>	23
3.3.2 <i>Purification à partir des cellules humaines</i>	24
3.3.3 <i>Purification à partir de cellules d'insecte infectées par un baculovirus</i>	24

3.3.4 Purification à partir d' <i>Escherichia coli</i>	25
MATERIELS ET METHODES	28
1. Clonage de l'ADNc de CENP-B chez <i>E. coli</i>	29
1.1 Transfert de l'ADNc de CENP-B dans le vecteur pET11a	29
1.2 Transfert de l'ADNc de CENP-B dans le vecteur pET19b	32
2. Induction de l'expression de CENP-B	33
2.1 Protocole standard	33
2.2 Protocole pour l'expression de protéines toxiques	34
3. Extraction des protéines à partir de la culture bactérienne	35
4. Purification par affinité de CENP-B	36
4.1 Éluion avec imidazole	36
4.2 Éluion avec L-histidine	37
5. Éluion chimique à partir de la nitrocellulose	38
6. Électro-éluion	39
7. Protocoles courants	41
7.1 Gels d'agarose	41
7.2. Gels de polyacrylamide	41
7.3 Coloration au bleu de Coomassie	42
7.4 Immunobuvardage	43
8. Milieux de culture	44

8.1 Milieu de culture LB	44
8.2 Milieu de culture M9ZB	44
RESULTATS	46
1. Clonage de l'ADNc de CENP-B chez <i>E. coli</i>	47
2. Expression de CENP-B chez <i>E. coli</i>	49
3. Purification de CENP-B par colonne d'affinité	53
4. Éluion chimique à partir de la nitrocellulose	58
5. Électro-éluion	60
DISCUSSION	62
1. Expression de CENP-B chez <i>E. coli</i>	63
2. Purification de CENP-B	66
3. Tests diagnostics (ELISA)	69
4. Purification des auto-anticorps	72
CONCLUSION	74
REFERENCES	77
ANNEXES	xvii

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	Auto-anticorps associés à la sclérodermie	6
TABLEAU II	Études internationales sur la prévalence, l'incidence et la distribution selon le sexe	10
TABLEAU III	Différences dans l'expression des anticorps et dans le sous-type de maladie selon l'origine ethnique	12
TABLEAU IV	Détails des différentes méthodes d'expression de CENP-B chez <i>E. coli</i>	26
TABLEAU V	Comparaison entre les différents ELISA anti-CENP-B	71

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1	Distribution des patients en fonction des trois types d'auto-anticorps majeurs et du degré de l'atteinte tégumentaire	7
FIGURE 2	Localisation et structure de CENP-B	21
FIGURE 3	Résultats des différentes digestions et ligation permettant le clonage de l'ADNc de CENP-B chez <i>E. coli</i>	48
FIGURE 4	Schéma simplifié du protocole d'induction de l'expression de CENP-B	51
FIGURE 5	Comparaison du protocole standard et du protocole pour protéines toxiques quant à l'expression de CENP-B chez <i>E. coli</i>	52
FIGURE 6	Résultats de la purification par affinité de CENP-B (bleu de Coomassie)	54
FIGURE 7	Résultats de la purification par affinité de CENP-B (immunobuvardage)	56
FIGURE 8	Résultats de la purification par élution chimique à partir de la nitrocellulose	59
FIGURE 9	Résultats de la purification par électro-élution	61

LISTE DES ABREVIATIONS

aa :	acide aminé
ACA :	anticentromère
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
Alu ARN-protéine :	protéine Alu de liaison à l'ARN
ARNm :	acide ribonucléique de type messenger
ARNt :	ARN de transfert
ARN-pol :	polymérase d'ARN
β -gal :	β -galactosidase
CENP-B :	protéine centromérique B
CREST :	calcinose, syndrome de Raynaud, atteinte de l'oesophage, sclérodactylie, télangiectasie
DO :	densité optique
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA :	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
g :	gramme
GST :	glutathione-S-transférase
HMG-17 :	protéine chromosomale non-histone
hnRNP :	ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène
HPLC :	<i>high performance liquid chromatography</i>
HUVEC :	souche de cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale
ICE :	enzyme de conversion de l'interleukine 1 β
IgG :	immunoglobuline G
IPTG :	isopropyl-1-thio- β -galactopyranoside

kb :	kilobase
kD :	kilo Dalton
Ku :	auto-antigène de la thyroïde de 70 kD
LB :	Luria-Bertani
M :	molaire
mA :	milli-ampère
mACA1 :	anticorps monoclonal de souris spécifique à CENP-B
mk :	marqueur
MeCN :	acétonitrile
mg :	milligramme
ml :	millilitre
mm ² :	millimètre carré
mM :	millimolaire
NAG-2 :	tétraspán (protéine transmembranaire)
ng :	nanogramme
NK :	cellules <i>natural killer</i>
nm :	nanomètre
PMSF :	phénylméthylsulfonyl fluoride
Scl :	sclérodémie (sclérose systémique)
Scl-70 :	ADN topoisomérase I
SDS :	sodium dodécylsulfate
TEMED :	N,N,N',N'-Tétraméthylethylènediamine
TrpE :	anthranilate synthase
U :	unité
U1-nRNP :	ribonucléoprotéine U1 nucléaire
U3-RNP :	ribonucléoprotéine U3
µg :	microgramme
µl :	microlitre

UL-94 : protéine UL94 du cytomégalovirus

V : volt

W : watt

Wa : protéine associée à l'ARNt

7-2 RNP : ribonucléoprotéines 7-2

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mélanie Dieudé, Nathalie Brassard, Julie Guillemette, Marie-Josée Dicaire, Isabelle Clément et Monique Bernard pour leur soutien technique et surtout psychologique tout au long de ces deux dernières années.

De plus, je souhaite remercier mes parents et ma famille ainsi qu'Isabelle Ducharme pour leurs encouragements et leur soutien.

Enfin, je remercie D^{rs} Jean-Luc Senécal et Yves Raymond de m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Finalement, je voudrais remercier Phil et Matisse, ainsi que Félix et Pitchou pour leur contribution à ma bonne humeur lors de la rédaction de ce mémoire.

INTRODUCTION

1. Les maladies auto-immunes

La tolérance immunologique est une propriété fondamentale du système immunitaire qui implique des mécanismes de reconnaissance du soi et du non-soi¹. Lorsque cette tolérance est brisée, des cellules autoréactives ne sont pas déléetées et sont retrouvées dans la circulation, ce qui peut initier une réaction auto-immune. Les maladies auto-immunes systémiques sont un groupe hétérogène de maladies génétiquement complexes, où le système immunitaire cible un ensemble hautement spécifique mais varié d'auto-antigènes intracellulaires².

2. La sclérodermie (sclérose systémique)

La sclérodermie est une maladie auto-immune d'origine inconnue, impliquant plusieurs tissus, caractérisée par une fibrose cutanée et viscérale, une production d'auto-anticorps, des changements importants au niveau de la microvasculature, avec des dommages aux cellules endothéliales et une prolifération subendothéliale des tissus³. On la divise en deux

principaux groupes : la sclérodémie localisée ou morphée et la sclérose systémique, souvent désignée simplement sous le nom de sclérodémie. On peut distinguer cinq formes de sclérodémie localisée : en plaques, généralisée, bulleuse, linéaire et profonde. La sclérose systémique comprend les formes limitée et diffuse⁴. La forme limitée est aussi nommée « syndrome CREST », qui est caractérisé par une calcinose, un phénomène de Raynaud, une atteinte œsophagienne, de la sclérodactylie et des télangiectasies⁵⁻⁷. La maladie systémique sera plus abondamment décrite dans les sections suivantes.

2.1. *Aspects cliniques*

La sclérodémie limitée est définie par une atteinte tégumentaire se confinant aux extrémités des membres, jusqu'aux genoux et coudes, alors que la forme diffuse dépasse ces régions. Différents critères établis par l'*American College of Rheumatology* en 1980 permettent de classifier la sclérodémie systémique⁴. Le critère majeur est la présence d'un épaissement de la peau proximale aux articulations métacarpophalangiennes (aux mains) et/ou

proximalement aux articulations métatarsophalangiennes (aux pieds). Une sclérodermie est diagnostiquée si ce critère majeur est présent. Les critères mineurs sont : la sclérodactylie, les cicatrices digitales ou perte de pulpe au bout des doigts, et la fibrose pulmonaire basale. Si un patient présente au moins deux des critères mineurs, il est aussi considéré comme sclérodermique. Une révision de ces critères fut récemment proposée pour permettre un meilleur diagnostic de la forme limitée de la maladie⁸. En combinant les critères déjà établis à un test de capillaroscopie et une détection des anticentromère, la sensibilité du diagnostic passait de 33,8 % à 91,5 %.

Outre l'atteinte tégumentaire, la sclérodermie touche plusieurs systèmes organiques, ce qui explique sa complexité et le fait que chaque patient développe une maladie unique.

2.2. Auto-anticorps

La grande particularité des maladies auto-immunes est la production d'anticorps dirigés contre des protéines du soi⁹. Les

auto-antigènes peuvent se situer à la surface de la cellule mais aussi au niveau intracellulaire et même intranucléaire^{10;11}. Les auto-anticorps sont présents chez plus de 95% à 98% des patients sclérodermiques^{12;13}. Plusieurs auto-antigènes sont impliqués dans la sclérodermie (Tableau I). Les auto-anticorps dirigés contre ces auto-antigènes ne se retrouvent pas chez tous les patients sclérodermiques mais leur distribution tend à former des sous-groupes mutuellement exclusifs^{14;15}. En particulier, les trois auto-anticorps les plus fréquents se retrouvent dans des groupes de patients très distincts (Figure 1). Dans la littérature on note, entre 1980 et 1998, 25 cas de double positivité, c'est-à-dire des patients possédant des anticentromère et des anti-ADN topoisomérase I¹⁶. Ces patients présentent une forme différente de la maladie quant à aux atteintes tégumentaire et viscérale, comparée aux formes diffuse et limitée caractérisées respectivement par la présence des anti-ADN topoisomérase I et anti-centromère, ce qui pourrait constituer un nouvelle forme de sclérodermie.

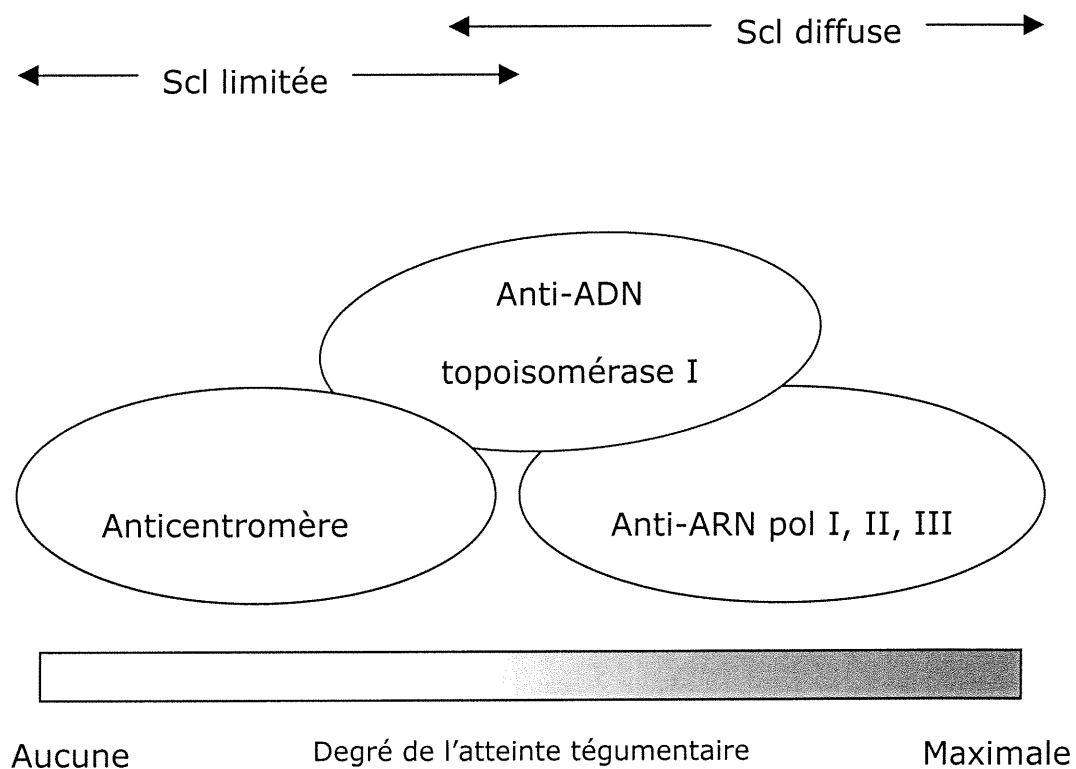
Les auto-anticorps dirigés contre ces trois auto-antigènes, l'ADN topoisomérase I, la protéine centromérique B et le

Tableau I. Auto-anticorps associés à la sclérodermie

Auto-antigènes	Prévalence	Poids moléculaire (kD)
Centromère	57-82% CREST	15-16/80/120
CENP-A, B et C	25% Raynaud primaire 8% Scl diffuse	
ADN	20-59% des Scl	95-100
topoisomérase I	70-76% Scl diffuse 13% CREST	
PM-Scl	2-5% des Scl	75/100
Fibrillarine (U3-RNP)	6-8% des Scl 5% Scl diffuse 10% CREST	34
ARN-Pol I	4-20% des Scl 13% Scl diffuse	Complexe de 11 à 210
ARN-Pol II	4% des Scl	140-145/200-220/220-240
ARN-Pol III	23% des Scl 6% Scl limitée 45% Scl diffuse	80/135/160
U1-nRNP	2-5% des Scl	22/33/70
HMG-17	CREST	9-17
Ku	1-14% des Scl	60-70/80-86
Th/To (7-2 RNP)	4-10% des Scl 8-19% Scl limitée 1-11% Scl diffuse	40
NOR-90	rare	89/93
Alu RNA-protéine	rare	68
Wa	3% des Scl	48

Adapté de von Mühlen C.A. Sem. Arthritis. Rheum. 24(5) : 323-358 (1995)¹⁷

Figure 1. Distribution des patients en fonction des trois types d'auto-anticorps majeurs et du degré de l'atteinte tégumentaire.



