

50376
1984
56

50376.
4984.
56.

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ès SCIENCES NATURELLES

OPTION BIOCHIMIE

par

Anne LAINE-BASSEZ

L' α_1 -ANTICHYMOTRYPSINE HUMAINE. PURIFICATION. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES. RÉACTION AVEC DIFFÉRENTES PROTÉASES.



présentée le 11 avril 1984 devant le jury composé de :

Président : Professeur J. MONTREUIL

Rapporteurs : Docteur J.P. MARTIN
Professeurs P. ROUSSEL
A. VERBERT

Examineurs : Professeur G. BISERTE
Docteur A. HAYEM

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRIDOUX Michel	Chimie physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL JACQUES	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques

Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique atomique et moléculaire riques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux

M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie Inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WERNER Georges	Informatique fondamentale appliquée
M. WOSNIAK Michel	Hydrométallurgie
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

Ce travail a été effectué à l'Unité de Recherches n° 16 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Directeur : Professeur Philippe ROUSSEL) sous la direction de Madame A. HAYEM.

Les enzymes d'origine humaine ont été préparés par Mademoiselle M. DAVRIL et Madame M. LOHEZ. Les mesures spectrophotométriques des activités enzymatiques ainsi que les transformations chimiques de la molécule d'inhibiteur ont été réalisées par Mademoiselle M. DAVRIL.

Les compositions en acides aminés et en sucres ont été effectuées dans les services communs de l'Unité n° 16 dirigés respectivement par Monsieur le Professeur P. DEGAND et Madame G. LAMBLIN.

Le groupe de chercheurs dont je fais partie bénéficie de l'aide de Mademoiselle M.P. DUCOURROUBLE.

Les documents photographiques présentés dans ce travail ont été réalisés par Monsieur C. VANDEPERRE.

La dactylographie de cette Thèse a été effectuée par Madame I. DELANNOY.

A la mémoire de Monsieur le Professeur HAVEZ qui m'accueillit
à l'Unité et permit ainsi mon orientation vers la Recherche.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur ROUSSEL pour l'intérêt qu'il porte à mon travail. Je le remercie des remarques constructives qu'il a formulées pour la présentation de cette thèse dont il a aimablement accepté d'être rapporteur.

Qu'il me soit également permis d'exprimer toute ma gratitude à :

Monsieur le Professeur MONTREUIL qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Monsieur le Docteur MARTIN et Monsieur le Professeur VERBERT qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Monsieur le Professeur BISERTE qui a bien voulu être examinateur de cette thèse.

°
° °

La présentation de ce travail me permet de remercier cordialement les membres de l'équipe dont je fais partie :

Madame HAYEM,

Vous avez suivi jour après jour la progression de ce travail. Vous m'avez toujours guidée avec compétence. Devant les difficultés, vos encouragements, vos conseils et votre confiance n'ont jamais manqué, ils m'ont permis d'aller de l'avant et je vous en remercie vivement. Votre enthousiasme, votre bonne humeur et votre plaisir de faire de la Recherche créent une ambiance chaleureuse de travail que j'apprécie beaucoup.

Monique DAVRIL,

Toute une partie de ce travail n'a pu être menée à bien qu'avec votre aimable collaboration et votre compétence. Je vous remercie aussi de votre disponibilité et du bon accueil que vous m'avez toujours réservé. Le partage de vos connaissances dans un domaine complémentaire au mien a été très fructueux.

Marie Paule DUCOUROUBLE,

J'ai toujours pu compter sur ton aide efficace. Ta minutie, l'intérêt que tu portes à notre travail d'équipe et ta bonne humeur sont très précieux, je t'en remercie.

./...

Dominique MARKO,

Tu ne fais partie de l'équipe que depuis quelques mois, mais j'apprécie beaucoup ton enthousiasme et ta gaieté. Je te remercie également des discussions enrichissantes que nous avons eues.

Marie SMYRLAKI,

Je te remercie de l'intérêt que tu portes à mon travail et de la gentillesse que tu m'as toujours témoignée.

Je tiens également à remercier particulièrement Isabelle DELANNOY :

Tu as assuré la dactylographie de cette thèse avec beaucoup de gentillesse et de patience. Par ton savoir-faire, tu as largement contribué à la présentation de ce travail, je t'en remercie très sincèrement.

Que tous ceux qui m'ont accordé leur aide, leurs conseils,
leur soutien et leur amitié trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Nos recherches ont bénéficié de l'aide de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contrat CRL n° 82-50-44).

Elles ont fait l'objet :

. de publications :

- Publication n° 1 présentée dans le chapitre II

Purification and characterization of α_1 -antichymotrypsin from human pleural fluid and human serum.

LAINE, A. and HAYEM, A. (1981)

Biochim. Biophys. Acta, 668, 429-438.

- Publication n° 2 présentée dans le chapitre III

Interaction between human serum α_1 -antichymotrypsin and human leukocyte cathepsin G. Complex formation and production of a modified inhibitor.

LAINE, A., DAVRIL, M. and HAYEM, A. (1982)

Biochem. Biophys. Res. Commun., 105, 186-193.

- Publication n° 3 présentée dans le chapitre III

Comparison of the interactions of human α_1 -antichymotrypsin with human leukocyte cathepsin G and bovine chymotrypsin.

LAINE, A., DAVRIL, M., HAYEM, A. and LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1982).

Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 337-344.

- Publication n° 4

Interaction of α_1 -antichymotrypsin with chymotrypsin.

LAINE, A., DAVRIL, M. and HAYEM, A.

Eur. J. Biochem. in press.

. d'un poster :

Time-course study of the interaction of α_1 -antichymotrypsin with chymotrypsin.

LAINE, A., HAYEM, A. and DAVRIL, M. (1983)

15th FEBS Meeting, Brussels.

. d'une conférence :

Human α_1 -antichymotrypsin : purification, properties and reactions with some serine proteases.

LAINE, A., HAYEM, A. and DAVRIL, M. (1983)

2e Symposium sur les marqueurs de l'inflammation. Lyon.

ABREVIATIONS UTILISEES

ADN	:	acide désoxyribonucléique
α_1 Achy	:	α_1 -antichymotrypsine
α_2^M	:	α_2 -macroglobuline
α_1 PI	:	α_1 -antiprotéase (α_1 -antitrypsine) ou α_1 -protease-inhibitor
Aminoéthyl 8	:	N - (iodoéthyl) - trifluoroacétamide
AP	:	α_2 -antiplasmine
AT	:	antithrombine III
CM-Sephadex	:	carboxyméthyl Sephadex
DEAE-Sephadex	:	diéthylaminoéthyl Sephadex
DFP	:	diisopropylfluorophosphate
EDTA	:	acide éthylènediamine tétraacétique
Hepes	:	acide [(hydroxy-2-éthyl) -4-pipérazinyl-1] -2-éthane sulfonique
HPLC	:	chromatographie en phase liquide à haute pression
I α I	:	inter- α -trypsine inhibiteur
M_r	:	masse moléculaire relative
pI	:	point isoélectrique
PMSF	:	phénylméthylsulfonyl fluorure
PTH	:	phénylthiohydantoïne
QAE-Sephadex	:	diéthyl- (2-hydroxypropyl) -aminoéthyl Sephadex
SDS	:	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	:	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SP-Sephadex	:	sulphopropyl Sephadex
STI	:	inhibiteur trypsique du soja
TLCK	:	N- α -Tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone
Tris	:	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

INTRODUCTION

Dans un précédent travail portant sur l'identification des protéides de la sécrétion bronchique humaine (114), milieu biologique dont l'étude constitue un des thèmes de recherches de l'unité INSERM n° 16, nous avons souligné l'existence quasi permanente, en proportions variables, de plusieurs inhibiteurs de sérine-protéases antigéniquement rattachés aux inhibiteurs sériques suivants : l' α_2 -macroglobuline, l' α_1 -antiprotéase (ou α_1 -antitrypsine) et l' α_1 -antichymotrypsine. A ces inhibiteurs s'ajouterait, selon certains auteurs(81,153) un inhibiteur de petite taille moléculaire ($M_r = 14\ 000$), stable en milieu acide, non rattaché antigéniquement à une protéine connue du sérum, mais dont la présence dans le sérum même a cependant pu être montrée récemment par l'utilisation de techniques radio-immunologiques (65).

Depuis plusieurs années déjà, les inhibiteurs sériques de sérine-protéases sont, comme nous le verrons ultérieurement, l'objet de très nombreuses études tant structurales que fonctionnelles, mais peu de travaux ont été effectués sur l' α_1 -antichymotrypsine. Cet inhibiteur caractérisé par sa propriété d'inhiber la chymotrypsine est soupçonné d'avoir un rôle important dans la sécrétion bronchique ; en effet les enzymes de type chymotrypsique et l'élastase qui proviennent des leucocytes jouent ensemble un rôle déterminant dans la dégradation de l'élastine et du collagène du poumon qui survient dans des affections comme l'emphysème pulmonaire.

Notre but à long terme est donc de comparer les propriétés physico-chimiques et les capacités d'inhibition enzymatique de l' α_1 -antichymotrypsine isolée de la sécrétion bronchique avec celles de son homologue sérique. Etant donné le peu de connaissances acquises jusqu'alors sur cet inhibiteur, nous avons entrepris dès 1977 un travail de purification de l' α_1 -antichymotrypsine à partir de liquide pleural, puis à partir du sérum humain normal pour déterminer les propriétés physico-chimiques de ce constituant et étudier ensuite les interactions de cet inhibiteur avec diverses protéases : ce travail constitue l'objet de cette thèse.

Dans la première partie, nous exposons des généralités sur les sérine-protéases et les inhibiteurs sériques de sérine-protéases, puis nous effectuons une revue détaillée des connaissances acquises sur les principaux inhibiteurs sériques concernant leurs propriétés et leurs mécanismes d'action.

La deuxième partie sera consacrée à la mise au point du protocole de purification et aux propriétés physico-chimiques de l'inhibiteur purifié.

La troisième partie concernera les études des interactions de l' α_1 -antichymotrypsine avec quatre protéases différentes et la présentation d'un modèle possible pour le mécanisme d'action de l' α_1 -antichymotrypsine sur les sérine-protéases.

CHAPITRE I

REVUE SUR LES SERINE-PROTEASES ET LEURS INHIBITEURS DU PLASMA HUMAIN

- I - 1 LES SERINE-PROTEASES

- I - 2 LES INHIBITEURS DE SERINE-PROTEASES DU PLASMA HUMAIN

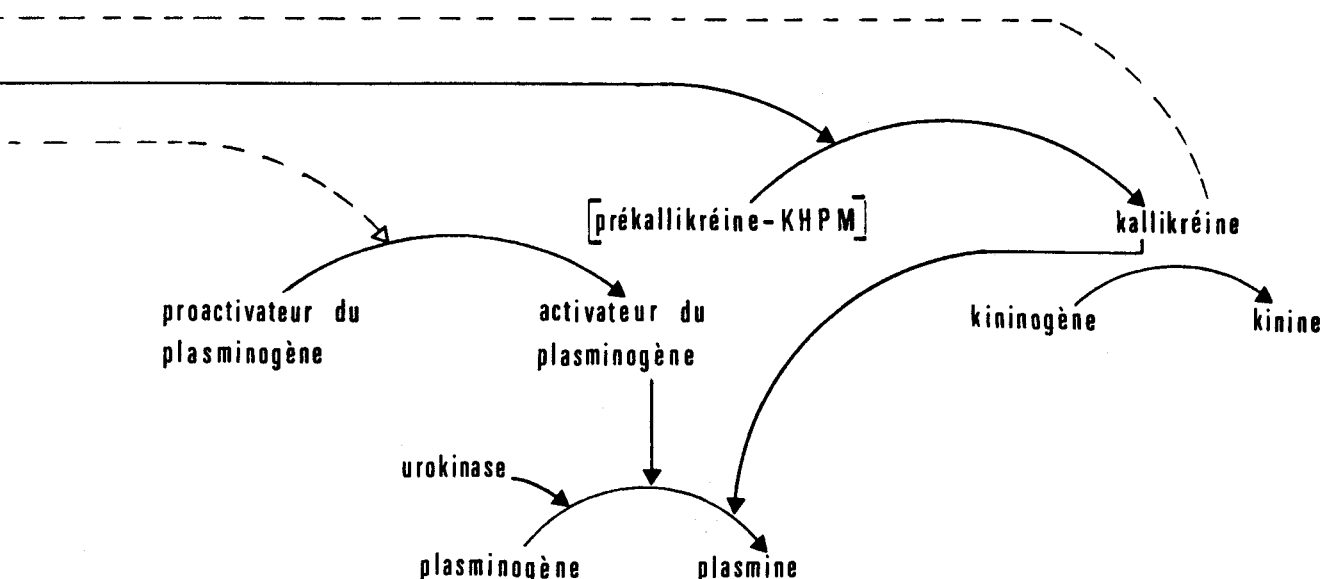
- I - 3 PROPRIETES ET MODE D'ACTION DES PRINCIPAUX INHIBITEURS DE
SERINE PROTEASES DU PLASMA HUMAIN : ETAT DES CONNAISSANCES.
 - I - 3.1 α_2 -macroglobuline (α_2 M)
 - I - 3.2 α_1 -antiprotéase (α_1 PI)
 - I - 3.3 Antithrombine III (AT)
 - I - 3.4 α_2 -antiplasmine (AP)
 - I - 3.5 α_1 -antichymotrypsine (α_1 Achy)

Pendant très longtemps, on a pensé que les enzymes protéolytiques étaient presque exclusivement associés au processus de la digestion et de la dégradation des protéines. Il est maintenant largement démontré que ces enzymes ont aussi à jouer un rôle dans la régulation en effectuant des coupures sélectives et restrictives de liaisons peptidiques : ce processus est appelé "protéolyse limitée " (145).

La protéolyse limitée représente très vraisemblablement la toute première étape dans la dégradation des protéines et constitue par ailleurs la dernière étape dans la synthèse d'un grand nombre de protéines biologiquement actives. Les exemples physiologiques de protéolyse limitée les plus fréquents concernent des réactions au cours desquelles un précurseur inactif, ou zymogène, est transformé en constituant actif par la coupure d'une ou plusieurs liaisons peptidiques. Pour certains zymogènes, l'activation peut se faire en une seule étape, tandis que pour d'autres, elle peut nécessiter de multiples étapes en cascade qui servent à amplifier les réponses physiologiques à différents stimuli : un exemple typique de cascade est constitué par le processus de la coagulation sanguine. Un autre moyen de contrôle peut résulter d'interactions entre plusieurs systèmes de réactions en cascade : c'est ainsi qu'interagissent le système de la coagulation sanguine, celui de la fibrinolyse et celui de la formation de la kinine (figure 1).

La coupure d'une liaison peptidique est un processus irréversible, car on ne connaît pas de mécanisme biologique simple pour que se reforme une liaison peptidique qui a été coupée. Par conséquent, le contrôle de l'expression des protéases doit être très efficace ; il est effectué par des inhibiteurs.

Les inhibiteurs protéiques de protéases sont omniprésents. Ils ont été localisés dans de nombreux tissus d'animaux et de plantes tout comme dans les microorganismes. Leur rôle physiologique est d'empêcher la protéolyse anarchique que ce soit dans des mécanismes de régulation ou de défense contre des protéases exogènes.



Facteurs

I	: fibrinogène
II	: prothrombine
III	: thromboplastine tissulaire - facteur tissulaire
IV	: ion calcium
V	: proaccélélerine
VII	: proconvertine
VIII	: facteur antihémophilique A
IX	: thromboplastine plasmatique
X	: facteur Stuart
XI	: facteur PTA (plasma thromboplastine antécédent)
XII	: facteur Hageman
XIII	: facteur stabilisant de la fibrine
PL	: facteur phospholipidique, d'origine plaquettaire habituellement
KHPM	: kininogène de M_r élevée, précurseur de la bradykinine. Le KHPM agit comme cofacteur de l'activité du XII_a qui convertit le XI en XI_a et la prékallikréine en kallikréine.

Figure 1 : Interactions entre les systèmes d'activation des protéases impliquées dans la coagulation sanguine, la fibrinolyse et la formation de la kinine d'après NEURATH et WALSH (145) et McKEE, P.A., p : 1533 dans : The metabolic basis of inherited disease, fifth edition (STANBURY, J.B., WYNGAARDEN, J.B., FREDRICKSON, D.S., GOLDSTEIN, J.L., and BROWN, M.S., eds) McGRAW. Hill Book Company.

En traits discontinus sont représentées les étapes dont le mécanisme n'a pas encore été totalement démontré.
Les complexes réactifs sont écrits entre crochets.

A l'exception des α -macroglobulines qui inhibent les protéases de chacune des quatre classes (métallo-, thiol-, carboxyl-, sérine-protéases), un inhibiteur de protéases inhibe des protéases d'une même classe. L'ensemble des inhibiteurs le plus étudié est celui des inhibiteurs de sérine-protéases.

Après la description de quelques caractéristiques des sérine-protéases et la présentation générale des inhibiteurs de sérine-protéases du plasma humain, nous aborderons plus en détail les connaissances actuelles sur les principaux inhibiteurs sériques.

I - 1 LES SERINE - PROTEASES

Le groupe des sérine-protéases se compose d'un très grand nombre d'enzymes dont la particularité est de posséder un résidu de sérine indispensable à leur activité. Un test simple pour identifier ces enzymes consiste en l'inhibition de leur activité d'hydrolase par la réaction du résidu de sérine avec le diisopropylfluorophosphate (DFP) (212).

Le mécanisme de catalyse de chaque enzyme n'est pas encore connu. D'après les connaissances acquises pour l' α -chymotrypsine, deux autres résidus d'acides aminés (1 résidu d'histidine et 1 résidu d'acide aspartique) seraient, avec le résidu de sérine, impliqués dans l'action catalytique. La structure primaire et la structure tridimensionnelle de la chymotrypsine permettent de proposer une explication du mécanisme catalytique de cet enzyme. Le fait qu'un seul des 27 résidus de sérine de la molécule (en position 195) soit un puissant nucléophile s'explique par une réaction spécifique dans l'espace de 3 résidus d'acides aminés (Asp 102, His 57 et Ser 195) qui crée une délocalisation électronique faisant intervenir des liaisons hydrogènes entre ces acides aminés (figure 2). L'élimination du proton de l'hydroxyle de la sérine en position 195 transforme l'atome d'oxygène en puissant nucléophile (197).

Des études cinétiques détaillées montrent que le mécanisme d'hydrolyse se déroule en 2 étapes : il y a d'abord une acylation de l'enzyme, avec libération d'un groupement amine primaire libre, suivie d'une désacylation de l'enzyme qui entraîne la formation d'un produit acide.

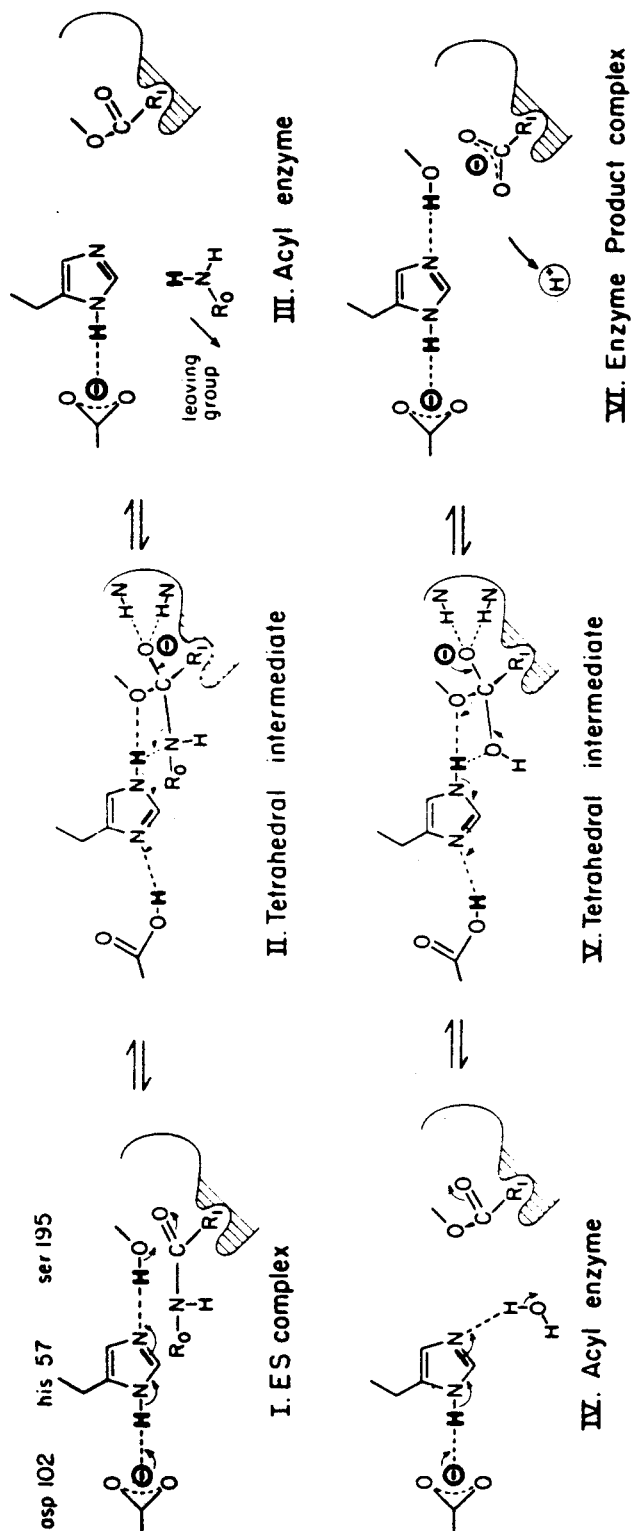


Figure 2 : Mécanisme de 1'hydrolyse de peptides ou d'amides par une sérine protéase
(la chymotrypsine bovine) d'après STROUD et coll (197)

Bien que les substrats naturels des sérine-protéases soient des protéines ou des fragments de protéines, ces enzymes ont été surtout étudiés en utilisant comme substrats des peptides synthétiques, peptides amidés ou estérifiés. Tous les résultats obtenus montrent que les sérine-protéases sont des endopeptidases. Les sérine-protéases possèdent une forte activité estérasique envers les esters analogues aux substrats peptidiques spécifiques. De plus, l'activité d'hydrolase s'étend à une variété de constituants dans lesquels le groupement acylé est lié à un groupement tel que le nitrophénol ou l'imidazole.

Il a été possible de définir la notion de spécificité des enzymes en comparant les vitesses relatives de réaction sur une variété de substrats synthétiques. Cela va de la spécificité étroite des trypsines qui exercent uniquement leur activité sur la liaison peptidique du côté carboxylique de l'arginine et de la lysine, à la spécificité assez large des subtilisines qui peuvent couper des liaisons entre une grande variété d'acides aminés. Il faut noter cependant que la spécificité envers des substrats protéiques naturels peut être influencée non seulement par les résidus d'acides aminés adjacents à la liaison peptidique susceptible d'être coupée, mais aussi par l'environnement créé par la structure primaire ou tertiaire de la molécule.

Une autre méthode peut être utilisée pour définir spécifiquement ces enzymes : elle consiste à alkyler stoechiométriquement le résidu d'histidine impliqué dans le site actif par une chlorométhyl cétone spécifique. Une application de cette réaction est la limitation de la spécificité d'une préparation enzymatique : le traitement, par exemple, par la N- α -Tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone (TLCK) permet de bloquer irréversiblement la trypsine qui pourrait éventuellement contaminer une préparation de chymotrypsine.

Les sérine-protéases sont très largement répandues dans les organismes vivants. Leurs caractéristiques ont d'abord été déterminées pour les enzymes digestifs du pancréas de mammifères. Plus récemment, de tels enzymes digestifs ont été trouvés chez de nombreux Vertébrés et leur fonction ne serait pas, dans ce cas non plus, limitée à des fonctions digestives. Des protéases sensibles au DFP ont également été identifiées chez les Invertébrés.

Chez les Vertébrés possédant un pancréas distinct, les protéases sont présentes sous la forme de précurseurs inactifs, ou zymogènes, qui doivent subir une activation pour posséder une activité enzymatique. Les protéases impliquées dans la coagulation sanguine, par exemple, thrombine et plasmine, sont produites sous forme de zymogènes, prothrombine et plasminogène, présents dans le sang circulant. Tous les zymogènes connus de sérine-protéases peuvent être "in vitro" transformés en enzymes actifs par l'action de la trypsine : la coupure d'une seule liaison peptidique spécifique suffit dans cette activation. "In vivo", les phénomènes d'activation de ces zymogènes mettent en oeuvre des systèmes complexes d'enzymes qui sont présents dans le sang et dans les tissus.

L'examen détaillé des séquences en acides aminés a montré que les enzymes comme la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase, la plasmine et la thrombine ont entre eux une homologie de structure primaire et même tertiaire et qu'ils ont un mécanisme d'action analogue : ils constituent une famille homologue. Il existe cependant plus d'une famille de sérine-protéases. En effet, les subtilisines, bien qu'étant des sérine-protéases du point de vue fonctionnel, ne présentent pas d'homologie de structure avec la famille précédente.

Dans une même espèce animale, il est possible de rencontrer des enzymes pouvant avoir des spécificités qui se recouvrent partiellement. Plusieurs allotypes du même enzyme peuvent exister dans une espèce donnée (la trypsine du chien de mer, par exemple). On peut également observer des dérivés d'enzymes encore actifs alors qu'ils sont partiellement dégradés à la suite d'une autolyse ou d'une attaque protéolytique. Il en résulte que de très nombreuses formes de sérine-protéases peuvent être séparées, mais qu'elles catalysent toutes le même type d'hydrolyse.

I - 2 LES INHIBITEURS DE SERINE-PROTEASES DU PLASMA HUMAIN.

Ils forment une famille de constituants particulièrement étudiés depuis un peu plus de vingt ans. Dans leur première revue sur les inhibiteurs de protéases, HEIMBURGER et coll (77) en dénombrent six. Deux autres inhibiteurs s'ajoutent à cette liste en 1974 (78). Actuellement, neuf inhibiteurs

de sérine-protéases sont identifiés dans le plasma humain. La mise au point d'une technique simple permettant le repérage des inhibiteurs de protéases (182) a été très utile pour la mise en évidence de ces constituants dans le plasma humain.

Dès 1955, JACOBSSON (85) montre que le principal inhibiteur tryptique du sérum est une α_1 -globuline. A la même époque, SCHULTZE et coll (177) isolent l' α_1 -3,5 S-glycoprotéine dont les propriétés inhibitrices envers la trypsine sont démontrées en 1962 (178) : cette glycoprotéine est alors appelée α_1 -anti-trypsine. En raison du grand nombre de sérine-protéases qu'elle est capable d'inhiber, PANNELL et coll (158) préfèrent, en 1974, la dénommer " α_1 -proteinase-inhibitor" que nous traduisons par α_1 -antiprotéase.

L' α_2 -macroglobuline est déjà isolée en 1954 (33), mais son identification comme inhibiteur de protéases n'a lieu qu'en 1963 (180).

L' α_1 -antichymotrypsine est isolée et caractérisée en 1962 par SCHULTZE et coll (179). Ses propriétés inhibitrices découvertes en 1965 (75) en font alors l'inhibiteur le plus spécifique du sérum.

L'antithrombine III est purifiée en 1967 par ABILDGAARD (1) et par HEIMBURGER (76).

L'inter- α -trypsine inhibiteur est décrit pour la première fois en 1961 sous le nom de protéine π par STEINBUCH (196) et c'est en 1965 que son rôle d'inhibiteur est reconnu (74).

Le C_{1S} -inactivateur est purifié par PENSKY et coll (160) dès 1961. SCHULTZE et coll (179) isolent en 1962 une α_2 -neuraminoglycoprotéine dont on démontre en 1969 (161) qu'elle est identique au C_{1S} -inactivateur.

En 1973, MILLER-ANDERSON et coll (133) découvrent la β -lipoprotéine qui inhibe la thrombine très rapidement mais qui, contrairement à l'antithrombine III, est inactivée par l'héparine.

L'inhibiteur de l'activation du plasminogène isolé en 1973 par HEDNER (73) n'a pas d'identité immunologique avec les inhibiteurs connus de la plasmine. Il a une grande importance physiologique, puisque le plasminogène est le précurseur d'une des protéases plasmatiques les plus importantes. En fait, la définition de cet inhibiteur n'a pas été facile en raison des problèmes posés par la difficulté de distinguer l'inhibition de la plasmine de l'inhibition de la transformation du plasminogène en plasmine.

En 1976, un inhibiteur de la plasmine, l' α_2 -antiplasmine, est isolé simultanément par trois équipes différentes (45, 140, 143).

I - 3 PROPRIETES ET MODE D'ACTION DES PRINCIPAUX INHIBITEURS DE SERINE-PROTEASES DU PLASMA HUMAIN : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES.

Les propriétés physico-chimiques et les connaissances acquises sur le mode d'action de l' α_2 -macroglobuline, l' α_1 -antiprotéase (ou α_1 -antitrypsine), l'antithrombine III, l' α_2 -antiplasmine vont maintenant être présentées en détail. Cette revue permettra dans la suite de notre travail de proposer, à la lumière de tous ces éléments, un mécanisme d'action de l' α_1 -antichymotrypsine sur les protéases qu'elle est capable d'inhiber. En ce qui concerne cet inhibiteur, nous nous limiterons dans cette revue à la présentation des résultats publiés avant le début de notre travail.

I - 3.1 α_2 -macroglobuline (α_2M).

L' α_2M est une glycoprotéine plasmatique possédant une masse moléculaire relative très élevée : elle est en effet estimée à 725 000 (101). Le taux sérique normal est compris entre 1,5 et 4 g/litre. La partie glycanique de la molécule représente environ 10 % en poids. La molécule est constituée par l'assemblage de 4 sous-unités qui ont des propriétés immunologiques et électrophorétiques identiques (47). Deux dimères constitués chacun par 2 sous-unités reliées entre elles par des ponts disulfures forment l'édifice complet de la molécule d' α_2M maintenu par des interactions non covalentes. Le tétramère d' α_2M peut être dissocié en 2 parties par dénaturation par l'urée, par abaissement du pH ou par le SDS. La réduction douce avec ou sans dénaturation aboutit à la dissociation du tétramère en ses 4 sous-unités ($M_r = 185\ 000$) (101).