Adapté de Okano Y. Rheum Dis Clin North America 22 : 709-735 (1996)¹⁸

groupe des ARN polymérases (en particulier l'ARN polymérase III) se retrouvent respectivement chez 22, 25 et 23% des patients sclérodermiques¹².

Plusieurs études ont tenté d'établir une corrélation entre le titre d'auto-anticorps sériques et les manifestations cliniques¹⁹⁻²¹. Ces études n'ont pas permis d'établir une relation claire entre l'évolution de la maladie et le taux d'auto-anticorps sériques. Par contre, certaines associations entre la présence de ces anticorps et un symptôme particulier ont clairement été établies^{7;22-26}. Par exemple, la présence d'anti-ADN topoisomérase I serait un facteur qui augmenterait le risque de fibrose pulmonaire^{27;28}. Des études plus poussées devront être effectuées afin de mieux comprendre le rôle exact de ces auto-anticorps dans la physiopathologie de la sclérodermie.

2.3. Épidémiologie

La sclérodermie est une maladie dont l'apparition et l'évolution peuvent être influencées par le sexe, l'âge, la race et le bagage génétique. Aux États-Unis, l'incidence de la

maladie chez les adultes est approximativement de 17 nouveaux cas par million d'habitants²⁹ (Tableau II). Cette incidence est plus élevée qu'en Europe ou dans certaines régions du Pacifique, par exemple au Japon, suggérant l'implication de facteurs environnementaux. La prévalence de la maladie varie selon les études de 30 à 240 cas par million d'habitants^{4;30}.

Les taux de survie moyens, cinq et douze ans après le diagnostic, seraient respectivement de 60 et 30%³⁰. Le taux de mortalité est fortement influencé par les atteintes cardiaque, rénale, pulmonaire et, indirectement, gastro-intestinale et se chiffre annuellement de 1 à 3/million aux États-Unis³⁰. La mortalité due aux crises rénales a considérablement diminué depuis 1981 grâce à l'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine pour contrôler la crise rénale, qui cause une hypertension artérielle grave²⁹.

Comme le tableau II le démontre, la Scl se retrouve plus fréquemment chez les femmes que chez les hommes, avec un

Tableau II. Études internationales sur la prévalence, l'incidence et la distribution selon le sexe.

Période d'étude	Prévalence (par million)	Incidence (par million)	Ratio Femme:Homme
1947-1952	4	0.6	
1947-1968	-	2.7	3:1
1953-1958	7	1.5	
1958-1962	21	4.1	
1961-1969	-	7	
1963-1968	28	4.5	
1963-1972	-	10	
1963-1972	-	14.1	3:1
1968	105	1.2	
1950-1973	-	2.3	
1950-1979	253	13	8:1
1970-1979	-	6.3	
1977-1979	126	-	
1973-1982	-	19.1	
1980-1981	100	-	
1980-1985	-	3.7	5.5:1
1985	286	-	
1986	30.8	3.7	
1989-1991	242	18.7	5:1

Adapté de Mayes MD. Rheum Dis Clin North Am 22 : 751-764 (1996)²⁹ et Silman AJ. J Rheumatol 24 (Suppl 48) : 58-61 (1997)³⁰

Prévalence : nombre total de cas par million d'habitants

Incidence : nombre de nouveaux cas par million d'habitants par année

ratio de 5:1. Le ratio est plus important dans le cas de femmes en période féconde (3,8 :1) que chez les plus âgées (2,4 :1)³¹. Ces résultats indiquent que le milieu hormonal ou des évènements reliés à la grossesse augmentent la susceptibilité à la maladie. Il a récemment été démontré que des cellules fœtales se retrouvaient dans la circulation maternelle plusieurs années après la grossesse³²⁻³⁴, plus particulièrement aux sites de lésions³. Ce microchimérisme pourrait agir comme déclencheur de la réponse du système immunitaire suite à un stimulus extérieur³⁵.

La proportion de Scl diffuse et limitée ainsi que la présence des anticorps anticentromère (ACA) ou anti-ADN topoisomérase I (anti-Scl 70) est fortement influencée par l'origine ethnique du patient. Dans la population noire et chez les Amérindiens Choctaw, on retrouve un plus haut taux de Scl diffuse que dans la population blanche (Tableau III). Ces derniers ont une tendance plus forte à développer une Scl de type limitée et à posséder des ACA²⁹. De plus, l'âge au moment du diagnostic est plus bas chez les femmes et les hommes de race noire peu importe le type de Scl³¹.

**Tableau III. Différences dans l'expression des anticorps
et dans le sous-type de maladie selon l'origine ethnique.**

Groupes ethniques	Sous-types de Scl (%)		Expression des anticorps (%)	
	Limitée	Diffuse	ACA	Anti-Scl 70
Thais	0	100	2	76
Blancs australiens	85	15	51	26
Noirs Américains	30	70	4-14	18,4-37
Blancs Américains	69	31	35	17-18,6
Choctaw	8	92	-	83
Italiens	90	10	-	-

Adapté de Mayes MD. Rheum Dis Clin North Am 22 : 51-764 (1996)²⁹

Enfin, l'étude de familles et de couples de jumeaux montre que les facteurs génétiques jouent un rôle dans la tendance à produire des auto-anticorps, mais que le facteur majeur du développement de la maladie implique un élément environnemental de nature inconnue³⁶⁻⁴⁰.

2.4. Pathogénèse des auto-anticorps

Une grande proportion des auto-antigènes impliqués dans la sclérose systémique se retrouvent dans le compartiment nucléaire des cellules. Comme ces antigènes ne sont pas normalement accessibles au système immunitaire, un processus particulier, encore inconnu, serait à l'origine de leur présentation aux cellules immunitaires.

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme essentiel pour éliminer sélectivement des cellules déficientes et pour contrôler le nombre total de cellules^{41;42}. Contrairement à la nécrose, l'apoptose est caractérisée par une série d'événements parfaitement orchestrés tels la contraction de la cellule, le bourgeonnement (*blebbing*) de la membrane

cytoplasmique, la condensation et la segmentation de l'ADN^{43;44}. L'apoptose est très étudiée dans le contexte de l'auto-immunité, en particulier en relation avec le lupus érythémateux systémique^{2;45-47}.

Depuis peu, certains auteurs se sont penchés sur le rôle de l'apoptose dans la pathogénèse des auto-anticorps dirigés contre des antigènes intracellulaires impliqués dans la sclérodermie. Une des hypothèses serait que des auto-anticorps dirigés contre des antigènes de surface cellulaire induiraient l'apoptose des cellules endothéliales, provoquant la libération des auto-antigènes intracellulaires. Une étude a démontré que des auto-anticorps, retrouvés dans 93% des sérums testés (n = 90) seraient capables d'induire l'apoptose des cellules endothéliales (HUVEC) en interagissant avec le complexe transmembranaire intégrine-NAG-2⁴⁸. Ces auto-anticorps ont reconnu, en plus de la protéine de surface cellulaire NAG-2, une protéine du cytomégalovirus, la protéine tardive UL94. La séquence peptidique homologue de ces deux antigènes se retrouve aussi chez différents auto-antigènes, tels la fibrillarine et la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène

(hnRNP). Une autre étude a démontré que l'apoptose des cellules endothéliales serait induite par des anticorps anticellules endothéliales, via le récepteur Fas et FasL, avec la collaboration des cellules NK (*natural killer*) activées⁴⁹.

Les études sur l'apoptose dans la sclérodermie ont mis à jour un paradoxe qui complique la compréhension du mécanisme de pathogénèse. D'une part, le taux d'apoptose est élevé et des auto-anticorps réagissent avec des antigènes modifiés par l'apoptose, d'autre part, des protéines anti-apoptotiques ont un taux élevé dans le sérum de patients sclérodermiques⁵⁰. Ainsi, plusieurs études devront être menées pour élucider le rôle exact de l'apoptose dans la pathogénèse de la sclérodermie.

L'apoptose, un phénomène physiologique naturel, ne peut expliquer à elle seule la présence des auto-anticorps. Ce mécanisme permettrait la présentation des auto-antigènes au système immunitaire mais ce serait la nature même de l'antigène qui provoquerait la production des auto-anticorps. Comme la dominance des épitopes est influencée par la

structure de la protéine, des circonstances qui changeraient le contexte moléculaire des épitopes pourraient permettre la présentation efficace de déterminants cryptiques, brisant la tolérance des cellules du système immunitaire⁵¹. Les différents épitopes retrouvés sur un antigène ne possèdent pas la même immunogénicité et des épitopes dits dominants sont plus efficacement présentés que des épitopes dits cryptiques⁵². Par contre, suite à un clivage⁵³ ou à une altération de la présentation de l'antigène⁵⁴, des épitopes cryptiques peuvent être révélés et présentés au système immunitaire comme étant des épitopes étrangers². Il a déjà été démontré que des auto-antigènes impliqués dans le lupus érythémateux systémique servaient de substrats aux enzymes de la famille ICE (*interleukin 1 β converting enzyme*) durant l'apoptose, révélant des épitopes cryptiques⁵⁵. Par contre, les auto-antigènes de la sclérodermie ne sont pas des substrats pour cette famille d'enzymes. Une sérine protéase trouvée dans les granules des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK, le granzyme B, joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose⁵⁶. Il a été démontré que cette enzyme avait la capacité de cliver de façon

spécifique plusieurs auto-antigènes, dont la protéine Scl-70 et, faiblement, CENP-B⁵⁷.

Une autre étude a démontré que des auto-antigènes de la sclérodermie pouvaient être fragmentés par une réaction d'oxydation catalysée par un métal (fer ou cuivre)⁵¹. Une atteinte des cellules endothéliales associée à une reperfusion des tissus ischémiques résulterait en une production de radicaux libres. Ceux-ci en présence de métaux, provoqueraient le clivage des protéines antigéniques au niveau de sites hautement spécifiques révélant ainsi des épitopes cryptiques.

Un autre processus a été décrit permettant d'expliquer la présentation des auto-antigènes nucléaires au système immunitaire. Ce mécanisme appelé ectocytose, serait responsable du relâchement des protéines ne contenant pas le signal peptidique qui permet la sécrétion par exocytose⁵⁸. Il a été démontré que, suite au relâchement d'une tension exercée par une matrice de collagène, des fibroblastes ont une activité accrue d'ectocytose et que des auto-antigènes tels l'ADN

topoisomérase I se retrouvent dans une vésicule qui est relâchée dans le milieu⁵⁹.

Enfin, une des hypothèses visant à expliquer la pathogénèse médiée par les auto-anticorps est le mimétisme moléculaire. Selon cette hypothèse, un hôte susceptible contracterait une infection par un agent possédant des antigènes immunologiquement similaires aux antigènes de l'hôte mais qui seraient suffisamment différents pour déclencher la réponse immunitaire lorsque présentés aux lymphocytes T. Ceci résulterait en un bris de la tolérance aux auto-antigènes, déclenchant une réponse auto-immune⁶⁰.

3. La protéine centromérique B (CENP-B)

La structure et la fonction du centromère ont été, et sont encore, largement étudiées par des chercheurs de trois disciplines différentes : les biologistes, les généticiens et les rhumatologues⁶¹. Malgré leurs efforts, la cause de la relation entre les centromères et la sclérodermie reste sans réponse.

3.1. Le complexe centromère-kinétochore

Le centromère apparaît comme une région dense en chromatine ou hétérochromatine entourée d'une structure spécialisée : le kinétochore. Le kinétochore est composé de quatre couches : une plaque interne dense qui est adjacente à l'hétérochromatine, une zone claire, une plaque extérieure dense et une corona fibreuse entourant les autres couches⁶². L'hétérochromatine présente au niveau du centromère est constituée d'ADN satellite, dont l'ADN-alpha satellite^{62;63}, qui est un polymère de séquences répétées d'environ 171 paires de bases⁶³. Le centromère est bien connu pour ses fonctions dans l'organisation du kinétochore et dans la modulation de l'attachement et du mouvement des chromosomes le long de l'axe mitotique⁶⁴. Le centromère des chromosomes mitotiques aurait au moins trois fonctions : point d'attache des microtubules, dernier point d'adhérence des chromatides sœurs et moteur mécano-chimique responsable du mouvement des chromatides le long des axes durant l'anaphase⁶². Le complexe centromère-kinétochore intègre aussi des signaux de régulation requis pour la progression mitotique et le maintien

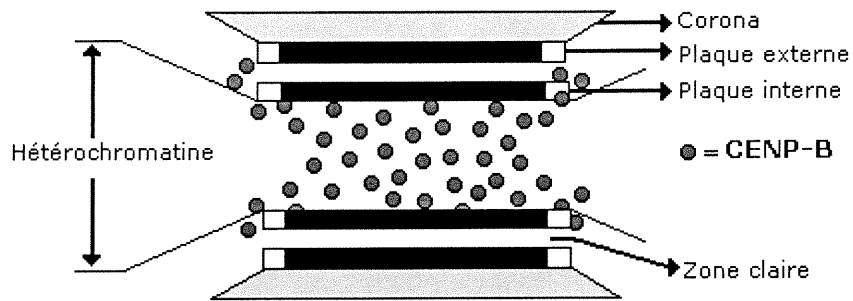
de la cohésion des chromatides sœurs avant le début de l'anaphase⁶⁴.

3.2. Structure et fonctions de CENP-B

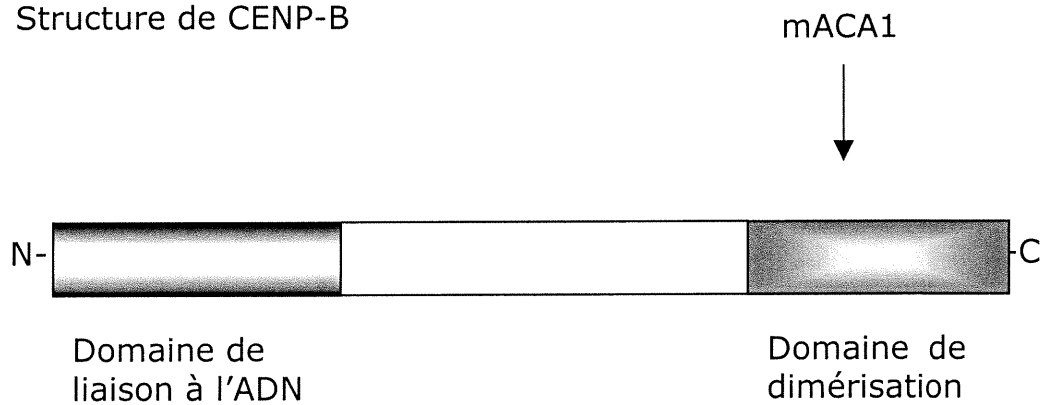
Le gène codant pour CENP-B ne se retrouve qu'une fois sur le génome des cellules humaines⁶¹, au locus 20p13 du chromosome 20⁶⁵. Ce gène est transcrit en un ARNm de 2900 bases⁶¹ qui code pour une protéine de 599 acides aminés. On retrouve environ 375 copies de CENP-B par chromatide⁶² soit environ 20 000 copies par cellules⁶⁶. CENP-B est localisée dans l'hétérochromatine, en dessous et autour du kinétochore et non à l'intérieur de celui-ci⁶² (Figure 2). La protéine ne semble pas nécessaire au maintien du centromère, puisqu'elle est absente du chromosome Y⁶². Ce dernier est pauvre en ADN-alpha satellite, qui, normalement, se lie à CENP-B par une région nommée « CENP-B box » (voir plus loin)⁶². Par contre, on retrouve CENP-B autant au niveau des centromères actifs qu'inactifs⁶⁷.

Figure 2. Localisation et structure de CENP-B

A. Localisation de CENP-B au niveau du kinétochore



B. Structure de CENP-B



mACA1 : région de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal anti-CENP-B

La protéine CENP-B possède, en C-terminus, deux régions riches en acides aminés de type acide (Figure 2) : une région de 62 acides aminés contenant 79% de résidus d'acide aspartique ou glutamique et une région de 31 acides aminés contenant 85% de résidus acides⁶¹. Cette grande concentration d'acides aminés acides pourrait expliquer que CENP-B, malgré une masse moléculaire de 65 kD, migre sur un gel de polyacrylamide à un poids apparent de 80 kD⁶¹. Cette région acide pourrait se lier aux domaines basiques de protéines associées à la chromatine, telles que les histones⁶⁸.

CENP-B possède deux domaines fonctionnels : un domaine de dimérisation en C-terminus⁶⁹ et un domaine de liaison à l'ADN en N-terminus⁶⁸. CENP-B, en formant un dimère, peut lier deux molécules d'ADN permettant une structure plus stable de l'hétérochromatine.

La protéine CENP-B se lie à une séquence d'ADN-alpha satellite de 17 paires de bases appelée « CENP-B box »⁶⁶. L'interaction de la protéine avec la séquence d'ADN jouerait un rôle dans le regroupement des longues répétitions d'ADN-alpha

au niveau du centromère pour régulariser la structure ou organiser les chromatides sœurs après la réplication⁶⁶. De plus, CENP-B aurait la capacité de lier la portion C-terminale de la tubuline, une protéine microtubulaire impliquée dans l'attachement des chromosomes⁷⁰.

3.3. Expression et purification de CENP-B

3.3.1. Transcription et traduction in vitro

Pour obtenir la protéine CENP-B complète (599 acides aminés), des auteurs ont utilisé une méthode de transcription et traduction *in vitro*⁷¹. Pour cela, ils ont utilisé la trousse *TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems* de Promega. Dans leur article ils ne donnent aucun renseignement quant à la quantité et la qualité de la protéine obtenue. Le prospectus de la compagnie indique que la luciférase, une protéine contrôle, est maximalelement produite à 500 ng par réaction.

3.3.2. Purification à partir de cellules humaines

Des noyaux de cellules HeLa, une lignée de cellules épithéliales adhérentes, furent utilisés pour purifier CENP-B^{66;70;72}. La protéine a été purifiée à partir d'un lysat de noyaux, en utilisant tout d'abord une colonne échangeuse de cations puis une colonne d'oligonucléotide-Sépharose⁷². Cette dernière fut construite en couplant, à des billes de Sépharose, des séquences « CENP-B box » répétées permettant une purification par affinité de CENP-B. De cette façon, il est possible de purifier 50 pmol de protéine par 10^{10} cellules HeLa⁶⁶. CENP-B fut aussi purifiée par électro-élution à partir des protéines insolubles de noyaux de cellules HeLa⁷⁰. Une souche de cellules épithéliales, les cellules HEP-2, fut aussi utilisée pour purifier CENP-B⁷³.

3.3.3. Purification à partir de cellules d'insecte infectées par un baculovirus

Pour obtenir CENP-B en plus grande quantité, des auteurs ont inséré le gène de CENP-B dans un baculovirus et infecté

des cellules d'insecte (Sf9)⁷⁴. Le gène, de 1746 paires de bases, code pour une protéine de 582 acides aminés, soit 97% de la protéine totale. La protéine a été fusionnée à une séquence de six résidus histidine en N-terminus permettant une purification par affinité sur une résine couplée au nickel. Par cette méthode, 5 à 8 mg de protéines recombinantes furent purifiées à partir d'un litre de culture de cellules Sf9.

3.3.4. Purification à partir d'Escherichia coli

À cause du coût élevé et de la manipulation fastidieuse des cellules en culture, plusieurs auteurs ont tenté d'exprimer CENP-B chez *E. coli*. En utilisant diverses protéines de fusions, ils ont réussi à exprimer des portions plus ou moins longues de la protéine sans toutefois réussir à l'exprimer sous sa forme complète de 599 acides aminés. Le tableau IV brosse un portrait des diverses méthodes d'expression de CENP-B.

Un des problèmes rencontrés dans ces différentes études (Tableau IV) est la purification de CENP-B. Par exemple, dans son étude, Earnshaw n'a pas pu purifier parfaitement

Tableau IV. Détails des différentes méthodes d'expression de CENP-B chez *E. coli*.

Année	Auteurs	Protéines de fusion	Taille de CENP-B	Région de CENP-B
1987	Earnshaw ⁶¹	β -gal (113 kD) trpE (32 kD)	147 aa 594 aa	C-terminus C-terminus
1992	Verheijen ⁷⁵	GST (26 kD)	60 aa	C-terminus
1992	Sugimoto ⁷⁶	β -gal (113 kD)	134 aa	N-terminus
1995	Parveen ⁷⁷	β -gal (113 kD)	71 aa	C-terminus
1995	Whyte ⁷⁸	β -gal (113 kD)	147 aa	C-terminus

CENP-B⁶¹. Il a du utiliser une protéine partiellement purifiée (fusion avec β -gal) ou utiliser un lysat bactérien (fusion avec trpE). Ainsi, plusieurs protéines bactériennes se retrouvaient dans leur échantillons de CENP-B. Pour une étude spécifique des auto-anticorps anti-CENP-B il est important d'utiliser la protéine pure et exempte de protéines bactériennes contaminantes. Ainsi, jusqu'à ce jour, la protéine centromérique B n'a pu être purifiée parfaitement sous sa forme complète à partir d'*E. coli*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Clonage de l'ADNc de CENP-B chez *E. coli*

1.1. Transfert de l'ADN de CENP-B dans le vecteur pET11a

Deux millilitres de milieu LB (voir section 8), contenant 100 µg/ml de carbénicilline (un analogue de l'ampicilline, plus résistant à la β-lactamase), a été inoculé avec une culture congelée de *E. coli* MC1066 contenant le plasmide pT7.7/CENP-B (donné par Dr William Earnshaw, University of Edinburgh). La culture a été incubée à 37°C pendant 16 heures. Une fraction de 1,2 ml de culture a été utilisée pour l'extraction du plasmide à l'aide du kit *QIAprep Spin Plasmid* de QIAGEN. Le plasmide circulaire a été récolté dans un volume final de 50 µl.

Une souche de *E. coli* HB101 (Novagen) a été transformée en utilisant 1 µl de plasmide et 50 µl de bactéries compétentes. Après des incubations successives de 30 minutes sur glace, de 45 secondes à 42°C et de 5 minutes sur glace, 500 µl de milieu LB a été ajouté. La culture fut placée à 37°C pour 45 minutes. Des aliquotes variant entre 50 et

200 μ l ont été étalées sur boîte de pétri contenant du milieu LB auquel ont été ajoutés 1,5% d'agar et 100 μ g/ml de carbénicilline. Ces milieux ont été placés pour 16 heures à 37°C.

Le plasmide pT7.7/CENP-B a été extrait de la souche HB101 par le protocole décrit précédemment. Une digestion du plasmide par l'enzyme de restriction BamHI (Pharmacia Biotech) a été effectuée en ajoutant 1,8 U d'enzyme à 2 μ l de plasmide et en incubant 2 heures à 37°C. Le plasmide, d'une longueur de 4,4 kb a été visualisé sur gel d'agarose 0,8% (voir section 7.1).

Pour extraire l'ADN codant pour CENP-B, 100 μ l de plasmide ont été digérés par 0,8 U de l'enzyme de restriction NdeI (Pharmacia Biotech), 2 heures à 37°C. Une seconde digestion de 2 heures à 37°C avec 36 U de l'enzyme HindIII (Pharmacia Biotech) a été effectuée. Le résultat de la digestion a été appliqué sur gel d'agarose 0,8% et la bande à 2,0 kb correspondant à l'ADNc de CENP-B fut extraite grâce au kit

QIAquick Gel Extraction de QIAGEN. La concentration finale de l'ADN a été évaluée par densitométrie sur gel d'agarose.

Une souche de HB101 contenant le plasmide pET11a (Novagen) possédant un gène de résistance à l'ampicilline, a ensuite été soumise au même protocole que l'ADN de CENP-B : l'extraction du plasmide et les digestions successives par les enzymes NdeI et HindIII. Le plasmide a été déphosphorylé par 0,1 U de phosphatase alcaline 30 minutes à 60°C, et la réaction fut arrêtée par l'ajout de 0,1% de sodium dodécylsulfate (SDS) et 100 µg/ml de protéinase K, puis incubée 30 minutes à 37°C. L'analyse sur gel d'agarose et l'extraction du plasmide digéré (5,3kb) ont été faites de la même façon que pour l'ADN de CENP-B.

Une ligation du plasmide pET11a et de l'ADNc de CENP-B a été effectuée à l'aide du système *Rapid DNA Ligation* (Boehringer Mannheim), avec 5 U de T4 DNA ligase, en utilisant une proportion de plasmide versus l'insert de 1 :1. Le résultat de la ligation a ensuite été transformé dans la souche HB101.

Les colonies obtenues suite à la ligation de pET11a et de l'ADN de CENP-B ont été analysées en digérant le plasmide par les enzymes de restriction, BsaAI (New England BioLabs) et BamHI. Le plasmide pET11a/CENP-B a été transformé dans la souche BL21(DE3) (Novagen) d'*E. coli*.

1.2. Transfert de l'ADN de CENP-B dans le vecteur pET19b

Le vecteur pET19b (Novagen) possède un gène de résistance à l'ampicilline et permet l'expression de la protéine fusionnée avec une séquence de 10 histidines en N-terminus. Pour insérer le gène de CENP-B provenant de la construction pET11a/CENP-B dans le vecteur pET19b, les enzymes de restriction NdeI et HindIII ont été utilisés. La ligation, les transformations du vecteur chez *E. coli*, et l'analyse des clones ont été effectués de la même manière que pour la construction pET11a/CENP-B.

2. Induction de l'expression de CENP-B

2.1. Protocole standard

L'expression de CENP-B avec le plasmide pET11a/CENP-B a été testée dans la souche BL21(DE3) selon un protocole standard décrit par Novagen. Ainsi, 2 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml de carbénicilline ont été inoculés avec une culture congelée de pET11a/CENP-B BL21(DE3) et incubés 16 heures à 37°C. Une dilution de 1 :20 a été préparée avec le même milieu de culture et incubée 3 heures à 37°C. Pour induire l'expression de CENP-B sous le contrôle du promoteur T7, 1 mM d'isopropyl-1-thio-β-galactopyranoside (IPTG;Sigma) a été ajouté et la culture est incubée 2 heures à 37°C. Les bactéries ont été recueillies par centrifugation à 27000 x *g* pendant 15 minutes, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

2.2. *Protocole pour l'expression de protéines toxiques*

La culture congelée de pET11a/CENP-B BL21 (DE3) ou pET19b/CENP-B BL21 (DE3) a été inoculée à 100 µl de milieu LB et étalée sur un milieu LB solide contenant 100 µg/ml de carbénicilline. Cette culture a été incubée à 37°C pendant 16 heures. À partir du milieu solide, 6ml de milieu M9ZB contenant 200 µg/ml de carbénicilline ont été inoculés et incubés à 37°C jusqu'à une densité optique à 600 nm d'environ 0,4-0,6. La culture a été centrifugée à 20800 x g pendant 5 minutes et le culot bactérien fut remis en suspension avec 500 ml de milieu M9ZB contenant 500 µg/ml de carbénicilline. La dilution de 1 :80 a été incubée à 37°C jusqu'à une densité optique à 600 nm d'environ 0,4-0,6 et centrifugée 15 minutes à 27000 x g. Les bactéries ont finalement été remises en suspension dans 500 ml de milieu M9ZB contenant 500 µg/ml de carbénicilline. L'expression de CENP-B a été induite 2 heures à 30°C par l'ajout de 1 mM d'IPTG. Les bactéries ont été récoltées par 20 minutes de centrifugation à 27000 x g. Elles ont été lavées avec 0,25 volume de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA. La solution a été divisée de façon à obtenir

des tubes contenant l'équivalent de 83,3 ml de culture et centrifugée 15 minutes à 27000 x *g*. Les culots de bactéries ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

3. Extraction des protéines à partir de la culture bactérienne

Une solution d'extraction a été préparée en ajoutant au B-PER (*Bacterial Protein Extraction Reagent* ; Pierce) les inhibiteurs de protéases suivants : 2 µg/ml d'aprotinine, 1 mM de benzamidine, 2 µg/ml de leupeptine, 1 µg/ml de pepstatine et 100 µg/ml de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF).