L' α_2M se distingue des autres inhibiteurs plasmatiques de protéases, par sa large spécificité et le mécanisme selon lequel elle réagit avec les protéases (72). L' α_2M réagit avec des protéases faisant partie de

chacune des 4 classes catalytiques (carboxyl-, thiol-, sérine- et métalloprotéases) y compris avec certaines endopeptidases ayant une spécificité limitée telles les collagénases de mammifères (194). La vitesse de réaction des protéases avec l' α_2 M varie selon les enzymes. La première réaction d'une protéase avec l' α_2 M met en jeu le site actif de l'enzyme ; il n'est donc pas surprenant que la présence de substrats compétitifs et d'inhibiteurs fasse diminuer la vitesse de réaction d'une protéase avec l' α_2 M. Quand une protéase réagit avec l' α_2 M et est inhibée par elle, elle est irréversiblement liée à l' α_2 M (5, 173). Il est possible d'observer le transfert d'enzymes sur l' α_2 M à partir de complexes avec d'autres inhibiteurs alors qu'un transfert d'enzyme à partir de l' α_2 M vers d'autres inhibiteurs n'a jamais été décrit (152).

Toutes les protéases avec lesquelles l' α_2 M réagit semblent se lier à l' α_2 M selon le même procédé de sorte qu'une présaturation de l' α_2 M par une protéase empêche la fixation ultérieure d'une autre protéase. Chaque molécule d' α_2 M semble donc posséder un nombre fixe de sites de liaison. Lorsqu'il est fixé par l' α_2 M, l'enzyme est gênée stériquement pour interagir avec ses substrats, ses inhibiteurs et ses anticorps. L'enzyme lié se comporte comme s'il était entièrement "encerclé" (pris au piège) par la molécule d'inhibiteur. Mais si l'enzyme liée ne conserve que peu ou pas d'activité enzymatique sur un substrat macromoléculaire, par contre il peut conserver de 80 à 100% de son activité à l'égard des substrats de petite taille moléculaire. Le fait que l'enzyme lié conserve une certaine activité catalytique montre que le site actif de l'enzyme ne doit pas être impliqué dans le maintien de la liaison avec l' α_2 M (194).

En 1974, BARRETT et coll (6) ont observé, en microscopie électronique à haute résolution, un changement de forme de la molécule d' α_2 M, après sa liaison avec la trypsine, mais à cette époque il n'était pas possible de définir la relation entre les deux structures.

BARRETT et coll ont montré plus tard (7) que la molécule d' α_2 M pouvait exister sous 2 formes de mobilités électrophorétiques différentes en gel de polyacrylamide en milieu non dénaturant : une forme lente appelée "S" (comme slow) et une forme rapide appelée "F" (comme fast). Seule la forme "S" est active. La forme "F" n'aurait plus la même conformation que la forme "S" : elle serait plus compacte, ce qui expliquerait sa mobilité plus grande en gel

de polyacrylamide. Un traitement de la forme native "S" par une protéase ou des sels d'ammonium amène sa transformation en forme "F". BARRETT et coll (7) proposent une représentation schématique des différents états possibles de la molécule d' α_2M (figure 3).

I - 3.1.1 Structure de l' α_2M .

Grâce à de nombreux travaux récents, des résultats très importants concernant la structure de la molécule d' α_2M ont été acquis. Ils concernent en particulier la région cible et la liaison thioester.

- Région cible.

Si l' α_2M native est réduite et dénaturée, elle se dissocie en ses 4 sous-unités de $M_r = 185\ 000$. Lorsque des complexes α_2M -protéases sont réduits et dénaturés, les fragments possèdent alors une M_r de 85 000. La taille de ces fragments est indépendante de l'enzyme utilisé. Ces résultats suggèrent donc qu'il existe dans la molécule d' α_2M une région cible, reconnue et coupée par les enzymes ; elle consisterait en une courte séquence en acides aminés (un hexapeptide, comme nous le verrons) possédant les sites potentiels de toutes ces endopeptidases.

De nombreux résultats concernant la séquence en acides aminés sont publiés dès 1979 (185). Une sous-unité de M_r 185 000 contient environ 1 450 résidus d'acides aminés. Les études des sites de coupures pratiquées par une variété de protéases appartenant aux 4 classes d'enzymes (142,188) ont permis de montrer que chacune des liaisons peptidiques de l'hexapeptide (résidus 7 à 12 sur la figure 4) peut être coupée spécifiquement selon l'enzyme utilisé. Des coupures secondaires peuvent de plus intervenir dans deux autres régions situées à proximité, de part et d'autre de cet hexapeptide (à 17 et 27 résidus de cette zone). Cette région cible est située à peu près au milieu de chacune des 4 sous-unités identiques.

- Liaison thioester.

La capacité de l' α_2M à inhiber les protéases est détruite par certains réactifs nucléophiles, en particulier par les ions ammonium (7), l'hydrazine, l'hydroxylamine et une série d'amines aliphatiques primaires. De nombreuses études

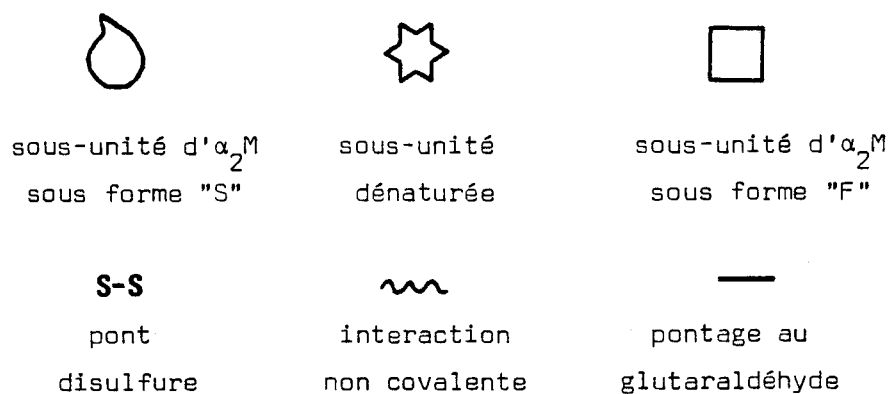
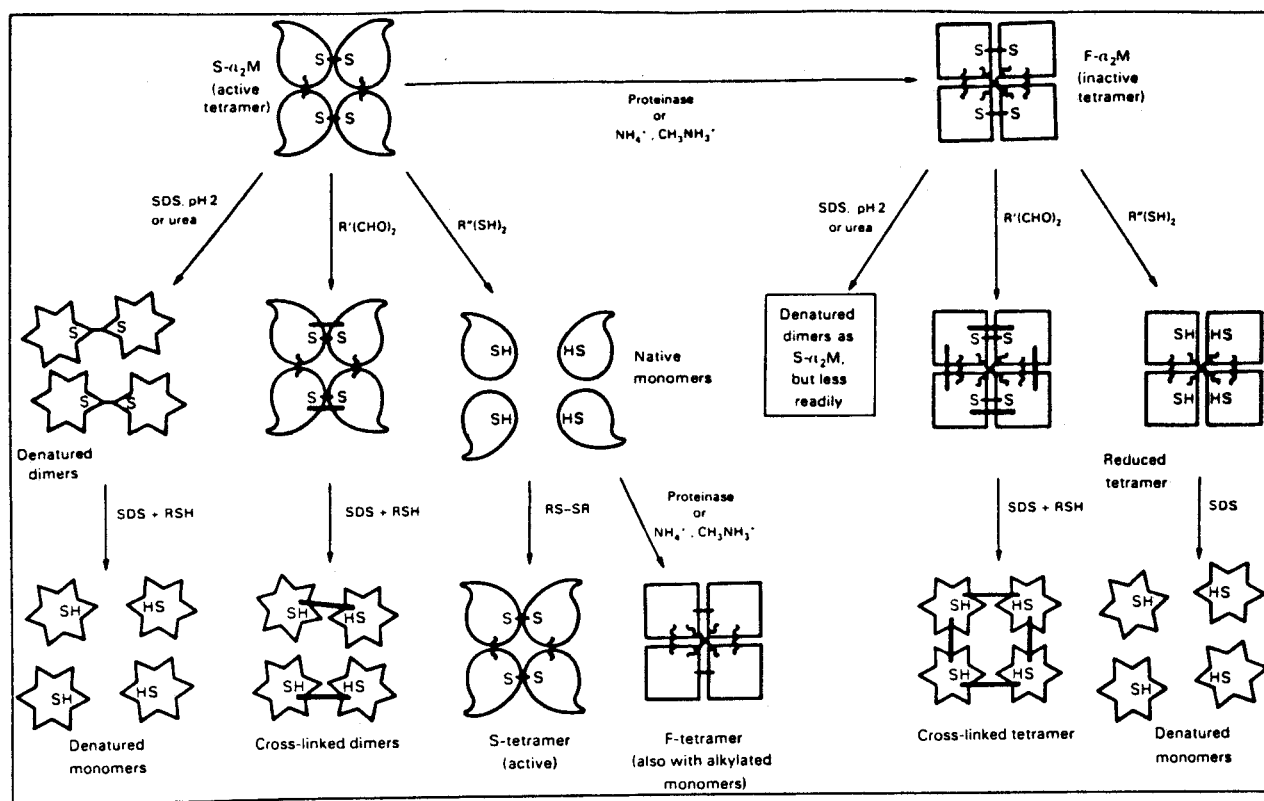


Figure 3 : Représentation schématique des différents états possibles de la molécule d' α_2M d'après BARRETT et coll (7)

RSH : β -mercaptoéthanol
 RS-SR : 2-hydroxyéthyl disulfure
 $R'(CHO)_2$: glutaraldéhyde
 $R''(SH)_2$: dithiothreitol

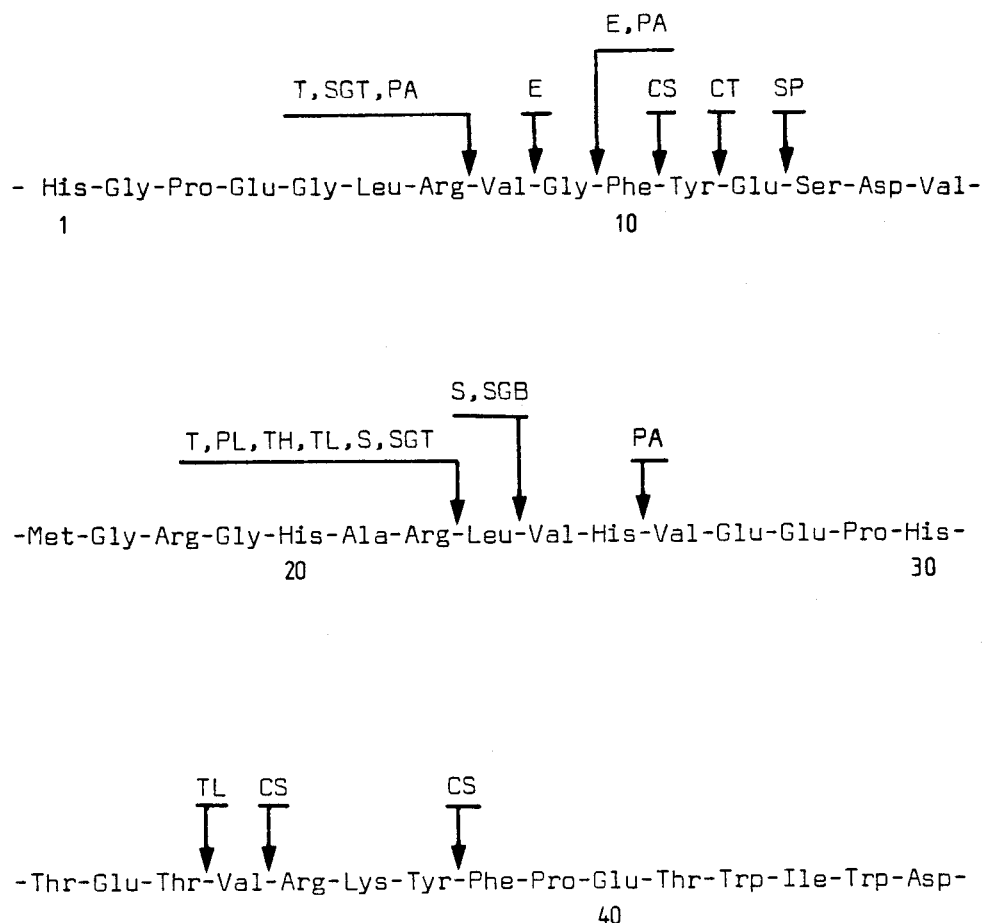


Figure 4 : Séquence en acides aminés du fragment de 45 résidus contenant la région cible de l' α_2 M. Les sites de coupure par les différentes protéases sont indiqués par des flèches verticales.

T, trypsine bovine ; SGT, trypsine de *Streptomyces griseus* ; PA, papaïne ; E, élastase porcine ; CS, chymosine de veau ; CT, chymotrypsine bovine ; SP, protéase de *Staphylococcus aureus* Souche V 8 ; PL, plasmine humaine ; TH, thrombine bovine ; TL, thermolysine ; S, subtilisine Novo ; SGB, protéase B de *Streptomyces griseus*.

D'après MORTENSEN et coll (142)

ont été faites en utilisant la méthylamine. Il a été possible de démontrer que la méthylamine était incorporée stoechiométriquement et de manière covalente dans chacune des sous-unités de l' α_2 M puisqu'après la réaction un résidu de γ -glutamyl méthylamide a été identifié dans chaque sous-unité (199). Un nombre équivalent de groupements thiol libres est détecté (186), alors qu'aucun n'est présent dans la molécule d' α_2 M native. L'apparition de groupements thiol dans l' α_2 M est également observée lors de la formation de complexes α_2 M-protéases. Une liaison thioester présente dans la molécule native d' α_2 M met donc en jeu un résidu d'acide glutamique (Glu) et un résidu de cystéine (186, 199). Ces deux résidus ne sont séparés que par deux acides aminés (figure 5). Une liaison thioester interne existe aussi dans la chaîne α du composant C_3 du complément (200). Pour l' α_2 M, la localisation exacte de cette liaison thioester a été déterminée (187) : le résidu Glu est situé à 469 résidus de l'extrémité C-terminale. Les résidus Glu et Cys font partie d'une séquence en acides aminés identique à la séquence de l'heptapeptide dans lequel se trouve la liaison thioester de la chaîne α du composant C_3 du complément. La liaison thioester présente dans l' α_2 M est si labile qu'un traitement par des agents dénaturants, même à température ambiante, provoque sa rupture (186). Selon VAN LEUVEN (208), le micro-environnement des deux résidus d'acides aminés (Glu et Cys) mis en jeu dans la liaison thioester de l' α_2 M native doit influencer leur réactivité et l'on peut imaginer que la zone interne hydrophobe et la configuration stérique de la molécule contribuent à la forte réactivité de la fonction carboxylique en γ .

I - 3.1.2 Formation des complexes.