Un culot de bactéries correspondant à 83,3 ml de culture a été resuspendu avec 10 ml de solution d'extraction jusqu'à homogénéité. La suspension fut mise sous agitation pendant 10 minutes à la température ambiante et centrifugée à 27000 x *g* pendant 15 minutes. Le surnageant, contenant les protéines solubles dans la solution d'extraction, a été nommé « fraction soluble » et conservé à 4°C.

Le culot de protéines a été nommé « fraction insoluble » et resuspendu dans 10 ml de solution d'extraction contenant 6 M d'urée en vortexant vigoureusement. La fraction insoluble a été conservée à 4°C jusqu'à son utilisation.

4. Purification par affinité de CENP-B

4.1. Éluion avec imidazole

Les fractions soluble et insoluble obtenues par l'extraction des protéines ont été incubées 30 minutes à 25°C avec 1 ml de résine 50% provenant de la trousse *B-PER 6xHis Spin Purification* (Pierce). Cette résine consiste en des billes d'agarose couplées à des ions nickel permettant aux regroupements d'acides aminés histidines de s'y lier. La résine a été récoltée par centrifugation à 1200 x *g* pendant 10 minutes et appliquée sur une colonne de 2 ml contenant une membrane retenant la résine.

La résine a été lavée 10 fois avec 0,5 ml de tampon TNI⁷⁴ (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,2% Tween-20, 0,5 M NaCl)

contenant 75 mM d'imidazole. Cette étape permet d'éliminer les protéines ne liant pas le nickel. Les protéines liées à la résine, dont CENP-B, ont été éluées par l'ajout de 0,5 ml de tampon TNI contenant une quantité croissante d'imidazole (150, 200 ou 250 mM). Lorsque le tampon de lavage ou d'éluion a été ajouté, la résine est reposée 5 minutes, puis centrifugée 2 minutes à 10600 x *g*. Les échantillons recueillis ont été conservés à -20°C.

Tous les tampons utilisés contiennent les même inhibiteurs de protéases que la solution d'extraction. De plus, ils ont été conservés à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation.

4.2. *Éluion avec L-histidine*

La purification de CENP-B a aussi été testée en utilisant la L-histidine au lieu de l'imidazole pour éluer la protéine de la résine. Pour le tampon de lavage, le tampon TNI sans L-histidine a été utilisé alors que les tampons d'éluion contenaient 10, 25, 50 ou 150 mM de L-histidine.

5. Éluion chimique à partir de la nitrocellulose

Pour isoler la protéine CENP-B provenant de la purification par colonne d'affinité, une technique décrite par Lui et col⁷⁹ a été utilisée. Brièvement, les échantillons d'éluion contenant CENP-B (visualisés sur gel de polyacrylamide (voir section 7.2 et 7.3) et immunobuvardage (voir section 7.4)) ont été rassemblés et concentrés en utilisant le Centricon Plus-20 possédant une membrane Ultracel PL (Amicon). Ces éluats concentrés ont été appliqués sur maxi-gel de polyacrylamide 6%. Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. Une lanière verticale de membrane a été utilisée pour un immunobuvardage révélant la position de CENP-B. Avec minutie, la bande de CENP-B a été découpée de la nitrocellulose et taillée en très fins morceaux (25mm²). Ces petits morceaux ont été placés dans un tube de 1,5 ml, soit 5 carrés de 25mm² par tube. Cent vingt-cinq microlitres d'une solution contenant 1% pipéridine dans 40% d'acétonitrile (MeCN) pH 12.5 ont ensuite été ajoutés à la nitrocellulose et le tout incubé 2 heures à 37°C. Le tube a été

centrifugé 5 minutes à 20800 x *g*. Le surnageant contenant la protéine CENP-B pure est conservé à -20°C.

Une solution contenant 3% Zwittergent dans 10 mM KOH pH 11.5 fut testée pour extraire CENP-B de la membrane de nitrocellulose. Avec cette solution, la nitrocellulose a été incubée 1 heure à 65°C.

6. Électro-élution

Une électro-élution a été testée pour extraire CENP-B des éluats. Tout les éluats contenant CENP-B (vérifiés par gel de polyacrylamide et immunobuvardage) ont été récoltés et concentrés avec le Centricon Plus-20. Ces éluats concentrés ont été appliqués sur un maxi-gel de polyacrylamide 6%. Après la migration des protéines, le gel a été coloré (2% bleu de Coomassie dans l'eau) nous permettant de visualiser CENP-B. La bande correspondant à CENP-B a été extraite délicatement et placée à -20°C pour 30 minutes. La bande congelée, plus facile à découper, a été taillée en très petits morceaux. Ceux-ci ont été déposés dans la cupule prévue à

cet effet qui a été installée dans le montage d'électro-élution. Le tampon contenant 3,32 mM sodium acétate, 4 mM Tris pH 8,6, 0,1% SDS, a été ajouté et un courant de 2 W fut appliqué pendant 2 à 3 heures. La protéine fut minutieusement récoltée et précipitée 16 heures à -20°C avec 9 volumes d'acétone.

L'échantillon de CENP-B a été centrifugé 5 minutes à 20800 x *g* et le culot fut séché environ 1 heure à température ambiante. La protéine a été resuspendue dans 500 μl d'une solution dénaturante (6 M guanidine-HCl, 140 mM β -mercaptoéthanol, 10 mM EDTA et 1 M Tris) qui est dialysée à 4°C contre 2 litres de 10 mM Tris-HCl pH 7.5. Le tampon a été remplacé aux 30 minutes pour un total de 2 heures. Le tampon a été substitué par de l'eau et l'échantillon a été re-dialysé 2 heures. La protéine a été récoltée et conservée à -20°C .

7. Protocoles courants

7.1. Gels d'agarose

Pour faire un gel d'agarose 0,8%, 0,4 mg d'agarose ont été dissous dans 50 ml de tampon TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0) et la solution bouillie pour 1 minute au four à micro-ondes. Pour colorer l'ADN, 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium a été ajouté. Un courant de 80 V a été appliqué pendant 1 heure. L'ADN est visualisé sous rayons ultraviolets.

7.2. Gels de polyacrylamide

Un gel de séparation 8% a été utilisé : 20% d'acrylamide 40% : N-N'-methylene-bis-acrylamide (37,5 :1) (BioRad), 25% de tampon de séparation (1,5 M Tris pH 8.9, 0,4% SDS), 0,5% d'ammonium persulfate 10% et 0,05% de TEMED (BioRad). Un gel de concentration 3% a été utilisé : 7,5% d'acrylamide 40% : N-N'-methylene-bis-acrylamide (37,5 :1), 25% de tampon de concentration (120 mM Tris pH 6.7, 0,4% SDS), 0,5% d'ammonium persulfate 10% et 0,1%

de TEMED. Au niveau de la cathode, pour un maxi ou midi-gel, un tampon composé de 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS a été utilisé alors que l'anode baignait dans 100 mM Tris pH 8.1, 0,1% SDS. La migration des protéines a été entraînée par l'application d'un courant de 20 mA par gel pour la concentration, puis de 40 mA par gel pour la séparation. Pour un mini-gel, le tampon de la cathode a été utilisé et un courant de 200 V a été appliqué.

7.3. Coloration au bleu de Coomassie

La technique de Wong et col.⁸⁰ a été utilisée par la coloration des gels de polyacrylamide. Après la migration des protéines, le gel a été rincé à l'eau. Le gel a été coloré avec 0,05% de bleu de Coomassie R-250 (BioRad), 25% d'isopropanol et 10% d'acide acétique. Le gel a été chauffé au four à micro-ondes pendant 2 minutes à puissance maximale, refroidi environ 5 minutes et rincé à l'eau. Pour décolorer, 10% d'acide acétique a été ajouté et bouilli au four à micro-ondes pendant 2 minutes. Les résultats ont été analysés lorsque le gel avait suffisamment refroidi.

7.4. Immunobuvardage

Après la séparation des protéines, le gel a aussi été utilisé pour un immunobuvardage. Dans un premier temps, le gel fut conditionné dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine pH 8,3, 20% méthanol) environ 30 minutes. La membrane de nitrocellulose fut conditionnée de la même manière. Le transfert a été effectué grâce au système *Trans-Blot SD Semi-dry* de BioRad. La nitrocellulose a été déposée dans un sac de plastique et les sites de liaisons ont été bloqués 16 heures à 4°C par un tampon de blocage (150 mM Tris-HCl pH 7.4, 0,9% NaCl, 0,5% Tween-20 ,5% de lait écrémé en poudre). Un anticorps monoclonal de souris spécifique au CENP-B humain (mACA1 – hybridome de l'ATCC #HB-9667)⁶¹ a été dilué 1 :2000 dans le tampon de blocage et incubé 1 heure à 25°C. La membrane fut lavée 4 fois 5 minutes avec le tampon de blocage sans le lait et a été incubée 1 heure à 25°C avec un IgG anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase (Jackson Immuno Research) dilué 1 :20000 dans le tampon de blocage. Les lavages ont été répétés et le signal fut révélé par

chimioluminescence en utilisant le substrat *SuperSignal West Pico* (Pierce) et en exposant la membrane à un film rayon-X.

8. Milieux de culture

8.1. Milieu de culture LB (Luria-Bertani)

Pour 1 litre de milieu, 25 g de LB (40% Bacto-tryptone, 20% Bacto-yeast et 40% NaCl ; ICN Biomedicals) ont été dissous. Le milieu a été autoclavé. La carbénicilline n'a été ajoutée qu'au moment de l'utilisation du milieu.

Pour préparer le milieu solide de LB, 15g d'agar ont été ajoutés avant de faire autoclaver. La carbénicilline a été ajoutée lorsque le milieu était tiède, et qu'il était prêt à couler dans les boîtes de pétri.

8.2. Milieu de culture M9ZB

Le milieu de culture M9ZB a été préparé en 3 étapes. Le milieu M9 10X composé de 5 g NH₄Cl, 15 g KH₂PO₄, 30 g

Na_2HPO_4 et 500 ml d'eau a été préparé. Le pH fut ajusté à 7.4 et le milieu a été autoclavé. Le milieu ZB contenant 5 g de Bacto-tryptone, 2,5 g de NaCl pour 400 ml d'eau a été préparé et autoclavé. Pour obtenir 500 ml de milieu M9ZB : 400 ml de milieu ZB, 50 ml de milieu M9 10X, 50 ml de glucose 40% et 1 ml de MgCl_2 1 M ont été mélangés. Pour l'induction de l'expression de CENP-B, le milieu M9ZB devait être fraîchement préparé.

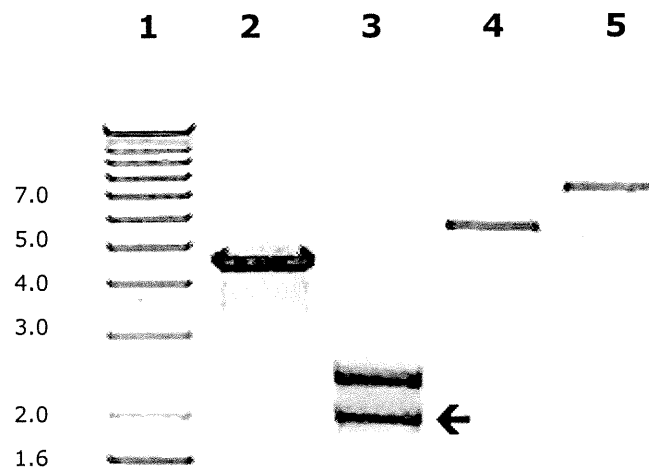
RÉSULTATS

1. Clonage de l'ADNc de CENP-B chez *E. coli*

L'ADNc de la protéine centromérique B, contenant 1800 paires de bases, fut inséré dans deux vecteurs du système pET, pET11a et pET19b. Ces vecteurs permettent l'expression des protéines recombinantes sous le contrôle du promoteur T7. De plus, ils possèdent un gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les clones possédant réellement le vecteur. Par contre, le vecteur pET19b ajoute une séquence de 10 acides aminés histidine dans la portion N-terminale de la protéine recombinante ce qui permet une purification par affinité. Pour cette raison, la suite du projet a été réalisée à l'aide de ce plasmide, soit pET19b/CENP-B

La figure 3 montre le résultat des digestions et de la ligation permettant le clonage de l'ADN de CENP-B dans le vecteur pE19b. Sur le gel d'agarose, l'ADN de CENP-B est apparu comme une bande à environ 2,0kb alors qu'elle ne possède que 1800 paires de bases. Cette différence de 200 paires de base provient du clonage du gène de CENP-B dans le vecteur

Figure 3. Résultats des différentes digestions et de la ligation permettant le clonage de l'ADNc de CENP-B chez *E.coli*



Gel d'agarose 0,8%. Puits 1 : échelle d'ADN ; Puits 2 : pT7.7/CENP-B linéarisé par NdeI (4,4 kb) ; Puits 3 : extraction de l'ADNc de CENP-B (2 kb) du pT7.7/CENP-B par digestion avec NdeI et HindII ; Puits 4 : pET19b linéarisé par NdeI et HindIII (5,3 kb) ; Puits 5 : pET19b/CENP-B (7,3 kb). La flèche indique l'ADNc de CENP-B. L'échelle de poids moléculaires est exprimée en kilobase.

pT7.7 effectué dans le laboratoire du Dr Earnshaw. Cette séquence n'a pas affecté les étapes de clonage car elle est située au delà du codon signifiant l'arrêt de la transcription du gène de CENP-B.