La formation d'un complexe entre l' α_2 M et une endopeptidase débute par la coupure protéolytique d'une liaison peptidique dans la région cible de l' α_2 M. L'enzyme se trouve alors "encerclé" par la molécule d' α_2 M et ne peut réagir qu'avec de petits substrats ou de petits inhibiteurs. Dans le complexe, les 4 liaisons thioester sont rompues. Le complexe est caractérisé par une mobilité électrophorétique plus élevée que celle de l' α_2 M à pH alcalin. Pour terminer, le complexe est reconnu par le récepteur cellulaire du système réticulo-endothélial et éliminé de la circulation sanguine. Etant donné la rapidité de la réaction, il n'est pas possible de mettre en évidence d'étapes intermédiaires dans ce processus.

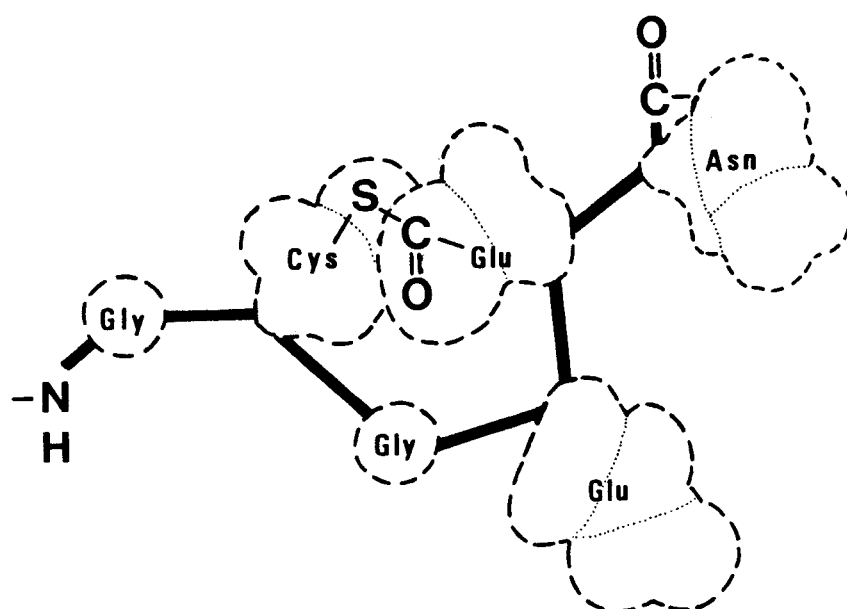


Figure 5 : Schéma de la liaison thioester présente dans la sous-unité de $1'\alpha_2M$ (186) et dans la chaîne α du composant C_3 du complément (200).

Les traits épais représentent les liaisons peptidiques.

La réaction de la méthylamine avec l' α_2 M est, par contre, beaucoup plus lente et des constituants intermédiaires ont pu être isolés. Alors que le complexe final d' α_2 M-méthylamine présente un certain nombre de caractéristiques communes avec celles d'un complexe α_2 M-protéase (mise à part, bien sûr, la coupure protéolytique), des intermédiaires différents ont pu être isolés par VAN LEUVEN et coll (209) au cours d'études cinétiques de l'incorporation de la méthylamine dans l' α_2 M. Ces complexes intermédiaires α_2 M-méthylamine, en dépit de la rupture de leurs liaisons thioester (suivie par l'incorporation de méthylamine ^{14}C) possèdent une mobilité électrophorétique identique à celle de la forme "S" d' α_2 M. Ils peuvent, comme les complexes α_2 M-protéase, être reconnus par le récepteur cellulaire. Tandis que le complexe final α_2 M-méthylamine, migrant électrophorétiquement sous la forme "F", est incapable de lier de la trypsine, le constituant intermédiaire peut former des complexes avec cet enzyme ; ceux-ci sont cependant "anormaux" puisque l'activité protéolytique de la trypsine peut encore s'exercer sur l'hémoglobine et que cette activité peut être inhibée par l'inhibiteur tryptique du soja (STI) de façon, toutefois, beaucoup plus lente que lorsque le STI agit sur de la trypsine libre. Dans ce cas au moins, la rupture de la liaison thioester précède le changement de conformation de la molécule.

Selon VAN LEUVEN (208), le déroulement des réactions aboutissant à la formation du complexe α_2 M-protéase serait le suivant : la coupure protéolytique d'une liaison peptidique dans la région cible conduit à la destabilisation de la molécule d' α_2 M par la rupture des liaisons thioester internes. Une liaison covalente γ -glutamyl- ϵ -lysine se forme avec la protéase. Le changement de conformation de la molécule d' α_2 M permettant l'encerclement de la protéase par l' α_2 M n'intervient qu'après. Le site de reconnaissance par le récepteur cellulaire existe dès que les liaisons thioester sont coupées.

SOTTRUP-JENSEN et coll (190) ont montré que l' α_2 M peut lier la trypsine selon trois modes distincts. Deux molécules de trypsine par molécule d' α_2 M peuvent au plus être protégées de l'inhibition par le STI. Pour une quantité inférieure ou égale à 2 molécules de trypsine par molécule d' α_2 M, la trypsine est liée par des sites ne mettant pas en jeu le site actif. Dans ces conditions, la liaison avec l' α_2 M se fait de manière covalente pour 56 à 67 % des molécules de trypsine complexée puisqu'elles ne peuvent être dissociées après réduction et alkylation lors d'une étape de gel filtration dans un tampon guanidine 6 M-HCl.

Une quantité supplémentaire de trypsine (plus de 2 molécules par molécule d' α_2M) peut être liée par l' α_2M et l'interaction se fait dans ce cas entre le site actif de l'enzyme et la région cible de l' α_2M .

SOTTRUP-JENSEN et coll (189) ont établi que lorsque les liaisons thioester sont activées dans la molécule d' α_2M par la formation d'un complexe trypsine- α_2M , un intermédiaire éphémère apparaît et peut réagir rapidement et de façon covalente avec la méthylamine ou la putrescine. La trypsine, traitée par le TLCK, ou même l'insuline, peuvent également être fixées dans ce cas.

D'autres auteurs (22,213) ont pu démontrer que le STI peut se fixer à la trypsine liée à l' α_2M et l'inhiber et qu'il y a alors formation d'un complexe ternaire α_2M -trypsine-STI.

Le mécanisme d'action de l' α_2M sur les protéases est loin d'être entièrement déterminé, la coopération entre les sous-unités de la molécule d' α_2M lors de la formation des complexes reste, en particulier, inconnue.

I - 3.1.3 Aspect physiologique.

La large spécificité de l' α_2M et les caractéristiques de son interaction avec les protéases individualisent cet inhibiteur de protéases parmi les autres. Physiologiquement, le rôle le plus important de l' α_2M circulante est sans doute de "piéger" les endopeptidases plutôt que de les inhiber. Les complexes α_2M -protéases sont éliminés de la circulation en l'espace de quelques minutes par les cellules du système réticulo-endothélial, puis l'enzyme et l' α_2M sont dégradés. Cette élimination rapide et sélective des complexes α_2M -protéases de la circulation sanguine peut se comprendre plus facilement si l'on pense qu'il existe une reconnaissance spécifique, par un récepteur cellulaire, d'une configuration moléculaire altérée telle que celle qui a été suggérée par BARRETT et coll (7). Il faut cependant noter que des études récentes (176) remettent en question la corrélation qui avait été faite entre les comportements électrophorétiques des formes "S" et "F" et les observations faites en microscopie électronique de structure "ouverte" ou "fermée" et qui avait abouti à la notion de "prise au piège" ou "d'encerclement" de la protéase par l' α_2M . En effet, dans le cas de

complexe α_2 M-trypsine, les résultats récents montrent que la forme est plus proche de la forme ouverte que de la forme fermée. Ils démontrent néanmoins que le site de liaison de la trypsine se trouve dans la région centrale de la molécule d' α_2 M.

Seuls les complexes α_2 M-protéase ou α_2 M-méthylamine peuvent être reconnus par le récepteur cellulaire spécifique et sont éliminés lors d'un phénomène d'endocytose par les fibroblastes et les macrophages, "in vitro" (103, 207). Ce mode d'élimination constitue d'après IMBER et PIZZO (84) une voie métabolique tout à fait distincte de celles déjà décrites pour les glycoprotéines circulantes pour lesquelles s'opère une reconnaissance des résidus de sucres situés aux extrémités non réductrices des glycanes de la molécule (4, 165, 174, 191).

Les enzymes liés à d'autres inhibiteurs du plasma tel l' α_1 PI sont lentement transférés sur l' α_2 M et seraient donc éliminés de la circulation sanguine par ce processus. Des résultats récents (18) montrent que dans le cas de complexe α_1 PI-trypsine, ce transfert est un phénomène passif : la dissociation du complexe au cours du temps aboutit à la libération d'enzyme actif qui est ensuite pris en charge par l' α_2 M. L' α_2 M joue donc certainement un rôle très important dans la régulation de l'activité protéolytique extracellulaire aboutissant à la coagulation sanguine et à la fibrinolyse, ainsi que dans la modulation de l'activité de protéases libérées de granulocytes ou d'autres cellules présentes lors de réactions inflammatoires (195). L' α_2 M semble également jouer un rôle important dans la défense contre les protéases exogènes. Seule parmi les inhibiteurs plasmatiques de protéases, l' α_2 M peut inhiber les protéases de venins de plusieurs serpents ou issues de différentes bactéries pathogènes ou de champignons.

La molécule d' α_2 M est trop volumineuse pour s'échapper du secteur plasmatique en quantité notable dans les conditions physiologiques normales. Dans un état inflammatoire par contre, la perméabilité vasculaire accrue lui permet de diffuser dans les tissus au cours de différentes affections. C'est ainsi que l' α_2 M, native ou complexée avec des protéases, a été mise en évidence dans la cavité pleurale (20), le liquide d'ascite (150) et le liquide synovial (183). Dans ces conditions, la durée de vie des complexes α_2 M-protéase est plus longue que dans la circulation sanguine et l'activité résiduelle conservée par la protéase liée pourrait s'exercer alors plus longtemps et avoir un rôle qui reste à définir.

WANG et coll (213) ont essayé de définir la fonction de l' α_2 M. Ils rappellent qu'il est généralement admis que le rôle principal de l' α_2 M est de protéger le plasma contre des protéases d'origine bactérienne ou autre. Il leur semble cependant un peu mystérieux qu'un mécanisme apparemment aussi complexe ait pour seul but de détruire l'activité enzymatique. Il se peut en effet que l'activité enzymatique des protéases liées à l' α_2 M, bien que réduite par rapport à l'activité des enzymes natifs, ait une signification biologique et que la fonction de l' α_2 M soit de moduler plutôt que d'inhiber totalement l'activité protéolytique. L'existence de récepteurs cellulaires spécifiques pour l'endocytose de l' α_2 M et leur absence dans une lignée cellulaire dérivée de tumeur suggèrent alors pour l' α_2 M un rôle de modulateur des protéases intracellulaires (207).

I - 3.2 α_1 -antiprotéase (α_1 PI).

Parmi les inhibiteurs sériques de sérine-protéases, l' α_1 -antiprotéase appelée auparavant α_1 -antitrypsine est sans doute l'inhibiteur qui a été et demeure le plus étudié. Sa concentration dans un sérum normal est comprise entre 2 et 4 grammes par litre, ce qui correspond à une concentration équivalente à celle de l' α_2 M, mais représente 13 à 14 fois plus de molécules étant donné les masses moléculaires relatives de ces inhibiteurs.

Cela fait presque 20 ans qu'un grand intérêt est porté à son étude. LAURELL et ERIKSSON (116) ont en effet observé dans le plasma de certains sujets une absence quasi complète des α_1 -globulines dont l' α_1 PI est le composant majeur. La plupart de ces sujets étaient atteints d'emphysème pulmonaire. Le polymorphisme génétique de cet inhibiteur est exprimé par le système Pi (protease-inhibitor) représenté par le locus Pi multi-allélique à transmission autosomique co-dominante. Plus de 40 allèles différents ont été mis en évidence, ils ont été nommés par des lettres suivant leur mobilité électrophorétique déterminée d'abord en gel d'amidon (58), puis plus tard en isofocalisation (92). Chaque allèle donne un diagramme complexe en isofocalisation, habituellement simplifié dans la description de 3 bandes majeures appelées 2,4,6 (dans l'ordre des points isoélectriques croissants). Conventionnellement, l'allèle le plus courant ayant une mobilité électrophorétique intermédiaire est appelé M. Des allèles plus rapides (F), plus lents (S) et plus lents encore (Z) ont été découverts. Les sujets

portant le phénotype le plus courant M, homozygote MM, ont une concentration en α_1 PI normale dans le plasma. Récemment, VAUGHAN et coll (210) ont rattaché cette microhétérogénéité à des différences portant sur les chaînes glycaniques. Quelques allèles donnent des phénotypes qui présentent des concentrations très faibles dans le plasma : les sujets de phénotype Z, homozygotes ZZ, ont une concentration en α_1 PI inférieure à 200 mg par litre de plasma.

La corrélation qui a pu être établie entre une faible concentration en α_1 PI sérique et le développement d'un emphysème pulmonaire a été le point de départ de très nombreuses études concernant les propriétés physico-chimiques, la structure, les interactions de cet inhibiteur avec les protéases et le rôle de cet inhibiteur.

I - 3.2.1 Propriétés physico-chimiques.

De nombreux protocoles de purification ont été publiés. La séparation de l' α_1 PI et de la sérualbumine, problème le plus difficile à résoudre, a été effectuée en utilisant diverses méthodes : solvants organiques, abaissement du pH, utilisation de la concanavoline A immobilisée, du Blue-Sepharose, etc.. L'emploi de la chromatographie d'affinité sur Thiol-Sepharose, mise au point par LAURELL et coll (119) permet de préparer l' α_1 PI relativement facilement avec un bon rendement. Selon les auteurs, la masse moléculaire relative (M_r) de l' α_1 PI varie de 46 000 à 56 000. L' α_1 PI est constituée d'une seule chaîne polypeptidique sur laquelle se trouvent, selon les auteurs, 3 (38, 83, 131, 132) ou 4 chaînes glycaniques (16,40,82). BAYARD et coll (16) ont déterminé que 80 % des chaînes sont biantennées, 14 % sont biantennées et ont le résidu β -mannosyl substitué par un résidu de N-acétyl-glucosamine et 6 % sont triantennées. L' α_1 PI de Babouin, dont la structure primaire complète a été déterminée récemment (112), présente 4 séquences Asn-X-Thr (ou Ser) susceptibles d'être des points de branchement pour les glycannes. Dans la revue récente de CARRELL et coll (39) sur l' α_1 PI humaine, la séquence Asn-Lys-Ser (résidus 121 à 123), présente dans l' α_1 PI de Babouin, ne figure pas : le nombre de points de branchement possibles se limiterait à 3 dans l' α_1 PI humaine.

Le protocole de préparation utilisant la chromatographie d'affinité sur colonne de Thiol-Sepharose est fondé sur l'existence d'au moins un groupement thiol devenu libre après réduction douce. En fait, dans la molécule

d' α_1 PI, il n'existe qu'un résidu de cystéine qui, dans le sérum, se trouve engagé dans un pont disulfure avec de la cystéine libre ou du glutathion (69). L'acide aminé N-terminal est un résidu d'acide glutamique. L'acide aminé C-terminal est un résidu de lysine. Le foie est la source majeure d' α_1 PI ; les hépatocytes en culture peuvent en effectuer la synthèse (90).