2. Expression de CENP-B chez *E.coli*

Il fut impossible d'obtenir l'expression de CENP-B en utilisant le protocole standard décrit par Novagen pour l'expression des protéines recombinantes à l'aide du système pET (figure 5). Il a déjà été démontré que des protéines possédant une région riche en acides aminés acides peuvent être toxiques pour la bactérie *E. coli*^{74;75}. CENP-B possède une région d'environ 100 acides aminés acides constituée de plus de 80% d'acide glutamique et acide aspartique⁶¹. En N-terminus, CENP-B possède un domaine de liaison à l'ADN lui permettant de lier une séquence de 17 nucléotides appelés CENP-B box⁶⁶. Cette séquence est homologue à plusieurs régions du génome de *E.coli* (vérifié à l'aide de GenBank du NCBI) ; il est donc possible que CENP-B puisse se lier à l'ADN de la bactérie et ainsi perturber son métabolisme.

Pour contourner ce problème, une version modifiée du protocole d'induction de l'expression des protéines toxiques décrit par Novagen a été utilisée. Comme le démontre la figure 4, des quantités croissantes de carbénicilline ont été utilisées pour sélectionner le clone le plus résistant. En utilisant une culture ayant une densité optique à 600nm de moins de 0,6, la croissance bactérienne est encore dans sa phase exponentielle. Grâce à ce protocole, l'expression de CENP-B chez *E.coli* a été réalisée.

CENP-B a été retrouvée en plus grande quantité dans la fraction insoluble de la solution d'extraction (Figure 5). Ceci serait dû au fait que la bactérie, pour se protéger, entreposerait les protéines dans des corps d'inclusion et que ceux-ci se retrouveraient dans la fraction insoluble. Sur le gel coloré au bleu de Coomassie (résultat non montré) l'expression de CENP-B n'a pas été observée à cause de la faible quantité de culture appliquée sur le gel (100 μ l) et aussi à cause de la grande quantité de protéines bactériennes se retrouvant autour de 84 kD. Par contre, la détection par un

Figure 4. Schéma simplifié du protocole d'induction de l'expression de CENP-B.

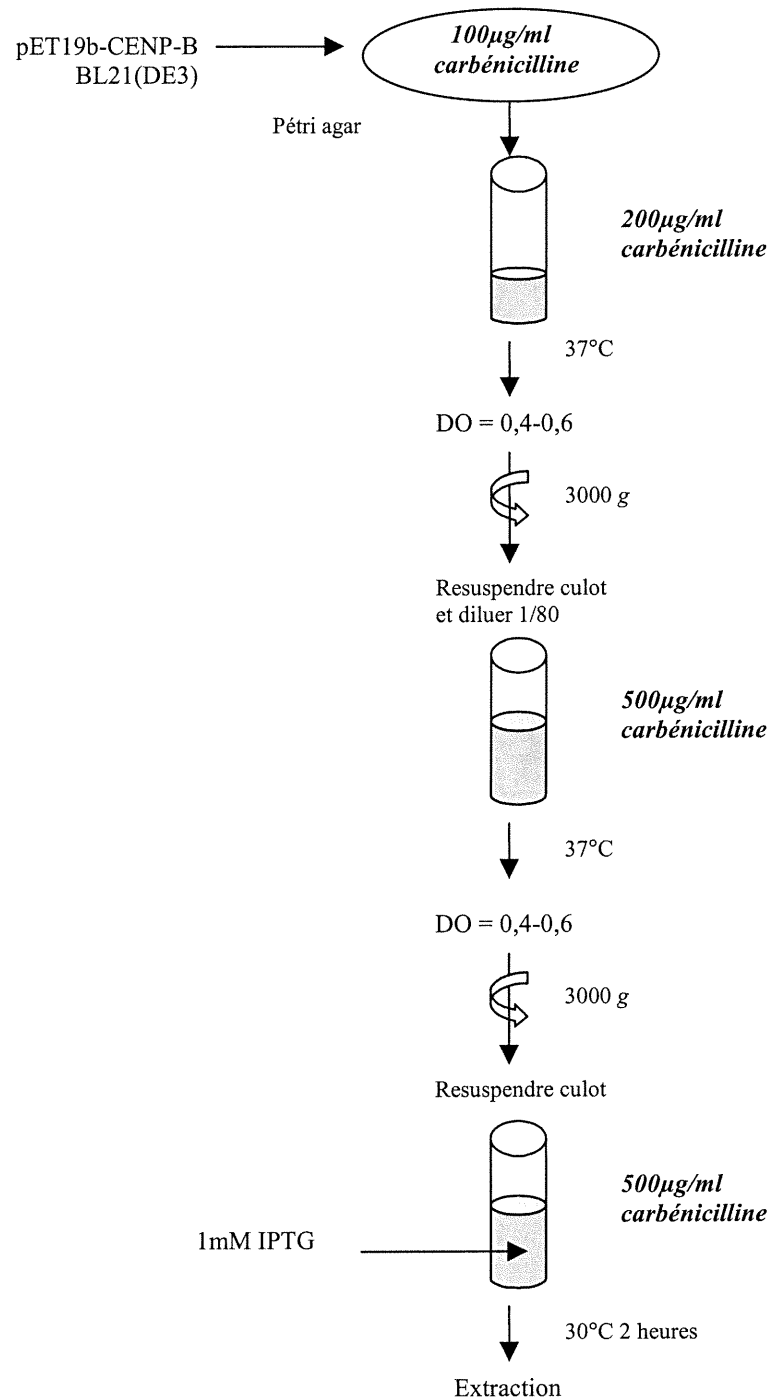
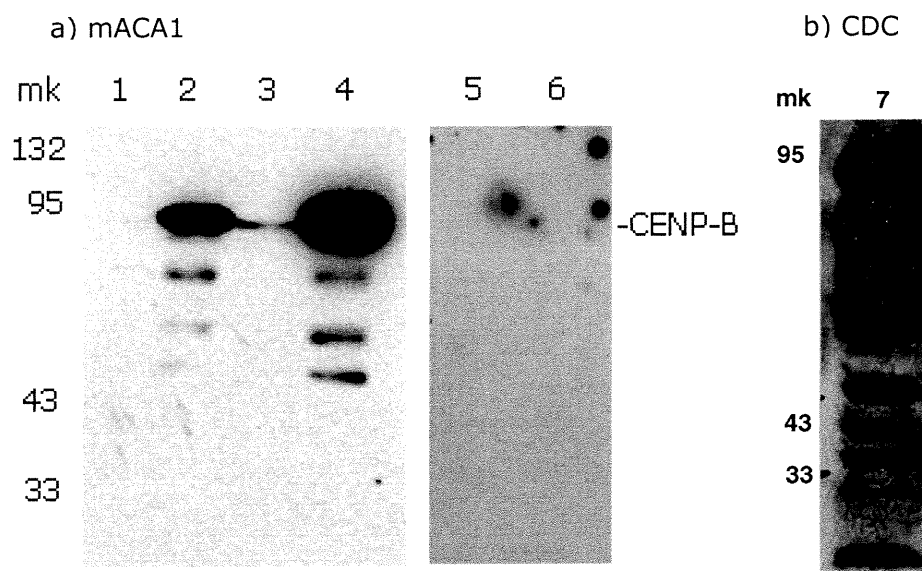


Figure 5. Comparaison du protocole standard et du protocole pour protéines toxiques quant à l'expression de CENP-B chez *E.coli*.



Immunobuvardages avec un anticorps monoclonal spécifique à CENP-B⁶¹ (mACA1) ou un pool de sérums humains anti-CENP-B (CDC). a) Puits 1 à 4 : protocole pour protéines toxiques ; Puits 5 et 6 : protocole standard ; Puits 1 : fraction soluble non induite par IPTG ; Puits 2 : fraction soluble induite par IPTG ; Puits 3 : fraction insoluble non induite par IPTG ; Puits 4 : fraction insoluble induite par IPTG ; Puits 5 : lysat bactérien total non induit par IPTG ; Puits 6 : lysat bactérien total induit par IPTG. b) Puits 7 : fraction insoluble induite par IPTG. mk : marqueurs de poids moléculaires exprimés en kDa.

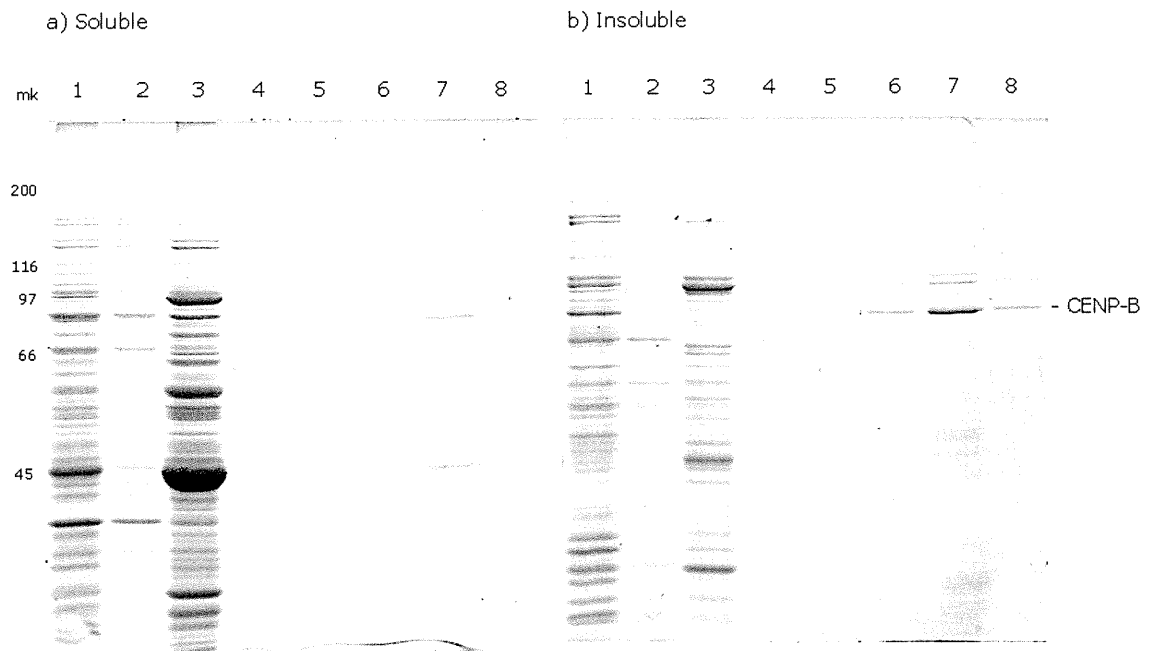
anticorps monoclonal spécifique à CENP-B (figure 5a) et par un sérum de référence anti-CENP-B (CDC ; figure 5b) a confirmé la présence de la protéine recombinante.

3. Purification de CENP-B par colonne d'affinité

Une résine couplée à des ions nickel a été utilisée pour purifier CENP-B. Celle-ci possède une séquence de 10 résidus aminés histidine ajoutés lors du clonage avec le vecteur pET19b. Un tampon contenant de l'imidazole a été utilisé. Ce tampon préserve la conformation naturelle de CENP-B⁷⁴. En utilisant 75 mM d'imidazole, la majorité des protéines bactériennes ont été éluées (figure 6a et 6b, puits 3) alors que CENP-B fut récupérée en utilisant des tampons d'éluion contenant 150, 200 ou 250 mM d'imidazole (résultat non montré).

En utilisant la fraction soluble pour la purification, une protéine bactérienne d'environ 45 kDa fut retrouvée dans tous les éluats contenant CENP-B (résultat non montré). Pour éliminer ce contaminant, l'imidazole a été remplacé par la

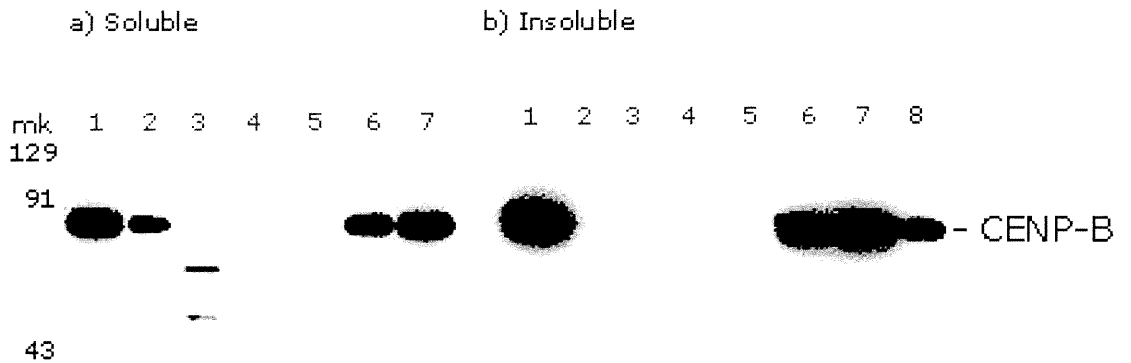
**Figure 6. Résultats de la purification par affinité de
CENP-B (bleu de Coomassie)**



Gels de polyacrylamide 8%. a) Fraction soluble. b) Fraction insoluble. Puits 1 : fraction soluble ou insoluble totale ; Puits 2 : protéines ne se liant pas à la résine ; Puits 3 : première élution avec 75 mM d'imidazole ; Puits 4 : dernière élution avec 75 mM d'imidazole ; Puits 5 : élution avec 10 mM de L-histidine ; Puits 6 : élution avec 25 mM de L-histidine ; Puits 7 : élution avec 50 mM de L-histidine ; Puits 8 : élution avec 150 mM de L-histidine. mk : marqueurs de poids moléculaires exprimés en kDa.