I - 3.2.2 Interactions avec les endopeptidases. *

Les enzymes pancréatiques comme la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase, les enzymes de leucocytes comme l'élastase, la cathepsine G et la collagénase, les collagénases de liquide synovial ou de la peau sont liés stoechiométriquement par l' α_1 PI et ainsi immédiatement inactivés. La plasmine, la thrombine, l'urokinase, la kallikréine et l'acrosine de sperme peuvent également être inhibés par l' α_1 PI, mais la réaction est alors beaucoup plus lente. On ne détecte pas de complexes entre l' α_1 PI et des enzymes dans un plasma normal. Par contre, de tels complexes sont mis en évidence, par exemple, dans le liquide d'ascite lors de pancréatite aigue ou de péritonite aigue (148).

Le mécanisme d'interaction entre l' α_1 PI et la trypsine, la chymotrypsine ou l'élastase pancréatique a été étudié par de nombreux auteurs. Comme beaucoup de résultats publiés ne concordent pas, il est nécessaire de détailler les travaux effectués. Nous mettrons en même temps l'accent sur la diversité des méthodes utilisées pour étudier le mécanisme d'action de cet inhibiteur de protéases.

- Interaction avec la trypsine.

En 1974, MOROI et YAMASAKI (139) étudient les interactions entre l' α_1 PI et la trypsine bovine. Ils mettent en évidence en SDS-PAGE, avec ou sans réduction, la formation d'un complexe de $M_r = 74\ 000$, résultant d'une réaction stoechiométrique entre l' α_1 PI et la β -trypsine bovine, et la libération simultanée d'un peptide de faible M_r . La stabilité du complexe en milieu SDS suggère que la liaison enzyme-inhibiteur est de nature covalente. La dissociation du complexe par l'hydrazine (concentration finale 7,5 M) conduit à deux constituants : l'un de M_r égale à 48 000 correspondrait à l'inhibiteur modifié produit lors de la formation du complexe par une coupure protéolytique dans la région C-terminale

* Dans cette partie, les affirmations placées entre les signes " " se sont par la suite avérées erronées comme nous le verrons dans la synthèse page 29.

de l' α_1 PI, l'autre constituant observé possède une M_r égale à 23 000. La discordance entre la M_r observée pour le complexe (74 000) et la M_r théorique (23 000 + 48 000 = 71 000) est due, selon ces auteurs, à une mobilité anormale d'un complexe constitué de deux chaînes polypeptidiques (inhibiteur + enzyme).

Les essais effectués avec l' α -trypsine aboutissent en milieu SDS, sans réduction, aux mêmes électrophorogrammes que ceux obtenus avec la β -trypsine ; par contre, après réduction, 2 autres constituants sont observés : l'un de $M_r = 62\ 000$ et l'autre de $M_r = 12\ 000$. En effet, la β -trypsine est formée d'une seule chaîne polypeptidique, alors que l' α -trypsine possède deux chaînes, A et B, maintenues par 3 ponts disulfure. La réduction provoque donc la rupture de ces ponts et la chaîne A de l' α -trypsine ($M_r = 12\ 000$) se trouve alors libérée. Seule la chaîne B de l' α -trypsine reste associée à l' α_1 PI dans le complexe de $M_r = 62\ 000$. Lors de la réaction de l' α_1 PI avec l'enzyme, il y aurait formation d'une liaison acyl entre la sérine du site actif de l'enzyme et le groupement α -carboxylique du résidu C-terminal de l' α_1 PI modifié. Selon MOROI et YAMASAKI (139), l'inhibition serait permanente, puisqu'il n'y a pas de "régénération" d'activité enzymatique lorsque le complexe se dissocie.

Dès 1974, JOHNSON et coll (95) montrent qu'il y a formation d'un complexe stable en milieu SDS entre l' α_1 PI et la trypsine porcine.

En 1976, JOHNSON et TRAVIS (97) isolent le complexe α_1 PI -trypsine porcine ; après dissociation de ce complexe par la benzamidine (0,25 M), un inhibiteur modifié (α_1 PI*) ayant une M_r inférieure de 8 000 à celle de l'inhibiteur natif est isolé ; il ne possède plus de propriétés inhibitrices. L'analyse de la séquence en acides aminés de l' α_1 PI* montre qu'"un peptide qui recouvre la séquence amino-terminale de l'inhibiteur natif a été perdu". D'après ces auteurs, une protéolyse limitée de l'inhibiteur est donc la première étape du mécanisme d'inhibition. Ils émettent l'hypothèse que l' α_1 PI existerait sous la forme de pro-inhibiteur qui serait activé par une protéolyse limitée et qui jouerait ensuite un rôle de piège pour la protéase en formant un complexe stable avec elle. Après dissociation du complexe par la benzamidine, l'enzyme est récupéré sous forme active. JOHNSON et TRAVIS montrent en 1978 (99) que la liaison coupée dans l' α_1 PI pour aboutir à l'inhibiteur modifié est une liaison Met-Ser (ou Thr) "située à environ 60 acides aminés de l'extrémité N-terminale". L'oxydation du résidu de méthionine engagé dans cette liaison rendrait l' α_1 PI inactive (100). Nous reverrons ultérieurement l'importance physiologique de cette observation.

En 1977, ODA et coll (147) étudiant cette même réaction entre l' α_1 PI et la trypsine porcine montrent que la dissociation lente à pH 8,0 et à température ambiante produit un inhibiteur modifié inactif et de la trypsine active. Le pourcentage de trypsine active récupérée diminue avec l'augmentation du rapport enzyme/inhibiteur. En fait, le type de l'inhibition (temporaire ou permanente) de la trypsine porcine par l' α_1 PI semblerait dépendante du rapport initial enzyme/inhibiteur, le rapport le plus faible favorisant l'inhibition temporaire.

En 1978, COHEN et coll (44) démontrent que le complexe équimoléculaire formé entre l' α_1 PI et la trypsine possède les mêmes séquences N-terminales que les constituants qui entrent dans le complexe. Après dissociation du complexe par traitement en milieu alcalin, ils observent la libération, entre autres, d'un large fragment provenant de l' α_1 PI. Après détermination des résidus d'acides aminés N- et C-terminaux, les auteurs concluent qu'il y a eu au cours de la dissociation du complexe, coupure d'une liaison Lys-Thr située dans la région N-terminale de l' α_1 PI.

- Interaction avec l'élastase pancréatique.

Deux équipes différentes se sont particulièrement intéressées aux interactions entre l' α_1 PI et l'élastase pancréatique porcine.

En 1976, LO et coll (123) identifient cinq constituants après réaction d'un excès d' α_1 PI avec de l'élastase pancréatique. Deux constituants représentent des complexes α_1 PI-élastase dont l'un doit en fait être un complexe partiellement dégradé. Après dissociation de ces complexes par attaque nucléophile douce, on observe un grand nombre de bandes protéiques en SDS-PAGE, ce qui suggère que l'élastase est libérée sous forme active et qu'elle peut alors poursuivre son action. Ces auteurs mettent également en évidence la présence d'un constituant de masse moléculaire relative plus faible que celle de l' α_1 PI native et qui n'a plus d'activité inhibitrice. Après isolement et étude des différents constituants obtenus lors de la réaction de l' α_1 PI avec l'élastase, JAMES et COHEN (87) présentent le schéma d'action suivant : deux sites majeurs de la molécule d' α_1 PI peuvent être attaqués par l'élastase ; si le site placé non

loin de l'extrémité C-terminale de la molécule native est attaqué le premier (liaison Leu-X), il y a formation d' α_1 PI inactive et perte d'un peptide C-terminal. Si c'est le deuxième site, placé non loin de l'extrémité N-terminale qui est attaqué le premier, il y a coupure d'une liaison X-Ser, "perte d'un peptide du côté N-terminal de la molécule," changement de conformation qui amène l'élastase à se lier de manière covalente au site qui se trouve dans la région C-terminale, ce qui entraîne la perte du peptide C-terminal. Il y a donc formation d'un complexe et d'un inhibiteur modifié.

L'équipe de BAUMSTARK (12) étudie l'interaction de l' α_1 PI avec l'élastase pancréatique en léger excès, puisque le rapport enzyme/inhibiteur est égal à 1,3. Ces auteurs observent que très rapidement, environ 47 % des molécules d'inhibiteur se transforment en inhibiteur "inactivé" de M_r égale à 49 000, tandis que les 53 % restants forment avec l'élastase un complexe de M_r égale à 78 000. Ce complexe est ensuite dégradé par l'excès d'élastase et l' α_1 PI qui est alors retrouvée, se trouve sous forme d'inhibiteur "inactivé". Des études comparatives de l' α_1 PI native et de l' α_1 PI inactivée par l'élastase (13) ont montré que les compositions en acides aminés de ces deux molécules sont pratiquement identiques. La différence de M_r entre l' α_1 PI native et l' α_1 PI obtenue après action de l'élastase correspondrait selon ces auteurs à la "perte d'un glycopeptide contenant très peu d'acides aminés".

- Interaction avec la chymotrypsine.

MORII et coll (137) ont observé, en SDS-PAGE, la formation d'un peptide de M_r égale à environ 3 600 après réaction de l' α_1 PI avec l' α -chymotrypsine bovine, la trypsine bovine ou l'élastase porcine. Ils se sont plus particulièrement intéressés au peptide libéré au cours de la formation du complexe entre l' α_1 PI et l' α -chymotrypsine. La composition en acides aminés de ce peptide de 32 résidus ne correspond ni à la séquence amino-terminale de l' α_1 PI native (136), ni à celle d'aucun segment de l' α -chymotrypsine. L'étude des séquences N- et C-terminales de ce peptide indique qu'il résulte d'une coupure dans la région C-terminale de la molécule native d' α_1 PI. La liaison peptidique cible où s'exerce la coupure protéolytique par l' α -chymotrypsine se trouverait à proximité de l'extrémité C-terminale.

- Etudes comparatives de l'interaction de l' α_1 PI avec différentes endopeptidases.

Dès 1975, JOHNSON et TRAVIS (96) comparent l'action de l' α_1 PI avec la trypsine porcine, la chymotrypsine bovine, l'élastase leucocytaire humaine et l'élastase porcine. Ils montrent qu'il y a, avec chaque enzyme, formation d'un complexe équimoléculaire stable en SDS-PAGE. En 1977, TRAVIS et coll (201) déterminent que, pour obtenir l' α_1 PI modifiée (α_1 PI*), il y a coupure de la même liaison peptidique que ce soit par l'élastase leucocytaire, la cathepsine G, la trypsine, la chymotrypsine, la thrombine ou la plasmine et que le mécanisme d'action de tous ces enzymes avec l' α_1 PI doit être semblable.

SAKLATVALA et coll (171) observent que lorsque l' α_1 PI réagit avec la chymotrypsine bovine, le spectre obtenu en dichroïsme circulaire, dans le proche ultra-violet, est différent de celui qui est calculé par l'addition des spectres de l'inhibiteur et de l'enzyme. Il y a donc modification de l'environnement des résidus d'acides aminés aromatiques dans l'un au moins des constituants lors de l'interaction. En suivant également la réaction par des études en électrophorèse et en isoélectrofocalisation, ces auteurs montrent que le complexe stoechiométrique entre l' α_1 PI et la chymotrypsine est ensuite dégradé par l'excès d'enzyme. Des résultats analogues sont obtenus avec la trypsine bovine.

Utilisant une méthodologie semblable, BLOOM et HUNTER (25) déterminent qu'en excès d'enzyme, le complexe α_1 PI-chymotrypsine est plus labile que le complexe α_1 PI-trypsine et que, lorsque les deux enzymes sont en compétition pour réagir avec l' α_1 PI, la chymotrypsine réagit plus rapidement.

Plus récemment, MARTODAM et LIENER (129) publient les résultats de travaux comparatifs sur les interactions de l' α_1 PI avec la trypsine bovine, la chymotrypsine bovine et l'élastase leucocytaire humaine. Ils déterminent les séquences en acides aminés des extrémités des constituants présents dans les complexes et des constituants obtenus après dissociation de ces complexes à pH 10,0. Ces auteurs décrivent alors deux inhibiteurs modifiés différents et concluent qu'il existe dans la molécule d' α_1 PI deux liaisons peptidiques cibles : "l'une est située près de l'extrémité N-terminale (Met-Ser en position 60-61)", l'autre près de l'extrémité C-terminale (Met-Ser en position 354-355). La réaction avec une protéase ne pourrait se faire simultanément aux deux sites.

- Synthèse des résultats concernant les interactions de l' α_1 PI avec les endopeptidases (Tableau I, inspiré de BOSWELL et coll (28)).
Apport de la détermination de la séquence en acides aminés.

Lors de la réaction de l' α_1 PI avec l'enzyme qu'elle inhibe, il y a formation d'un complexe équimoléculaire qui peut être visualisé en SDS-PAGE : des liaisons covalentes existent donc entre l' α_1 PI et l'enzyme. Ceci constitue le seul point sur lequel tous les auteurs ayant étudié la réaction de l' α_1 PI avec un enzyme sont d'accord. La plupart des auteurs ont montré que la molécule d' α_1 PI isolée après dissociation du complexe a subi une coupure protéolytique au niveau d'une liaison Met-Ser proche de l'une des extrémités de la molécule. Il faut noter que contrairement à ce qui a été décrit pour l' α_2 M, c'est toujours la même liaison peptidique qui est coupée quel que soit l'enzyme inhibé par l' α_1 PI.

En ce qui concerne les autres caractéristiques de la réaction, des divergences importantes apparaissent entre les différents travaux publiés. La liaison cible Met-Ser a été localisée à 36 résidus de l'extrémité C-terminale (137) ou à 60 résidus de l'extrémité N-terminale (97,99). Certains auteurs ont même montré que deux liaisons cibles existaient dans l' α_1 PI (87,129). Selon les auteurs, la libération du peptide aboutissant à la formation d' α_1 PI modifiée s'effectue soit en même temps que la formation du complexe, soit seulement lorsque la dissociation du complexe est provoquée par un pH alcalin ou un agent dissociant.

La détermination de la séquence en acides aminés de l' α_1 PI menée parallèlement aux études d'interactions α_1 PI-protéases a permis de localiser sans ambiguïté la liaison cible Met-Ser. En 1979 (36), puis en 1980 (37), CARRELL et coll. montrent, sur la base des résultats de séquences partielles en acides aminés, que la liaison cible Met-Ser est située à 36 résidus de l'extrémité C-terminale de la molécule. En 1981, ayant déterminé la presque totalité de la séquence en acides aminés de l' α_1 PI, CARRELL et coll (38) prouvent que la molécule ne possède pas de séquence Met-Ser aux environs de la position 60 et infirment ainsi l'existence de deux liaisons cibles identiques. En déduisant de la séquence de l'ADN la séquence complète en acides aminés de l' α_1 PI, KURACHI et coll (112) confirment, à la même époque, la présence d'une seule liaison cible Met-Ser, en position 358-359.

L'importance du rôle joué par le résidu de méthionine engagé dans la liaison cible est connue depuis plusieurs années (99), cette méthionine constituerait donc le point central de ce qui a été appelé le site réactif de l' α_1 PI.

M _r de l' α_1 PI modifiée (*)	Séquence N-termi- nale du consti- tuant isolé.	Résumé des commentaires des auteurs
48 000 (54 000)		Coupure protéolytique dans la région C-terminale de l' α_1 PI
45 000 (54 000) + ***8 000	Thr-Ile-Thr-Pro- Glu-	Inhibiteur activé par protéolyse limitée dans la région N-terminale
54 000 (58 000)		Formes intermédiaires de complexe
46 000 (Mr < 50 000) (54 000) + petit peptide	Thr	Coupure d'une liaison Lys-Thr du côté N-terminal au cours de la dissociation par pH alcalin
	(Thr/Ser)-Ile- Pro-Pro-Glu	Site réactif placé à 60 résidus de l'extrémité N-terminale.
***Proche de 4 000	Ser-Ile-Pro-Pro- Glu-	Site réactif situé à 36 résidus de l'extrémité C-terminale.
50 000	Pro	Obtention de 2 fragments qui n'ont plus d'activité inhibitrice et qui sont dûs à une seule coupure.
51 300 et 50 100 (54 000)	Glx- et Ser-	2 sites réactifs : site côté C-terminal coupé → α_1 PI inactive ; site côté N-terminal coupé → complexe.
49 000 (54 000)		Perte essentiellement, d'un glycopeptide contenant peu d'acides aminés.
***3 600	(Ser)-Ile-Pro- Pro-Glu	Liaison cible placée à environ 32 résidus de l'extrémité C-terminale.
	Thr-Ile-Pro-Pro- Glu-	La même liaison (sans doute Lys-Thr) est coupée par chacun des enzymes utilisés.
45 000 (52 000) 2 constituants de même taille	Thr-Ile-Pro-Pro- Glu + Glu-Asp-Pro-Glu- Gly	2 sites réactifs : 1 majeur proche de l'extrémité N-terminale, 1 mineur proche de l'extrémité C-terminale.
47 000 + 4 000	Glu-Asp-Pro-Gln + Ser-Ile-Pro-Pro	Les 2 fragments restent associés même en présence de guanidine 6 M ou en acide acétique 1 %, ils ne peuvent être séparés qu'en SDS-PAGE. De plus, le fragment de M _r = 47 000 donne de faibles rendements lors de la détermination de la séquence N-terminale. C'est pourquoi, la localisation du site réactif de l' α_1 PI n'a pas été correcte pendant plusieurs années.

I - 3.2.3 Fonction.

L' α_1 PI est en premier lieu un constituant qui permet de protéger les tissus contre une attaque par des enzymes protéolytiques. L' α_1 PI normale est synthétisée dans le foie et sécrétée dans le plasma où sa demi-vie est de 6 jours. L' α_1 PI fait partie des marqueurs de l'inflammation : sa concentration plasmatique peut quadrupler en réponse à un stimulus général inflammatoire ou à des oestrogènes (120).

La mesure des constantes d'association de l' α_1 PI avec une série de protéases (17) a permis de classer ces protéases en fonction de leur vitesse de réaction avec l' α_1 PI dans l'ordre décroissant suivant : élastase leucocytaire, chymotrypsine, cathepsine G, trypsine anionique, trypsine cationique, plasmine, thrombine. Il faut noter qu'en fait il est surprenant que la coupure par l'élastase dont l' α_1 PI est l'inhibiteur principal puisse s'exercer dans une séquence Pro-Met[↓]Ser. De plus, la méthionine présente le désavantage d'être sensible à l'oxydation (100). Lorsque l' α_1 PI est oxydée par le N-chlorosuccinimide, seuls 2 des 8 résidus de méthionine présents dans la molécule sont transformés en méthionine sulfoxyde, le résidu de méthionine du site réactif est l'un de ceux-là. Il s'ensuit une perte totale de l'activité inhibitrice de l' α_1 PI envers l'élastase pancréatique porcine et une perte rapide et importante de l'activité inhibitrice envers la trypsine porcine et l'élastase leucocytaire humaine avec lesquelles l' α_1 PI réagit alors plus lentement. L'inactivation de l' α_1 PI, à la suite de l'oxydation de 2 résidus de méthionine, peut avoir une très grande importance "in vivo". En effet au niveau de l'arbre bronchique, l'oxydation par les constituants de la fumée de cigarette par exemple, peut inactiver l' α_1 PI, inhibiteur majeur de protéases du tractus respiratoire (89,154).

I - 3.2.4 Variations et affections.

Les variants ayant un intérêt particulier en pathologie sont les mutants Z et S dont les taux plasmatiques sont faibles. Le variant Z et surtout le phénotype homozygote ZZ a été mis en cause dans certains cas d'emphysème pulmonaire et de cirrhose. L'emphysème pulmonaire peut s'expliquer par une défense amoindrie contre des enzymes tels que l'élastase leucocytaire (57). La cirrhose s'expliquerait par l'accumulation de molécules d' α_1 PI dans les hépatocytes (121).

L' α_1 PI isolée du foie possède la même structure polypeptidique que l' α_1 PI Z circulante, mais les chaînes glycaniques sont différentes : elles seraient immatures puisqu'elles se caractérisent par une teneur élevée en mannose et sont dépourvues d'acide sialique (79) ; il existe donc un blocage dans le processus de maturation de la biosynthèse des glycanes avec un stockage intracellulaire, d'où il résulte un taux sérique faible. D'autre part, la chaîne polypeptidique de l' α_1 PI Z circulante diffère de celle de l' α_1 PI M par la substitution d'un seul acide aminé : en position 342, l' α_1 PI Z possède un résidu de lysine à la place du résidu d'acide glutamique présent dans l' α_1 PI M (91). Il n'a pas encore été possible d'établir une relation entre cette substitution et le caractère inachevé de la glycosylation de la protéine.

Le cas de l' α_1 PI S est légèrement différent. Il n'existe aussi qu'une seule substitution au niveau de la chaîne polypeptidique : en position 264, l' α_1 PI S possède une valine à la place de l'acide glutamique présent dans l' α_1 PI M (156). Il n'y a pas accumulation de l' α_1 PI S dans le foie et il ne s'agit donc pas d'un défaut de sécrétion. Il est possible que la valine substituée à l'acide glutamique provoque une modification de la structure tertiaire de la molécule en cours de synthèse et favorise une dégradation intracellulaire qui explique le taux sérique faible observé (35).

Bien que ces deux processus soient extrêmement différents, leurs conséquences sont identiques : en effet, le taux sérique de l' α_1 PI étant faible, la protection des tissus vis-à-vis de la protéolyse est incomplète.

I - 3.3 Antithrombine III (AT).

La notion de l'existence dans le sérum d'un inhibiteur de thrombine tel que l'antithrombine III est un concept ancien, puisqu'un tel inhibiteur intervenait dans la théorie de la coagulation sanguine émise par MORAWITZ dès 1905 (135). La purification de l'AT a été tentée par de très nombreux auteurs, mais il a fallu attendre la mise au point par MILLER-ANDERSON et coll (134) d'un protocole utilisant la chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine-Sepharose pour obtenir une préparation, à grande échelle, d'AT purifiée.

I - 3.3.1 Propriétés physico-chimiques.

L'AT est classée parmi les α_2 -globulines. Sa concentration dans le plasma qui est d'environ 100 mg/litre est donc 10 fois plus faible que celles de l' α_2 M et de l' α_1 PI et se rapprocherait de celles de l' α_1 Achy et de l'inter- α -trypsine-inhibiteur. L'AT est synthétisée dans le foie, sa demi-vie dans le plasma est de 48 heures. Les sujets atteints d'un déficit en cette glycoprotéine présentent des thromboses fréquentes, tandis que chez d'autres sujets un excès d'AT provoque une tendance à l'hémorragie.

L'AT est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 424 résidus d'acides aminés dont la séquence totale a été déterminée par PETERSEN et coll (162). La M_r de ce constituant est comprise entre 55 000 et 56 000. Les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement l'histidine (111,162) et la lysine (162). Quatre chaînes oligosaccharidiques identiques (64) sont réparties le long de la chaîne polypeptidique en position 96, 135, 155 et 192.

I - 3.3.2 Interactions avec les endopeptidases.

L'AT est l'inhibiteur physiologique principal de la thrombine et du facteur X_a (2). Elle intervient donc à plusieurs niveaux dans le système de la coagulation sanguine. L'AT est également appelée cofacteur de l'héparine. Elle a, en effet, en inhibant la thrombine, une action complémentaire de celle de l'héparine qui est, "in vitro" et "in vivo", un anticoagulant puissant puisqu'elle inhibe la formation et l'action du facteur IX_a et de la thrombine (figure 1). L'AT inhibe aussi d'autres sérine-protéases impliquées dans les phénomènes de la coagulation sanguine, de la fibrinolyse et dans les systèmes de la kallicréine plasmatique et du complément.

- Interaction avec la thrombine, le facteur IX_a et le facteur X_a .

Les premiers travaux (168) montrent que l'AT réagit stœchiométriquement avec la thrombine qui se trouve inactivée dans un complexe stable en milieu SDS, ce qui suggère que la thrombine et l'AT sont liées de façon covalente. Cette réaction est accélérée de 50 à 100 fois en présence d'héparine. Depuis,

de nombreuses études ont été effectuées sur l'AT d'origine bovine ou d'origine humaine.

En 1975, OWEN (157) précise que la liaison covalente entre l'inhibiteur et l'enzyme doit être un ester carboxylique.

En 1979, FISH et coll (60) montrent que, lorsque l'AT réagit avec la thrombine, un complexe AT-thrombine relativement stable et une forme libre d'AT modifiée sont obtenus simultanément. Cette dernière est constituée de 2 chaînes polypeptidiques de M_r respectivement égales à 50 000 et 5 000 environ, probablement reliées de façon covalente par un ou plusieurs ponts disulfures puisqu'elles peuvent être séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu SDS après réduction de l'échantillon*. La formation d'AT modifiée n'est pas observée lorsque l'AT est incubée avec de la thrombine préalablement inactivée par le PMSF. Il a été démontré que l'AT modifiée est le produit de l'hydrolyse par la thrombine de la liaison peptidique Arg-Ser (résidus 385-386) de l'AT que ce soit lorsque la thrombine bovine réagit avec l'AT bovine (102) ou lorsque la thrombine humaine réagit avec l'AT humaine (23). L'AT modifiée a perdu la capacité d'inhiber la thrombine et possède une affinité réduite pour l'héparine, ce qui semble indiquer qu'un changement de conformation de la molécule a suivi la coupure protéolytique. Ces mêmes auteurs étudient ensuite (61) les constituants obtenus après dissociation du complexe AT-thrombine dont la purification est tout d'abord effectuée en mettant à profit le fait que le complexe possède une affinité pour l'héparine-Sepharose plus faible que celle de l'inhibiteur natif, mais cependant plus forte que celle de la forme modifiée d'AT. La dissociation du complexe peut être obtenue par l'hydroxylamine (1 M) ou l'ammoniaque (1,5 M) en présence ou en absence de SDS, ou même par un traitement prolongé par le SDS à 100°C. Une dissociation spontanée mais beaucoup plus lente du complexe peut également se produire à 37°C (48). Dans tous les cas, il y a, lors de la dissociation du complexe, libération d'AT sous forme modifiée présentant les mêmes caractéristiques que l'AT modifiée obtenue dès le début de la réaction de l'AT avec la thrombine. L'AT n'est en aucun cas restituée sous forme active. Si la dissociation est opérée dans des conditions non dénaturantes, de la thrombine active est alors récupérée.

Des expériences de contrôle ont permis de vérifier que l'inhibiteur était effectivement libéré du complexe sous forme d'inhibiteur modifié et non

* Ces résultats ont été confirmés par LONGAS et FINLAY (125) qui ont, comme nous le verrons dans la figure 6 (p : 37), proposé un schéma de formation et de dissociation du complexe AT-thrombine.

sous la forme native qui serait ensuite modifiée, soit par les agents dissociants, soit par la thrombine active libérée. Aucune des méthodes électrophorétiques utilisées ne peut permettre de différencier l'AT modifiée obtenue après dissociation du complexe et l'AT modifiée obtenue d'emblée au cours de la réaction d'inactivation de la thrombine par l'AT. Ces observations suggèrent que la protéolyse limitée de l'AT par la thrombine intervient lors de la formation du complexe.

A l'issue de toutes ces expériences, FISH et BJÖRK (61) proposent pour l'inhibition de la thrombine par l'AT le mécanisme d'action suivant : lors de la première étape, l'AT joue le rôle de substrat spécifique de la thrombine. Le complexe initial formé est un complexe du type "enzyme-substrat"; une liaison peptidique de l'inhibiteur est alors hydrolysée. Après cette protéolyse, le complexe initial AT-thrombine devient très instable. La molécule d'AT ayant subi la protéolyse peut alors, ou bien se dissocier du complexe initial et donner l'inhibiteur modifié libre, ou bien, après réarrangement au cours duquel ses interactions avec la thrombine sont modifiées, former le complexe thrombine-AT plus stable et inactif qui peut être mis en évidence en SDS-PAGE. Ce réarrangement met sans doute en jeu une liaison covalente acyl-ester entre l'enzyme et l'inhibiteur modifié. Les deux réactions possibles pour l'AT modifiée sont simultanées et se produisent toutes deux rapidement.

En présence d'excès de thrombine, le complexe est dégradé et l'on aboutit à des formes intermédiaires de complexes (62) dans lesquels la thrombine a subi une activité protéolytique plus ou moins importante. Il a d'ailleurs été démontré que l'AT native est capable de former des complexes avec certains fragments de thrombine obtenus à la suite d'autolyse. Par contre, l'AT modifiée est incapable de former un complexe avec la thrombine.

La thrombine n'est pas maintenue de façon permanente dans le complexe contrairement à ce qu'aurait pu laisser penser la relative stabilité du complexe, en particulier sa résistance aux agents dissociants. Le complexe AT-thrombine peut être considéré comme un complexe "enzyme-substrat" particulièrement stable ; sa dissociation lente produit, outre la forme modifiée d'inhibiteur, de l'enzyme au moins partiellement actif. L'inactivation de la thrombine par l'AT peut donc être considérée comme une inhibition temporaire.

Etudiant les interactions de l'AT avec le facteur IX_a et le facteur X_a , BJÖRK et coll (24) observent, comme après interaction avec la thrombine, la formation d'un complexe AT-protéase et l'apparition simultanée d'une forme modifiée d'AT qui résulte de la coupure par la protéase de la liaison Arg-Ser (résidus 385-386). Tous ces résultats permettent de penser que cette liaison peptidique située à 38 résidus de l'extrémité C-terminale constitue la liaison cible où s'exerce l'action des enzymes ; elle est appelée également site actif de la molécule.

L'AT et l' α_1 PI présentent une certaine homologie de séquence de leurs régions C-terminales (36) et possèdent de plus la caractéristique commune suivante : la liaison cible se situe dans cette partie C-terminale de la molécule.

Les résultats de JESTY (93) sont en accord avec ceux de l'équipe de BJÖRK : la dissociation des complexes formés entre le facteur X_a et l'AT ou la thrombine et l'AT produit une forme modifiée d'AT qui consiste en 2 chaînes polypeptidiques dont la plus petite possède une M_r inférieure à 5 000. JESTY a, de plus, étudié les coupures protéolytiques qui peuvent être provoquées dans les complexes par l'enzyme non inhibé en excès dans le mélange d'incubation : une seule coupure intervient dans le complexe AT-facteur X_a ; elle se fait au niveau de l'enzyme provoquant la libération d'un fragment de $M_r = 15\ 000$ issu de la chaîne lourde de l'enzyme. Pour le complexe AT-thrombine, plusieurs coupures interviennent, mais toutes au niveau de l'enzyme. Après dissociation du complexe, cet auteur ne retrouve pas d'enzyme actif.