L-histidine qui agit comme compétiteur pour les sites de liaison du nickel. L'élution avec 10, 25, 50 ou 150 mM de L-histidine a permis d'éluer CENP-B (figure 6a), mais le contaminant de 45 kDa n'a pas été éliminé (figure 6a, puits 6 et 7). La fraction insoluble, ne possédant pas le contaminant de 45 kDa, fut utilisée. Les résultats de la purification ont été sensiblement les mêmes que pour la fraction soluble (figure 6b). Pour confirmer la présence de CENP-B dans les éluats, un immunobuvardage a été réalisé avec un anticorps spécifique à CENP-B (figure 7). Dans les éluats, des protéines bactériennes n'ont pu être éliminées, et ce, en utilisant l'imidazole ou la L-histidine comme éluant. Avec la L-histidine, la protéine CENP-B a été éluee dans un plus petit nombre d'éluats mais plus concentrée que lorsque l'imidazole était utilisé comme éluant. Une méthode de purification alliant les éluations avec 75 mM d'imidazole, pour éliminer les protéines bactériennes, et les éluations avec la L-histidine, pour éluer CENP-B, a été choisie comme étant la plus efficace pour purifier CENP-B (figure 6 et 7). Par contre, une deuxième étape de purification a été nécessaire pour obtenir la protéine CENP-B pure.

**Figure 7. Résultats de la purification par affinité de
CENP-B (Immunobuvardage)**



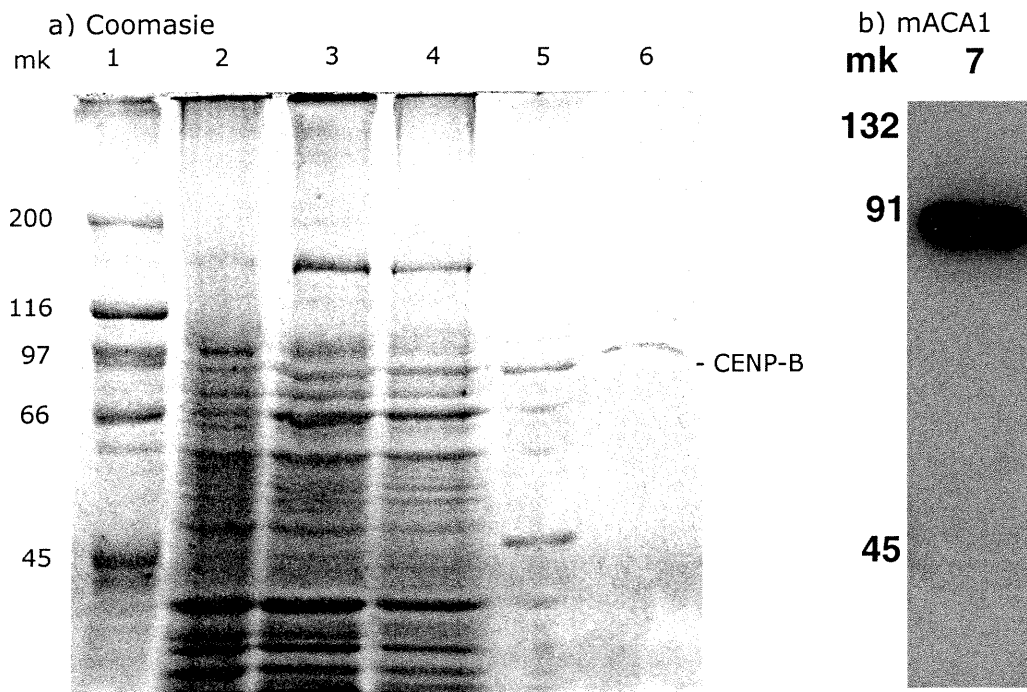
Immunobuvardage a) Fraction soluble. b) Fraction insoluble. Puits 1 : fraction soluble ou insoluble totale ; Puits 2 : protéines ne se liant pas à la résine ; Puits 3 : première élution avec 75 mM d'imidazole ; Puits 4 : dernière élution avec 75 mM d'imidazole ; Puits 5 : élution avec 10 mM de L-histidine ; Puits 6 : élution avec 25 mM de L-histidine ; Puits 7 : élution avec 50 mM de L-histidine ; Puits 8 : élution avec 150 mM de L-histidine.

Malgré la relative efficacité de la purification par affinité de CENP-B, une optimisation des conditions a été effectuée. La résine a été incubée avec les extraits de protéines 16 heures à 4°C au lieu de 30 minutes à 25°C comme l'indiquait le protocole de la trousse de purification. Cette incubation a permis d'augmenter faiblement le taux de CENP-B éluée mais des quantités supérieures des protéines bactériennes contaminantes ont été retrouvées dans les éluats (résultats non montrés). Le temps d'incubation de 30 minutes à 25°C a été conservé.

4. Élu­tion chimique à partir de la nitrocellulose

Pour parfaire la purification de CENP-B, une technique d'élu­tion à partir de la nitrocellulose a été utilisée. Les éluats concentrés ont été appliqués sur gel de polyacrylamide et transférés sur nitrocellulose. Une solution de pipéridine a permis d'élu­er la bande de CENP-B (figure 8a). Un immunobuvardage avec un anticorps monoclonal spécifique à CENP-B a été réalisé pour confirmer l'identité de la protéine purifiée (figure 8b). Une solution de Zwittergent a aussi été utilisée pour élu­er la protéine. Le résultat a été sensiblement le même que pour l'élu­tion avec la pipéridine. Cette technique n'ayant pas permis d'obtenir une grande quantité de CENP-B, une technique d'électro-élu­tion a été testée pour purifier la protéine des éluats.

Figure 8. Résultats de la purification par élution chimique à partir de la nitrocellulose

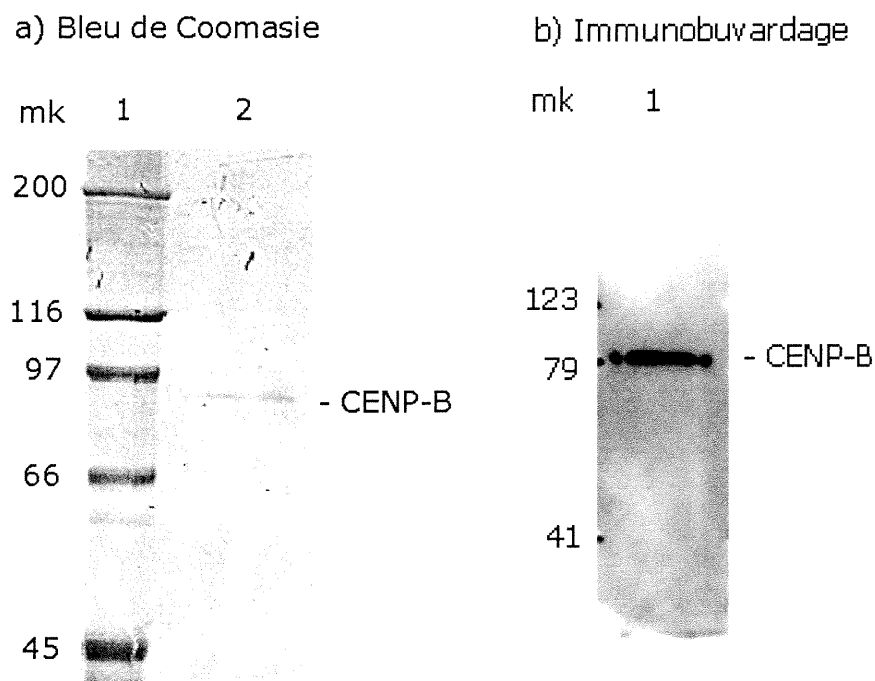


Gel de polyacrylamide 8%. a) Bleu de Coomassie. Puits 1 : marqueur de poids moléculaire ; Puits 2 : fraction soluble totale ; Puits 3 : protéines ne se liant pas à la colonne d'affinité ; Puits 4 : première élution avec 75 mM d'imidazole ; Puits 5 : élution avec 250 mM d'imidazole ; Puits 6 : CENP-B pure suite à l'élution chimique à partir de la nitrocellulose. b) Immunobuvardage. Puits 7 : CENP-B pure suite à l'élution chimique à partir de la nitrocellulose. mk : marqueurs de poids moléculaires exprimés en kDa.

5. Électro-élution

Une électro-élution a été testée pour extraire CENP-B des éluats obtenus de la purification par affinité. Comme le démontre la figure 9, l'électro-élution a permis d'obtenir la protéine pure et sans dégradation. Un immunobuvardage avec un anticorps monoclonal spécifique à CENP-B a été effectué pour confirmer l'identité de la protéine éluee (figure 9b). CENP-B n'a pu être purifiée en grande quantité à l'aide de cette technique.

Figure 9. Résultats de la purification par électro-élution



a) Gel de polyacrylamide 8%. Puits 1 : marqueur de poids moléculaire ; Puits 2 : CENP-B pure suite à l'électro-élution. b) Immunobuvardage. Puits 1 : CENP-B pure suite à l'électro-élution.

DISCUSSION

1. Expression de CENP-B chez *E. coli*

Des auteurs ont déjà tenté d'exprimer, sans succès, CENP-B fusionnée à une séquence de 6 résidus histidines chez *E. coli*⁷⁴. Selon leur conclusion, les systèmes bactériens seraient incapables de synthétiser des protéines possédant des domaines acides, ce qui fut discuté par plusieurs auteurs^{61;74;75;75}. Ainsi, le faible rendement d'expression obtenu dans notre étude pourrait s'expliquer par la présence chez CENP-B de domaines contenant plus de 80% d'acides aminés de type acide. De plus, ces domaines acides pourraient augmenter la dégradation de la protéine nouvellement formée⁷⁵.

Il a déjà été établi que des gènes produisant une protéine toxique, telle CENP-B, ne peuvent être exprimés dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) à cause du niveau basal d'activité de la T7 ARN polymérase⁷⁵. Cette quantité de T7 ARN polymérase serait suffisante pour exprimer une faible quantité de protéine qui, vu sa toxicité, activerait différents mécanismes

de défenses de la bactérie hôte comme la perte du plasmide contenant le gène à exprimer^{81;82;82} ou la dégradation de la protéine toxique⁸³. Des auteurs ont même profité de ce niveau basal pour purifier un fragment de CENP-B de hamster en l'absence d'inducteur (IPTG)⁸¹.

L'application d'une procédure décrite pour l'expression de protéines toxiques à l'aide d'une sélection des clones sur un milieu solide contenant un antibiotique⁸², a permis d'augmenter l'expression de CENP-B chez *E. coli* (résultat non montré). Dans cette même étude⁸², les auteurs décrivent les différentes stratégies pour prévenir la mort cellulaire due à la toxicité des protéines recombinantes : 1) utiliser un promoteur inductible pour contrôler l'expression de protéines recombinantes ; 2) changer le milieu de culture régulièrement pour renouveler la quantité d'antibiotique et pour maintenir les bactéries en croissance active ; 3) remplacer l'ampicilline par la carbénicilline. Pour l'expression de CENP-B, toutes ces stratégies furent mises en application en plus d'augmenter graduellement la quantité de carbénicilline dans le milieu de

culture. Ainsi, toutes ces étapes ont permis d'exprimer CENP-B chez *E. coli* malgré sa toxicité.

Il a été démontré que la présence de structure secondaire et tertiaire dans le site de liaison des ribosomes sur l'ARNm diminue l'expression des gènes en protégeant des éléments importants tels le codon d'initiation^{84;85;85}. Des auteurs ont démontré que le second codon après le codon d'initiation pouvait influencer l'expression des gènes chez *E. coli*⁸⁶. Les seconds codons contenant essentiellement les nucléotides guanosine (G) et cytosine (C) ne permettaient pas des niveaux d'expression élevés chez *E. coli*^{86;86;87}. Ainsi, la faible expression de CENP-B chez *E. coli* pourrait, en partie, s'expliquer par le fait que le second codon de l'ARNm est un codon GGC.

Lors de l'induction de l'expression de CENP-B dans la souche BL21(DE3) d'*E. coli*, la protéine fut retrouvée en grande majorité dans la fraction insoluble. Ceci serait dû à l'accumulation de corps d'inclusion qui seraient solubles seulement en présence de détergents ou d'agents

chaotropiques tels l'urée et la guanidine⁷⁴. Deux des moyens pour enrayer le problème sont d'utiliser une température d'induction de moins de 37°C et de ne pas dépasser un temps d'induction de 3 heures⁸⁸. Pour l'expression de CENP-B, l'induction s'est effectuée à 30°C pendant 2 heures. Ainsi, CENP-B a pu être retrouvée dans la fraction soluble. L'augmentation de seulement 2°C de la température d'induction, soit une induction à 32°C, ne permettait pas l'expression de CENP-B dans la fraction soluble (résultat non montré).

2. Purification de CENP-B

CENP-B fut purifiée, dans un premier temps, par affinité sur une résine couplée au nickel. Il a été observé que, malgré des quantités croissantes de bactéries appliquée sur la résine (équivalents à 83, 167 et 333 ml de culture), la quantité de CENP-B éluée restait constante (résultats non montrés). De plus, une grande quantité de CENP-B se retrouvait dans l'échantillon de protéines non liées à la résine (figure 5, puits 1 et 2). Plusieurs essais ont été faits pour optimiser la liaison de

CENP-B à la résine : ajout d'urée ou de guanidine et augmentation du temps de liaison. Aucun de ces changements n'a permis d'augmenter substantiellement la quantité de CENP-B recueillie (résultats non montrés).