En 1980, LONGAS et FINLAY (125) étudient la nature de la liaison entre la thrombine et l'AT en effectuant la dissociation du complexe AT-thrombine à l'aide d'un inhibiteur radioactif compétitif, O- $[^{14}C]$ -méthylhydroxylamine chlorhydrate. Il y a alors libération de thrombine inactive et d'AT marquée par le ^{14}C qui correspond à l'AT modifiée décrite précédemment. Pendant la formation du complexe AT-thrombine, l'inhibiteur subit une coupure protéolytique au niveau d'une liaison Arg-X, cette arginine forme un ester carboxylique avec l'enzyme. Ceci avait déjà été suggéré par OWEN (157). Le fragment C-terminal de l'AT reste cependant lié par un pont disulfure à la partie N-terminale de l'inhibiteur. Un schéma de la formation et de la coupure du complexe a été proposé par ces auteurs et est reproduit dans la figure 6 (125).

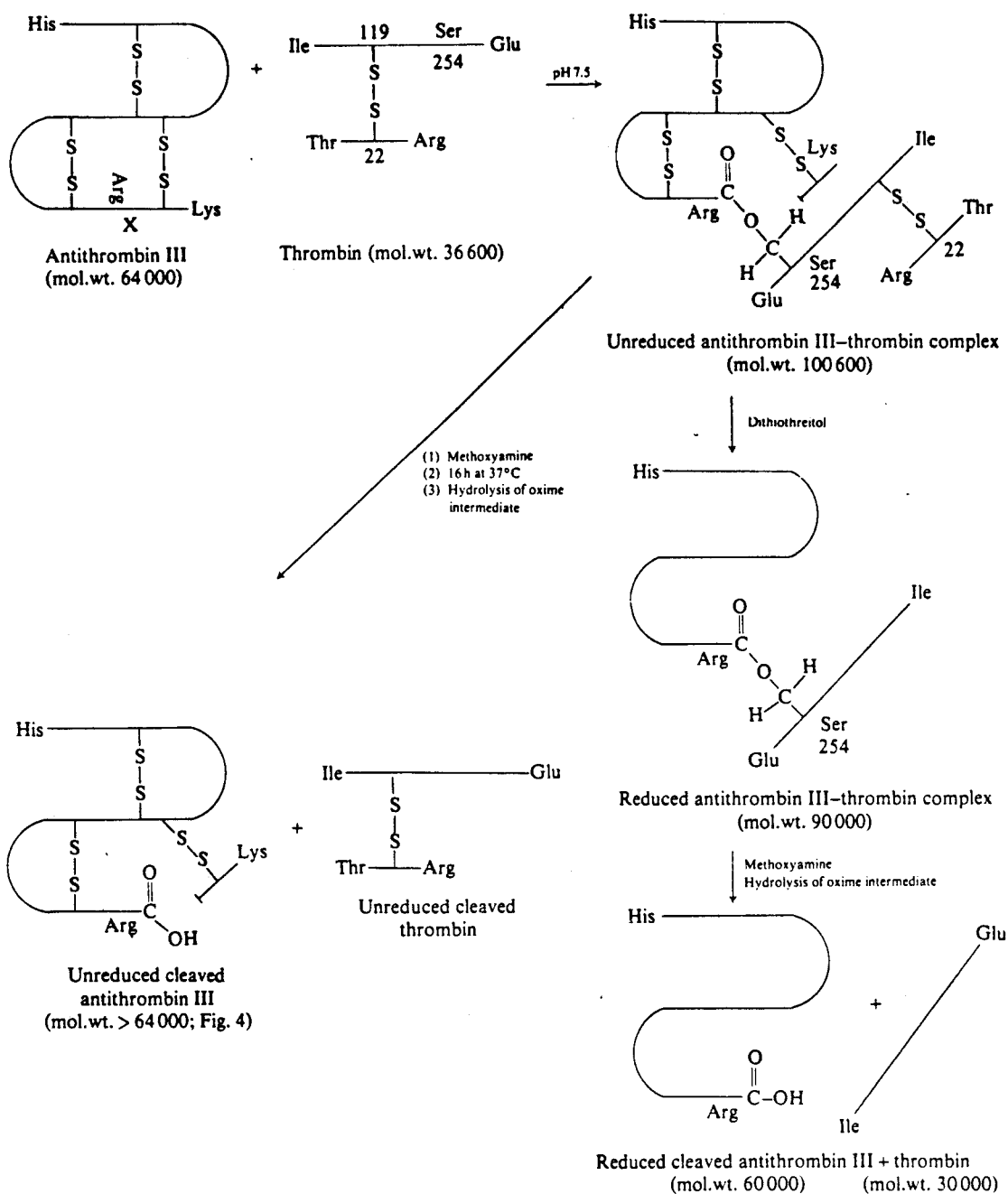


Figure 6 : Schéma de la formation du complexe antithrombine III-thrombine et de sa dissociation par coupure chimique selon LONGAS et FINLAY (125).

Il est difficile d'effectuer une synthèse de tous les résultats des études sur les interactions AT-thrombine ou AT-facteur X_a après la publication des travaux de GRIFFITH et LUNDBLAD (71) qui sont, en partie, en contradiction avec les travaux précédents. Ces auteurs retrouvent, en effet, après dissociation du complexe AT-thrombine, à la fois de l'AT inactive et de l'AT active, ce qui remet en cause le mécanisme d'action proposé par FISH et BJÖRK (61). De plus, par rapport à la quantité de thrombine libérée, la quantité d'AT active dissociée du complexe diminue lorsque le pH augmente de 7,0 à 9,5. Ceci suggère que la formation du complexe AT-thrombine est réversible; la transformation en AT modifiée est plus importante lorsque le pH augmente. Pour ces auteurs, l'inhibition de la thrombine par l'AT ne nécessite donc pas obligatoirement la formation d'une liaison acyl entre la sérine du site actif de la thrombine et un carbone carbonyle de l'AT. La formation d'une liaison acyl serait donc une réaction secondaire qui pourrait se produire pendant l'inhibition de la thrombine par l'AT, mais ne serait pas absolument nécessaire pour l'inhibition de la thrombine.

Les interactions entre la thrombine et l'AT ont été également étudiées à l'aide de techniques immunologiques par plusieurs équipes (46,53,115,211). L'AT modifiée, comme le complexe AT-thrombine, possèdent des déterminants antigéniques qui n'existent pas dans les molécules natives. La coupure de la liaison Arg-Ser (résidus 385-386) dans la molécule d'AT provoquerait la formation de "néo-antigènes". Lorsque le complexe AT-thrombine purifié est injecté à un animal, l'antisérum obtenu ne présente que très peu de réactivité pour la thrombine et l'AT native, mais réagit avec les "néo-antigènes" de l'AT modifiée. Ces expériences prouveraient donc que, dans le complexe, l'AT se trouve sous forme modifiée. McDUFFIE et coll (53) sont cependant prudents dans l'interprétation des résultats qu'ils obtiennent : ils observent en effet que chez l'animal hôte peuvent se produire des interactions entre, d'une part, l'AT et la thrombine présentes dans le complexe injecté et, d'autre part, les protéines réactives correspondantes de l'animal, respectivement la thrombine et l'AT, ces phénomènes pouvant compliquer l'interprétation des résultats obtenus.

- Interactions avec d'autres protéases.

DANIELSSON et BJÖRK (49) ont étudié la réaction de l'AT avec la trypsine pour déterminer si le mécanisme d'inhibition est identique à celui des

protéases intervenant dans la coagulation. En absence d'héparine, l'inhibition de la trypsine par l'AT est 20 fois plus rapide que l'inhibition de la thrombine, cependant le mécanisme d'action semble être le même : la réaction de l'AT avec la trypsine provoque simultanément la formation d'un complexe et d'une AT modifiée qui est identique à celle obtenue après interaction de l'AT avec la thrombine ou le facteur X_a .

Selon WONG et coll (220), la réaction entre la trypsine pancréatique bovine et l'AT humaine peut servir de modèle pour la réaction de l'AT avec les protéases de la coagulation. L'AT inhibe l'activité estérasique et amidasique de la trypsine. La formation d'un complexe stoechiométrique AT-trypsine est mise en évidence en électrophorèse sur gel de polyacrylamide ; l'hydroxylamine provoque la dissociation de ce complexe. Mais ce complexe est également capable de se dissocier spontanément et rapidement en libérant de la trypsine active dont la demi-vie est d'environ 15 mn. Lorsque l'AT est en excès au début de la réaction, la trypsine libérée du complexe réagit ensuite avec les molécules d'AT intactes, aucune activité inhibitrice de la thrombine ne peut en effet être retrouvée dans ces mélanges, alors que de l'activité tryptique peut être décelée. Pour éviter les phénomènes secondaires dus à la présence de protéase active libre dans le mélange réactionnel et pouvoir ainsi déterminer sous quelle forme, active ou inactive, l'AT est libérée du complexe, ces auteurs procèdent à une prise en charge de la trypsine par un autre inhibiteur dès sa libération du complexe. Lorsque du STI en large excès est ajouté après un temps court de réaction entre la trypsine et l'AT, l'association entre la trypsine libérée et l'AT en excès devient négligeable.

A un mélange équivalent d'AT et de trypsine incubé pendant 20 secondes est ajouté un large excès de STI. On laisse s'opérer la dissociation du complexe pendant 48 heures, puis les constituants du mélange sont séparés par passage sur une colonne d'agarose-héparine. Il est alors possible d'isoler une forme d'AT qui a gardé sa capacité de se lier à l'héparine mais qui, par contre, ne peut plus inhiber des enzymes comme la trypsine ou la thrombine. Cette forme d'AT ne correspondrait ni à la forme native, ni à la forme modifiée telle que celle qui est décrite par DANIELSSON et BJÖRK (49), mais aucune caractéristique supplémentaire n'est donnée.

WONG et coll concluent néanmoins que la trypsine réagit avec l'AT de la même manière que la thrombine. Le complexe AT-trypsine se dissocie cependant plus rapidement même si il subsiste, selon ces auteurs, un peu de complexe AT-trypsine stable. L'équation qui permet de représenter le mieux les réactions qui peuvent se produire lors de l'interaction de l'AT (I) avec les enzymes (E) qu'elle inhibe est la suivante :



où L est le complexe du type "enzyme-substrat", C le complexe covalent et I* l'inhibiteur modifié (220).

KRESS et CATANESE (108) montrent que l'AT est inactivée par le venin de serpent crotalide, vipéride ou colubride. Les protéases capables d'inactiver l'AT sont donc largement répandues parmi les familles de serpents venimeux. L'inactivation est due à l'action de métallo-protéases présentes dans ces venins puisque l'addition d'EDTA arrête la réaction. Dans la plupart des cas, la préincubation de l'AT avec de l'héparine accélère la réaction. Ces auteurs montrent en SDS-PAGE qu'aucun complexe ne se forme entre la protéase de venin et l'AT, mais que l'AT est transformée en une forme inactive après coupure protéolytique par la protéase de venin de serpent. Ces mêmes auteurs étudient ensuite (109) l'inactivation de l'AT par la protéase II* du venin de *Crotalus adamanteus*. Les résultats obtenus diffèrent suivant que la réaction se déroule en présence ou en absence d'héparine. En présence d'héparine, l'action de la protéase II sur l'AT native, de $M_r = 60\ 000$ selon ces auteurs, provoque d'abord la formation d'une molécule de $M_r = 56\ 000$ qui a gardé son activité inhibitrice envers la thrombine; une protéolyse plus poussée aboutit à la formation d'une molécule de $M_r = 50\ 000$ qui, cette fois, n'a plus d'activité inhibitrice. Les analyses des séquences des peptides libérés montrent que trois coupures interviennent : d'abord au niveau de la liaison Glu-Gln (résidus 37-38), puis au niveau des liaisons Ala-Ser (résidus 375-376) et Ala-Val (résidus 378-379). La réaction de la protéase II sur l'AT en absence d'héparine provoque une perte très lente de l'activité inhibitrice et la transformation en un constituant de M_r égale à 56 000 qui est inactif. Dans ce cas, la protéase II hydrolyse uniquement la liaison Ala-Ser (résidus 375-376). La liaison Arg-Ser (résidus 384-385) qui constitue le site actif de l'AT n'est pas coupée par la protéase II de venin, que ce soit en présence ou en absence d'héparine. La protéase II inactive donc l'AT en effectuant la coupure d'une

* La protéase est une métallo-protéase.

liaison située dans la partie C-terminale de la molécule à une distance de 9 résidus du site actif.

Une réaction assez semblable se produirait avec une sérine protéase, l'élastase leucocytaire. JOCHUM et coll (94) montrent que l'interaction de cette élastase avec l'AT humaine aboutit à l'inactivation de cet inhibiteur : l'AT n'a aucune action inhibitrice sur l'élastase mais perd, par contre, rapidement, son activité envers la thrombine. Cette forme inactive d'AT a une affinité réduite pour l'héparine mais n'est pas dégradée fortement par l'élastase : il n'y aurait pas plus de 2 liaisons peptidiques coupées par l'élastase. Ces auteurs suggèrent que la ou les liaisons coupées par l'élastase se situent à proximité ou même au niveau du site actif de l'AT. Ce processus de dégradation de l'AT par l'élastase de granulocytes constitue sans doute une des explications du taux faible d'AT active dans certaines affections (94).

I - 3.4 α_2 -antiplasmine (AP).

La caractérisation d'un nouvel inhibiteur de protéase du plasma humain se liant au plasminogène est menée à bien simultanément par trois groupes de chercheurs en 1976 : MOROI et AOKI (140), COLLEN (45), MÜLLERTZ et CLEMMENSEN (143).

I - 3.4.1 Propriétés physico-chimiques.

La capacité de ce constituant d'inhiber très rapidement la plasmine a justifié son nom, α_2 -antiplasmine, et explique l'intérêt que lui portent de nombreux auteurs : elle joue en effet un rôle important au cours du processus de fibrinolyse. Rappelons que la fibrinolyse est le résultat de toute une série de réactions qui débute par la protéolyse limitée d'un zymogène inactif, le plasminogène (figure 1). Cette protéolyse est effectuée par l'urokinase et aboutit à la formation de plasmine active. MOROI et AOKI (140) montrent que l'AP agit bien sur la plasmine libérée qui se trouve ainsi inhibée et non sur l'urokinase lors de l'étape précédente. Dans le plasma, d'autres inhibiteurs comme l' α_2 M, l' α_1 PI, l'AT, le C₁-Inactivateur, l'IaI, possèdent une activité anti-plasmine, mais l'AP est l'inhibiteur qui réagit le plus rapidement. La concentration normale de l'AP dans le plasma est de 70 mg/litre.