Un immunobuvardage utilisant un anticorps anti-pentahistidines (Qiagen) fut effectué pour vérifier la présence de la séquence de dix résidus histidines en N-terminus de CENP-B. Il a été démontré que la protéine CENP-B éluée possédait réellement la séquence d'histidines mais que celle ne se liant pas à la résine n'était pas révélée par l'anticorps anti-histidine (résultats non montrés). Une hypothèse expliquant ces résultats est que CENP-B, vu sa conformation, cacherait la séquence d'histidines empêchant sa purification par affinité. Par contre, les protéines se retrouvant sur la nitrocellulose sont normalement dénaturées et la conformation naturelle de la protéine ne devrait pas interférer avec l'immunobuvardage. Il est improbable que CENP-B ait été partiellement exprimée sans la séquence d'histidines car son poids moléculaire ne variait pas selon qu'elle est liée ou non à la résine.

Les éluats de la purification par affinité, en plus de contenir CENP-B, contenaient plusieurs contaminants bactériens. Pour éliminer ceux-ci, une deuxième technique de purification était nécessaire.

Une électro-élution et une élution chimique à partir de la nitrocellulose furent testées indépendamment à partir des éluats de la purification par affinité. Par ces méthodes, il a été possible d'obtenir CENP-B parfaitement pure. Par contre, la protéine ne fut obtenue qu'en très faible quantité. De plus, ces techniques ont la caractéristique de dénaturer la protéine, ce qui n'est pas souhaitable pour la purification des auto-anticorps ou des tests diagnostiques.

Une autre technique de purification par affinité fut testée sur un lysat de culture bactérienne exprimant CENP-B non fusionnée à la séquence d'histidines. Cette technique, publiée par Muro et col.^{89,72} fut utilisée pour des lysats de noyaux de cellules en culture. La résine consistait en des billes de sépharose liées à des oligomères de séquences « CENP-B box ». En utilisant un lysat bactérien, il fut impossible de

purifier CENP-B (résultats non montrés). En faisant une analyse plus poussée, il fut démontré que CENP-B se liait fortement à l'ADN génomique de *E. coli* bloquant ainsi son site de liaison à la séquence « CENP-B box ». L'ajout d'ADNase ou l'augmentation de la température de liaison n'ont pas permis de libérer CENP-B.

3. Tests diagnostics (ELISA)

La procédure utilisée présentement en laboratoire clinique pour diagnostiquer la sclérodermie est l'immunofluorescence indirecte. La standardisation de cette technique est difficile⁹⁰ et l'étude simultanée d'un grand nombre d'échantillons est impraticable¹⁸. Plusieurs études furent menées pour développer des tests ELISA détectant les auto-anticorps les plus spécifiques de la maladie⁹¹. Les ELISA sont très sensibles, ont le potentiel d'être automatisés et sont quantitatifs¹⁸.

Les auto-anticorps anticentromère sont étroitement associés à la sclérodermie limitée et CENP-B en est l'antigène majeur. Ainsi, plusieurs auteurs ont tenté de mettre au point un ELISA

anti-CENP-B pour diagnostiquer la forme limitée de la maladie^{74;75;77;78;92} (tableau V). La sensibilité du test se situe entre 94 et 100% alors que sa spécificité varie de 93 à 99%. La majorité de ces ELISA ont été testés sur un faible nombre de sérums préalablement choisis pour leur positivité en immunofluorescence^{74;75;77}. Une importante étude a été réalisée sur une cohorte de 611 patients dont 521 étaient atteints de sclérodémie⁹³. En utilisant la portion C-terminale de CENP-B (147 acides aminés) fusionnée à la β -galactosidase, les auteurs ont obtenu une sensibilité de 94% et une spécificité de 93%. Il serait intéressant de vérifier si un ELISA anti-CENP-B utilisant la protéine entière pourrait modifier la sensibilité et/ou la spécificité du test.

Les ELISA décrits précédemment ne détectaient que les IgG anti-CENP-B. Il a été démontré que des IgA et IgM pouvaient se retrouver dans le sérum de patients sclérodermiques⁹⁴. Des auteurs ont discuté de la possibilité que les IgA et IgM anti-CENP-B seraient dirigés contre des épitopes distincts de ceux des IgG⁷⁵. Les IgA et IgM furent faiblement détectés dans les

Tableau V. Comparaison entre les différents ELISA anti-CENP-B

	1987		1992	1994	1995	1995
	Rothfield		Verheijen	Stahnke	Parveen	Whyte
Antigène	C-term CENP-B β-gal		C-term CENP-B GST	C-term CENP-B 6xHis	C-term CENP-B pEX-2	C-term CENP-B β-gal
Nb. Acides aminés	147		60	582	71	147
Sensibilité	100%	94%	100%	100%	100%	98%
Spécificité	-	93%	-	97.6%	99%	95%
n	26	611	84	80	15	134

ELISA utilisant la portion C-terminale de CENP-B^{75;78;95}. Ainsi, l'utilisation de la protéine entière s'avère importante pour bien caractériser les différents isotypes d'immunoglobulines dirigées contre CENP-B.

4. Purification des auto-anticorps

La sclérodermie est une maladie à caractère unique. La distribution et le titre des auto-anticorps présents sont spécifiques à chaque patient. Ainsi, des études sur le sérum complet ne peuvent pas permettre la compréhension de la physiopathologie d'un anticorps particulier. Il est donc important de pouvoir purifier différents auto-anticorps afin de les étudier.

Une des études pouvant être menées sur les auto-anticorps spécifiques à CENP-B, est la caractérisation des épitopes. La connaissance des épitopes s'avère importante pour le développement de tests diagnostiques mais aussi pour la compréhension de l'interaction anticorps-antigène, l'investigation de la pathogénèse des maladies auto-immunes

ainsi que la production de vaccins⁹⁶. Récemment, des auteurs ont mis au point une technique permettant d'étudier les anticorps du point de vue de leur épitopes⁹⁶. Celle-ci consiste à fixer sur un support un anticorps « secondaire » reconnaissant la portion Fc des immunoglobulines. Les anticorps cibles sont ensuite liés spécifiquement aux anticorps secondaires par leur portion Fc, ce qui permet de les purifier à partir d'un échantillon aussi hétérogène que le sérum. Finalement, les antigènes spécifiques sont liés aux anticorps cibles et sont soumis à l'action de diverses protéinases. La spécificité de la technique se fait par l'utilisation d'un antigène parfaitement pur.

Finalement, les auto-anticorps spécifiques à CENP-B pourront être étudiés au niveau de leur implication dans le dérèglement du mécanisme d'apoptose qui s'avère crucial pour la pathogénèse et/ou la physiopathologie de la sclérodermie.

CONCLUSION

Dans cette étude, la protéine centromérique B fut exprimée et purifiée à l'aide d'un système procaryotique. Jusqu'à ce jour, c'est la première fois que CENP-B est obtenue sous sa forme complète à partir d'*E. coli*.

Pour des études ultérieures, la technique de purification devra être optimisée pour permettre la production de CENP-B à grande échelle. Ainsi, une purification par *HPLC* à partir des éluats de la purification par affinité pourrait être testée pour obtenir CENP-B pure mais d'autres techniques devront être envisagées pour obtenir la protéine en grande quantité. De plus, un séquençage du gène de CENP-B est souhaitable pour confirmer l'identité et l'intégrité de la protéine.

Les auto-anticorps, alliés à des critères symptomatiques, sont de bons marqueurs diagnostiques pour les maladies auto-immunes. La présence ou l'absence d'un auto-anticorps particulier peut souvent prédire la forme de la maladie, son pronostic et ses manifestations cliniques éventuelles. Ainsi, la détection des auto-anticorps s'avère importante pour

permettre aux cliniciens d'offrir des traitements préventifs appropriés afin d'améliorer la qualité de vie des patients.

La présence des auto-anticorps dans le sérum de patients sclérodermiques étant la caractéristique majeure de la maladie, leur étude s'avère fondamentale pour comprendre le mécanisme physiopathologique de la sclérodermie. Comme les auto-anticorps sont présents dans toutes les maladies auto-immunes, la compréhension de la pathogénécité d'un auto-anticorps particulier pourrait faciliter les études d'autres auto-anticorps.

RÉFÉRENCES

1. Weiner HL: Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol.Today* 18: 335-343, 1997
2. Rosen A, Casciola-Rosen L: Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death.Differ.* 6: 6-12, 1999
3. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA: Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 338: 1186-1191, 1998
4. Mayes MD: Classification and epidemiology of scleroderma. *Semin.Cutan.Med.Surg.* 17: 22-26, 1998
5. McColl GJ, Buchanan RR: Familial CREST syndrome. *J.Rheumatol.* 21: 754-756, 1994
6. Ng SC: Systemic sclerosis. *Singapore Med.J.* 33: 189-192, 1992

7. van den Hoogen FH, de Jong EM: Clinical aspects of systemic and localized scleroderma. *Curr.Opin.Rheumatol.* 7: 546-550, 1995
8. Lonzetti LS, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Goulet JR, Rich E, Choquette D, Raymond Y, Sénécal JL: Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum* 44: 735-736, 2001
9. Casiano CA, Tan EM: Recent developments in the understanding of antinuclear autoantibodies. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 111: 308-313, 1996
10. Tan EM, Chan EK, Sullivan KF, Rubin RL: Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 47: 121-141, 1988
11. Earnshaw WC, Machlin PS, Bordwell BJ, Rothfield NF, Cleveland DW: Analysis of anticentromere autoantibodies

-
- using cloned autoantigen CENP- B. Proc.Natl.Acad.Sci.
U.S.A 84: 4979-4983, 1987
12. Steen VD: Autoantibodies in systemic sclerosis.
Bull.Rheum Dis. 45: 6-8, 1996
13. Tan EM: Antinuclear antibodies: diagnostic markers for
autoimmune diseases and probes for cell biology.
Adv.Immunol. 44: 93-151, 1989
14. Russo K, Hoch S, Dima C, Varga J, Teodorescu M:
Circulating anticentromere CENP-A and CENP-B
antibodies in patients with diffuse and limited systemic
sclerosis, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid
arthritis. J.Rheumatol. 27: 142-148, 2000
15. Steen VD, Powell DL, Medsger TA, Jr.: Clinical
correlations and prognosis based on serum
autoantibodies in patients with systemic sclerosis.
Arthritis Rheum 31: 196-203, 1988
16. Kikuchi M, Inagaki T: Bibliographical study of the
concurrent existence of anticentromere and

-
- antitopoisomerase I antibodies. Clin.Rheumatol. 19: 435-441, 2000
17. von Muhlen CA, Tan EM: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin.Arthritis Rheum 24: 323-358, 1995
18. Okano Y: Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). Rheum Dis.Clin.North Am. 22: 709-735, 1996
19. Sequi J, Leigh I, Isenberg DA: Relation between antinuclear antibodies and the autoimmune rheumatic diseases and disease type and activity in systemic lupus erythematosus using a variety of cultured cell lines. Ann.Rheum Dis. 50: 167-172, 1991
20. Sonnichsen N: [Immunology and clinical picture of progressive scleroderma]. Z.Hautkr. 60: 1829-4, 1985
21. Tan FK, Arnett FC, Reveille JD, Ahn C, Antohi S, Sasaki T, Nishioka K, Bona CA: Autoantibodies to fibrillin 1 in systemic sclerosis: ethnic differences in antigen recognition and lack of correlation with specific clinical
-

-
- features or HLA alleles. *Arthritis Rheum* 43: 2464-2471, 2000
22. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, Bach JF, Piette JC: Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43: 76-84, 2000
23. Pignone A, Scaletti C, Matucci-Cerinic M, Vazquez-Abad D, Meroni PL, Del Papa N, Falcini F, Generini S, Rothfield N, Cagnoni M: Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis: significant association with vascular involvement and alveolo-capillary impairment. *Clin.Exp.Rheumatol.* 16: 527-532, 1998
24. Negi VS, Tripathy NK, Misra R, Nityanand S: Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. *J.Rheumatol.* 25: 462-466, 1998

-
25. Su LD: [Correlation between various autoantibodies in scleroderma patients and their clinical features]. *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.* 73: 658-1, 1993
 26. Bell S, Krieg T, Meurer M: Antibodies to Ro/SSA detected by ELISA: correlation with clinical features in systemic scleroderma. *Br.J.Dermatol.* 121: 35-41, 1989
 27. Vlachoyiannopoulos PG, Dafni UG, Pakas I, Spyropoulou-Vlachou M, Stavropoulos-Giokas C, Moutsopoulos HM: Systemic scleroderma in Greece: low mortality and strong linkage with HLA-DRB1*1104 allele. *Ann.Rheum Dis.* 59: 359-367, 2000
 28. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M: Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I. Clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 36: 1406-1413, 1993
 29. Mayes MD: Scleroderma epidemiology. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 22: 751-764, 1996
 30. Silman AJ: Scleroderma--demographics and survival. *J.Rheumatol.Suppl* 48: 58-61, 1997

-
31. Steen VD, Conte C, Santoro D, et al.: Twenty-year incidence survey of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 31:S57-S57, 1988 (abstr)
 32. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW: Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 351: 559-562, 1998
 33. Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL: Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood* 93: 2033-2037, 1999
 34. Aractingi S, Uzan S, Dausset J, Carosella ED: Microchimerism in human diseases. *Immunol.Today* 21: 116-118, 2000
 35. Christner PJ, Artlett CM, Conway RF, Jimenez SA: Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride. *Arthritis Rheum* 43: 2598-2605, 2000

-
36. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD: Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 44: 1359-1362, 2001
 37. Englert H, Small-McMahon J, Chambers P, O'Connor H, Davis K, Manolios N, White R, Dracos G, Brooks P: Familial risk estimation in systemic sclerosis. *Aust.N.Z.J.Med.* 29: 36-41, 1999
 38. Manolios N, Dunckley H, Chivers T, Brooks P, Englert H: Immunogenetic analysis of 5 families with multicase occurrence of scleroderma and/or related variants. *J.Rheumatol.* 22: 85-92, 1995
 39. Arnett FC: HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis). *Int.Rev.Immunol.* 12: 107-128, 1995
 40. de Juan MD, Belzunegui J, Belmonte I, Barado J, Figueroa M, Cancio J, Vidal S, Cuadrado E: An immunogenetic study of familial scleroderma. *Ann.Rheum Dis.* 53: 614-617, 1994

-
41. Raff M: Cell suicide for beginners. *Nature* 396: 119-122, 1998
 42. Zhou T, Song L, Yang P, Wang Z, Lui D, Jope RS: Bisindolylmaleimide VIII facilitates Fas-mediated apoptosis and inhibits T cell-mediated autoimmune diseases. *Nat.Med.* 5: 42-48, 1999
 43. Casiano CA, Tan EM: Antinuclear autoantibodies: probes for defining proteolytic events associated with apoptosis. *Mol.Biol.Rep.* 23: 211-216, 1996
 44. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.* 68: 251-306, 1980
 45. Andrade F, Casciola-Rosen L, Rosen A: Apoptosis in systemic lupus erythematosus. Clinical implications. *Rheum Dis.Clin.North Am.* 26: 215-27, v, 2000
 46. Grodzicky T, Elkon KB: Apoptosis in rheumatic diseases. *Am.J.Med.* 108: 73-82, 2000
 47. Lorenz HM, Herrmann M, Winkler T, Gaipf U, Kalden JR: Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis.* 5: 443-449, 2000

-
48. Lunardi C, Bason C, Navone R, Millo E, Damonte G, Corrocher R, Puccetti A: Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat.Med.* 6: 1183-1186, 2000
 49. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G: Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody- dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 43: 2550-2562, 2000
 50. Stummvoll GH, Aringer M, Smolen JS, Koller M, Kiener HP, Steiner CW, Bohle B, Knobler R, Graninger WB: Derangement of apoptosis-related lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis. *Rheumatology.(Oxford)* 39: 1341-1350, 2000
 51. Casciola-Rosen L, Wigley F, Rosen A: Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J.Exp.Med.* 185: 71-79, 1997

-
52. Moudgil KD: Determinant hierarchy: shaping of the self-directed T cell repertoire, and induction of autoimmunity. *Immunol.Lett.* 68: 251-256, 1999
 53. Bockenstedt LK, Gee RJ, Mamula MJ: Self-peptides in the initiation of lupus autoimmunity. *J.Immunol.* 154: 3516-3524, 1995
 54. Simitsek PD, Campbell DG, Lanzavecchia A, Fairweather N, Watts C: Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J.Exp.Med.* 181: 1957-1963, 1995
 55. Casciola-Rosen LA, Anhalt GJ, Rosen A: DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J.Exp.Med.* 182: 1625-1634, 1995
 56. Shresta S, MacIvor DM, Heusel JW, Russell JH, Ley TJ: Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 5679-5683, 1995
-

-
57. Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A: Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J.Exp.Med.* 190: 815-826, 1999
 58. Lee TL, Lin YC, Mochitate K, Grinnell F: Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, annexins II and VI, and beta 1 integrin receptors. *J.Cell Sci.* 105 (Pt 1): 167-177, 1993
 59. Hsu TC, Lee TL, Tsay GJ: Autoantigen components recognizable by scleroderma sera are exported via ectocytosis of fibroblasts. *Br.J.Rheumatol.* 36: 1038-1044, 1997
 60. Albert LJ, Inman RD: Molecular mimicry and autoimmunity. *N.Engl.J.Med.* 341: 2068-2074, 1999
 61. Earnshaw WC, Sullivan KF, Machlin PS, Cooke CA, Kaiser DA, Pollard TD, Rothfield NF, Cleveland DW: Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J.Cell Biol.* 104: 817-829, 1987

-
62. Cooke CA, Bernat RL, Earnshaw WC: CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore. *J.Cell Biol.* 110: 1475-1488, 1990
 63. Yoda K, Nakamura T, Masumoto H, Suzuki N, Kitagawa K, Nakano M, Shinjo A, Okazaki T: Centromere protein B of African green monkey cells: gene structure, cellular expression, and centromeric localization. *Mol.Cell Biol.* 16: 5169-5177, 1996
 64. Van Hooser AA, Mancini MA, Allis CD, Sullivan KF, Brinkley BR: The mammalian centromere: structural domains and the attenuation of chromatin modeling. *FASEB J.* 13 Suppl 2: S216-S220, 1999
 65. Seki N, Saito T, Kitagawa K, Masumoto H, Okazaki T, Hori TA: Mapping of the human centromere protein B gene (CENPB) to chromosome 20p13 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 24: 187-188, 1994
 66. Muro Y, Masumoto H, Yoda K, Nozaki N, Ohashi M, Okazaki T: Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box. *J.Cell Biol.* 116: 585-596, 1992
-

-
67. Faulkner NE, Vig B, Echeverri CJ, Wordeman L, Vallee RB: Localization of motor-related proteins and associated complexes to active, but not inactive, centromeres. *Hum.Mol.Genet.* 7: 671-677, 1998
 68. Masumoto H, Masukata H, Muro Y, Nozaki N, Okazaki T: A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J.Cell Biol.* 109: 1963-1973, 1989
 69. Yoda K, Kitagawa K, Masumoto H, Muro Y, Okazaki T: A human centromere protein, CENP-B, has a DNA binding domain containing four potential alpha helices at the NH2 terminus, which is separable from dimerizing activity. *J.Cell Biol.* 119: 1413-1427, 1992
 70. Armas-Portela R, Kremer L, Avila J: The centromere protein CENP-B behaves as a microtubule-associated protein. *Acta Histochem.Suppl* 41: 37-43, 1991
 71. Kitagawa K, Masumoto H, Ikeda M, Okazaki T: Analysis of protein-DNA and protein-protein interactions of centromere protein B (CENP-B) and properties of the

-
- DNA-CENP-B complex in the cell cycle. *Mol.Cell Biol.* 15:
1602-1612, 1995
72. Muro Y, Masumoto H, Okazaki T, Ohashi M: Purification
of a human centromere antigen (CENP-B) and application
of DNA immunoprecipitation to quantitative assay for
anti-CENP-B antibodies. *J.Invest Dermatol.* 97: 378-380,
1991
73. Barbosa-Cisneros O, Fraire-Velazquez S, Moreno J,
Herrera-Esparza R: CENP-B autoantigen is a conserved
protein from humans to higher plants: identification of
the aminoterminal domain in *Phaseolus vulgaris*.
Rev.Rhum.Engl.Ed 64: 368-374, 1997
74. Stahnke G, Meier E, Scanarini M, Northemann W:
Eukaryotic expression of recombinant human centromere
autoantigen and its use in a novel ELISA for diagnosis of
CREST syndrome. *J.Autoimmun.* 7: 107-118, 1994
75. Verheijen R, de Jong BA, Obery E, van Venrooij WJ:
Molecular cloning of a major CENP-B epitope and its use
for the detection of anticentromere autoantibodies.
Mol.Biol.Rep. 16: 49-59, 1992
-

76. Sugimoto K, Muro Y, Himeno M: Anti-helix-loop-helix domain antibodies: discovery of autoantibodies that inhibit DNA binding activity of human centromere protein B (CENP- B). *J.Biochem.(Tokyo)* 111: 478-483, 1992
77. Parveen S, Morshed SA, Nishioka M: High prevalence of antibodies to recombinant CENP-B in primary biliary cirrhosis: nuclear immunofluorescence patterns and ELISA reactivities. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 10: 438-445, 1995
78. Whyte J, Soriano E, Earnshaw WC, McHugh NJ: Frequency of autoantibodies to a major epitope on the carboxyl terminal fragment of CENP-B in patients with autoimmune disease. *Br.J.Rheumatol.* 34: 407-412, 1995
79. Lui M, Tempst P, Erdjument-Bromage H: Methodical analysis of protein-nitrocellulose interactions to design a refined digestion protocol. *Anal.Biochem.* 241: 156-166, 1996

-
80. Wong C, Sridhara S, Bardwell JC, Jakob U: Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques* 28: 426-8, 430, 432, 2000
 81. Bocanegra JA, Bejarano LA, Valdivia MM: Expression of the highly toxic centromere binding protein CENP-B in *E. coli* using the pET system in the absence of the inducer IPTG. *Biotechniques* 22: 798-800, 802, 1997
 82. Suter-Crazzolara C, Unsicker K: Improved expression of toxic proteins in *E. coli*. *Biotechniques* 19: 202-204, 1995
 83. Goff SA, Goldberg AL: Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* 41: 587-595, 1985
 84. Hall MN, Gabay J, Debarbouille M, Schwartz M: A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature* 295: 616-618, 1982
 85. Iserentant D, Fiers W: Secondary structure of mRNA and efficiency of translation initiation. *Gene* 9: 1-12, 1980

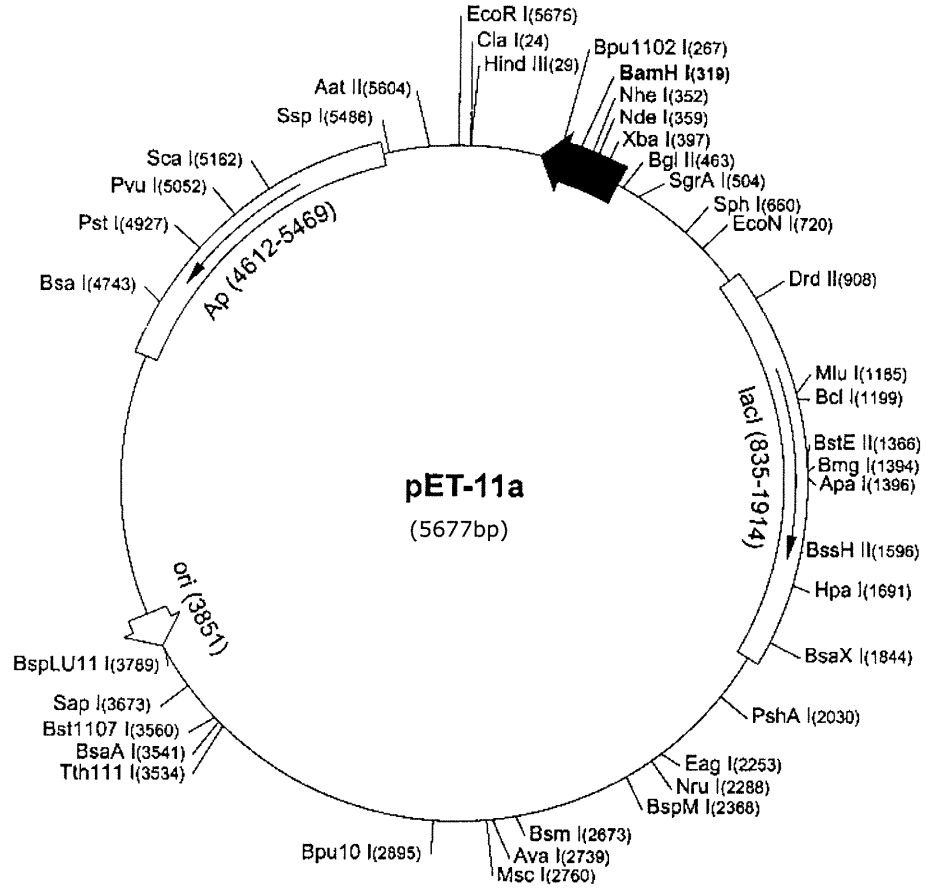
86. Looman AC, Bodlaender J, Comstock LJ, Eaton D, Jhurani P, de Boer HA, van Knippenberg PH: Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in Escherichia coli. EMBO J. 6: 2489-2492, 1987
87. Furlong J, Meighan M, Conner J, Murray J, Clements JB: Methods for improved protein expression using pET vectors. Nucleic Acids Res. 20: 4668, 1992
88. Moore JT, Uppal A, Maley F, Maley GF: Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. Protein Expr.Purif. 4: 160-163, 1993
89. Kadonaga JT, Tjian R: Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 83: 5889-5893, 1986
90. Nakamura RM, Tan EM: Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. Clin.Lab Med. 12: 1-23, 1992

-
91. Spencer-Green G, Alter D, Welch HG: Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am.J.Med.* 103: 242-248, 1997
 92. Rothfield N, Whitaker D, Bordwell B, Weiner E, Senécal JL, Earnshaw W: Detection of anticentromere antibodies using cloned autoantigen CENP-B. *Arthritis Rheum* 30: 1416-1419, 1987
 93. Vazquez-Abad D, Wallace S, Senécal JL, Joyal F, Roussin A, Earnshaw WC, Rothfield N: Anticentromere autoantibodies. Evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein CENP-B as antigen. *Arthritis Rheum* 37: 248-252, 1994
 94. Vazquez-Abad D, Russell CA, Cusick SM, Earnshaw WC, Rothfield NF: Longitudinal study of anticentromere and antitopoisomerase-I isotypes. *Clin.Immunol. Immunopathol.* 74: 257-270, 1995
 95. Vazquez-Abad D, Grodzicky T, Senécal JL: Anticentromere autoantibodies in patients without Raynaud's disease or systemic sclerosis. *Clin.Immunol.* 90: 182-189, 1999

96. Peter JF, Tomer KB: A general strategy for epitope mapping by direct MALDI-TOF mass spectrometry using secondary antibodies and cross-linking. *Anal.Chem.* 73: 4012-4019, 2001

ANNEXES

**Annexe I. Carte des sites de restrictions du vecteur
pET11a (Novagen)**



**Annexe II. Carte des sites de restrictions du vecteur
pET19b (Novagen)**