Cet inhibiteur est une glycoprotéine formée d'une seule chaîne polypeptidique dont les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement l'asparagine et la leucine. L'AP a une M_r voisine de 70 000. Les sucres représentent à peu près 14 % de la molécule qui contient donc environ 500 acides aminés. CLEMENSEN (42) a montré que l'AP existe sous 2 formes moléculaires capables toutes deux d'inactiver la plasmine. Une seule forme possède une affinité pour le plasminogène. La forme qui n'a pas d'affinité pour le plasminogène représente environ 40 % de l'inhibiteur présent dans le plasma. Beaucoup d'auteurs n'ont pas observé ces deux formes d'AP, car ils utilisaient une étape de chromatographie d'affinité sur colonne de plasminogène couplé à du Sepharose lors de leur protocole de purification.

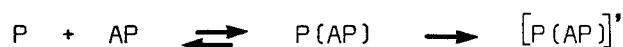
I - 3.4.2 Interactions avec les sérine-protéases.

- Interaction avec la plasmine.

L'AP réagit avec la plasmine pour former un complexe stoichiométrique dans lequel la plasmine a perdu son activité. Ce complexe très stable possède une M_r voisine de 140 000 déterminée en SDS-PAGE dans des conditions non réductrices. On peut donc penser qu'il existe une liaison covalente entre le site actif de la plasmine et la molécule d'AP (45, 140, 143).

WIMAN et COLLEN (218) présentent un schéma du complexe AP-plasmine (figure 7 A, p : 45) sur lequel apparaissent les deux chaînes (A et B) de la plasmine reliées par des ponts disulfure. Après réduction, le complexe se scinde en 2 ou 3 parties ; dans le cas où la réaction est effectuée en excès d'AP, on obtient d'une part la chaîne A de la plasmine ($M_r = 60\ 000$) et d'autre part, un complexe très stable de $M_r = 80\ 000$ formé par la chaîne B de la plasmine et l'AP. Par contre, lorsque la réaction a lieu en excès de plasmine, la réduction provoque la transformation du complexe AP - chaîne B de la plasmine en un constituant de $M_r = 65\ 000$, tandis qu'un peptide de $M_r = 14\ 000$ est libéré. Ce peptide ne jouerait en fait aucun rôle dans la formation du complexe mais résulterait d'un phénomène secondaire de dégradation dû à la plasmine en excès exerçant son action sur la partie N-terminale de la chaîne B de la plasmine engagée dans le complexe. Les études cinétiques effectuées par WIMAN et COLLEN (217) indiquent que la réaction doit se faire en 2 étapes : la première réaction est très

rapide, elle est en effet une des réactions les plus rapides qui se produisent entre des protéines ; elle est du second ordre et est réversible. Cette première étape dépend de l'accessibilité d'une part des résidus de lysine du site de liaison de la chaîne A et, d'autre part, du site actif situé dans la chaîne B de la plasmine. La deuxième étape est une transition du premier ordre plus lente et irréversible au cours de laquelle le complexe initial se transforme en complexe modifié $[P(AP)]'$ dans l'équation suivante qui peut sans doute représenter la réaction :



où P est la plasmine et P(AP) le complexe initial (217).

En 1979, WIMAN et COLLEN (219) montrent que la réaction de la plasmine avec l'AP, lorsqu'elle se déroule en excès d'AP, est accompagnée de la libération d'un peptide de M_r égale à 8 000 qui n'est pas lié par des ponts disulfure puisqu'il est libéré en présence de SDS sans nécessiter d'agent réducteur. Il peut être séparé du complexe AP-plasmine par une chromatographie de gel-filtration sur Sephacryl S200 en présence de SDS 0,04 %. Ce peptide a comme séquence N-terminale : Met-Ser-Leu-Ser-Gly-Phe et sa séquence C-terminale est identique à celle de l'AP native. Ce peptide correspond donc à l'extrémité C-terminale de la molécule d'AP.

En présence d'ammoniaque 1,5 M, le complexe AP-plasmine est dissocié et il y a libération de plasmine active (à raison de 0,2 mole par mole de complexe) et d'une forme modifiée d'inhibiteur présentant une M_r égale à 60 000 (soit inférieure de 10 000 à celle de l'AP native selon ces auteurs). La séquence N-terminale de cette AP modifiée est identique à celle de l'AP native tandis que sa séquence C-terminale est Ala-Leu. La plasmine a donc hydrolysé une liaison Leu-Met située dans la région C-terminale de l'AP. Par analogie avec le processus de la formation d'un complexe entre la trypsine et les inhibiteurs de trypsine, on pense qu'il doit y avoir, lorsque la plasmine interagit avec l'AP, formation d'une liaison covalente entre la sérine du site actif de la plasmine et le carbonyl du résidu de leucine qui entre dans la liaison peptidique coupée par la plasmine. Ces auteurs n'ont pas encore pu déterminer si cette liaison covalente est du type de celle qui existe dans un intermédiaire tétrahédrique ou s'il s'agit d'une liaison ester. Dans la mesure où la chaîne B de la plasmine est intacte, la dissociation du complexe par l'ammoniaque 1,5 M peut provoquer la libération de plasmine

active. Quand la plasmine est en excès, elle effectue des coupures supplémentaires dans le complexe AP-plasmine que ce soit dans la chaîne B de la plasmine, dans la partie N-terminale de l'AP ou dans le peptide de M_r égale à 8 000. Dans ce cas, la dissociation du complexe ne libère pas d'enzyme actif.

PLOW et coll (163) ont recherché les modifications éventuelles de la structure tertiaire de l'AP produites au cours de la formation du complexe avec la plasmine en appliquant des méthodes immunochimiques quantitatives. A l'aide d'un immunosérum spécifique de l'AP native, ils comparent les propriétés immunochimiques de l'AP libre, de l'AP engagée dans un complexe avec la plasmine et de l'AP' obtenue après dissociation du complexe et qui correspond à l'AP amputée du peptide C-terminal. PLOW et coll (163) distinguent 2 types de complexe : le complexe formé en présence d'excès d'AP, PAP-A, et le complexe formé en présence d'excès de plasmine, PAP-P. En fait, l'immunosérum spécifique de l'AP native contient différentes populations d'anticorps reconnaissant chacune certains déterminants antigéniques. Dans la molécule d' AP, 4 séries de déterminants antigéniques ont été individualisés et sont localisés suivant le schéma de la figure 7B. Les déterminants notés I ne sont pas affectés lors de la formation du complexe. Les déterminants notés II sont présents dans AP et dans PAP-A, mais n'existent ni dans PAP-P, ni dans AP'. Les déterminants II doivent cependant être partiellement masqués dans PAP-A par la chaîne A de la plasmine car la réaction obtenue est faible. Les déterminants notés III et IV existent dans l'AP native, mais n'existent ni dans l'AP engagée dans un complexe ni dans AP'. Leur localisation est différente : les déterminants III se trouvent dans la partie C-terminale, tandis que les déterminants IV correspondent à une région très proche du site réactif de la molécule d'AP. Après des études d'inhibition compétitive en radio-immuno-essai, PLOW et coll (163) concluent que lorsque l'AP forme un complexe avec la plasmine, les changements de conformation et de structure primaire qui interviennent intéressent essentiellement la région C-terminale de la molécule.

Plus récemment, NILSSON et WIMAN (146) démontrent que la liaison de la plasmine avec l'AP est différente de celle qui existe entre la plasmine et le STI. Le complexe AP-plasmine est beaucoup plus stable que le complexe STI-plasmine. Le STI obtenu après dissociation par l'AP du complexe STI-plasmine se trouve sous forme intacte. Par contre, ces auteurs ont pu montrer qu'au cours de la formation du complexe AP-plasmine, il y avait bien coupure d'une liaison peptidique dans l'AP, puisque l'apparition d'un nouvel acide aminé N-terminal, la méthionine, est bien proportionnelle à la quantité de complexe formé. Ceci permet

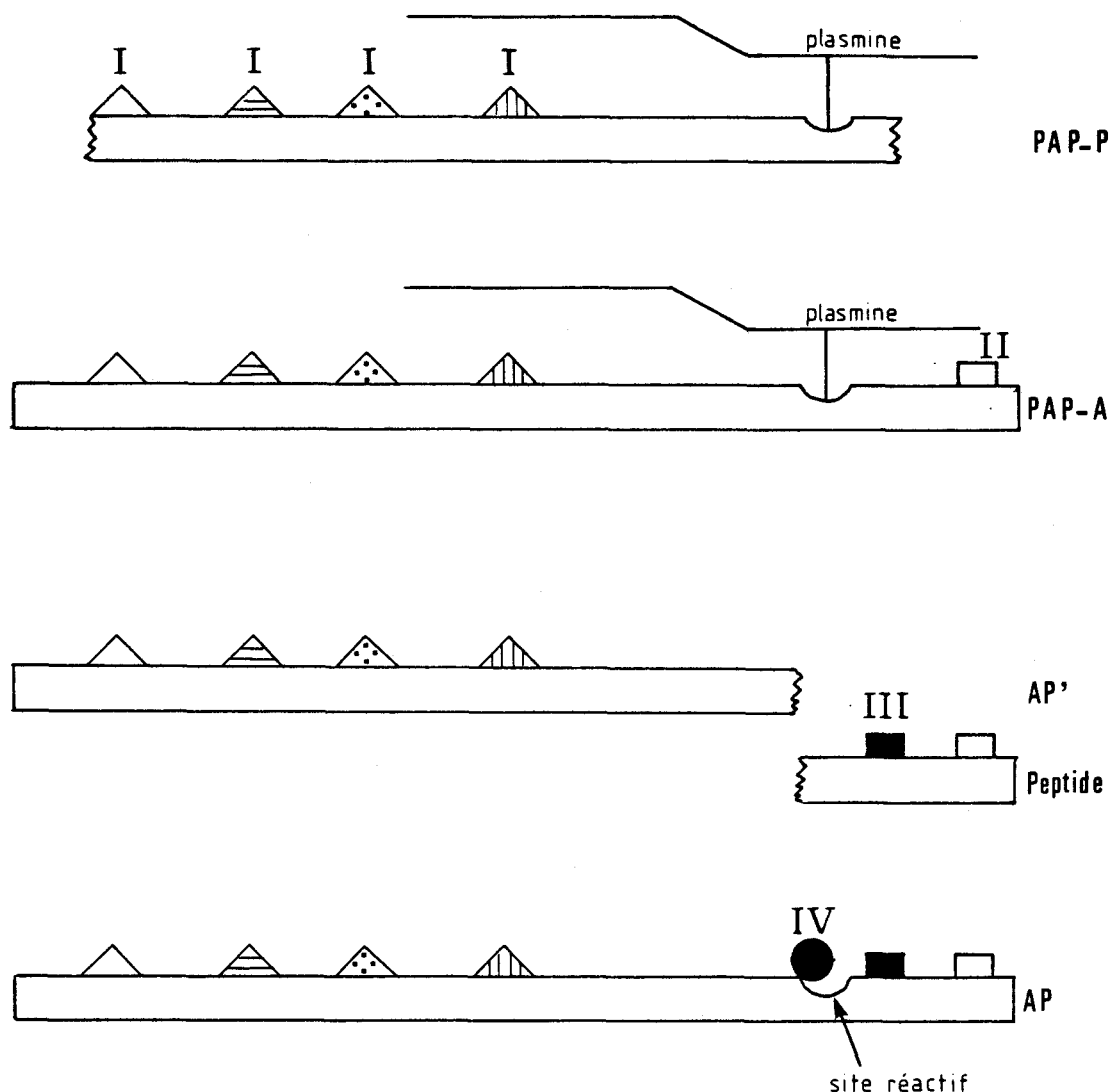


Figure 78 : Représentation schématique des déterminants antigéniques majeurs de l' α_2 -antiplasmine reconnus par l'immunsérum anti- α_2 -antiplasmine native d'après PLOW et coll (163).

Les signes , ,  et  représentent respectivement les déterminants notés I, II, III et IV.

PAP-P : complexe plasmine - α_2 -antiplasmine formé en présence d'excès de plasmine

PAP-A : complexe plasmine - α_2 -antiplasmine formé en présence d'excès d'AP

AP' : α_2 -antiplasmine amputée du peptide C-terminal

aux auteurs d'écarter l'hypothèse de la formation d'un intermédiaire tétrahédrique et d'établir qu'il doit y avoir formation d'une liaison ester entre le groupement carboxylique de l'acide aminé engagé dans la liaison qui constitue le site réactif de l'inhibiteur et le groupement hydroxyle du site actif de la plasmine.

- Interaction avec d'autres sérine-protéases.

L'AP est capable d'inhiber la trypsine en formant un complexe non dissociable en milieu SDS. EDY et COLLEN (55) montrent qu'en immunoélectrophorèse bidimensionnelle, ce complexe avec la trypsine a, à pH 8,6, une mobilité plus cathodique que celle de l'AP native. Toutefois, en excès de trypsine, le complexe est dégradé en un constituant de migration plus anodique.

MOROI et AOKI (141) ont comparé la réaction de l'AP avec l'anhydrotrypsine* d'une part et la trypsine native d'autre part. En électrophorèse sur gel de polyacrylamide, un complexe est mis en évidence dans les deux cas, mais en présence de SDS le complexe AP-anhydrotrypsine est dissocié. Puisque l'anhydrotrypsine présente une structure semblable à celle de la trypsine active, les résultats précédents suggèrent que la formation du complexe entre l'AP et la trypsine fait intervenir des liaisons faibles en plus de la liaison covalente dans laquelle est engagée la sérine du site actif de l'enzyme.

Des études effectuées par BROWER et HARPEL (32) ont montré récemment que l'élastase leucocytaire humaine inactive progressivement l'activité inhibitrice de l'AP envers la plasmine même dans un rapport molaire élastase/inhibiteur faible (0,14). Cette inactivation est provoquée par deux coupures protéolytiques effectuées par l'élastase en deux sites différents ; des fragments semblables à ceux obtenus après action de la β -trypsine bovine ou de la plasmine sur l'AP sont ainsi produits. Il existe donc dans la molécule une région particulièrement sensible à l'action des enzymes. Lors de la libération de l'élastase leucocytaire en grande quantité au cours des réactions inflammatoires, l'inactivation de l'AP qu'elle provoque peut avoir des conséquences importantes : le taux faible d'AP active ne permet plus la régulation normale de l'activité de la plasmine.

* Anhydrotrypsine : dérivé catalytiquement inactif de la trypsine dans lequel le résidu de sérine du site actif a été converti en résidu de déhydroalanine.

I - 3.5 α_1 -antichymotrypsine (α_1 Achy)

Dans cette brève revue consacrée à cet inhibiteur de sérine-protéases, nous résumerons les connaissances acquises avant 1977, date à laquelle nous avons entrepris son étude. Les travaux ultérieurs sur cet inhibiteur sont peu nombreux. Ils seront présentés au fur et à mesure et comparés avec nos résultats.

L' α_1 Achy est isolée pour la première fois par SCHULTZE et coll en 1962 (179) sous l'appellation de α_1 -X-glycoprotéine. La même équipe démontre 3 ans plus tard (75) que la glycoprotéine qui a été purifiée est un inhibiteur de chymotrypsine et lui donne le nom d' α_1 -antichymotrypsine. Le protocole de préparation utilisé alors est assez complexe : nous y reviendrons au début du deuxième chapitre. Selon ces auteurs, l' α_1 Achy possède une M_r égale à 69 000 environ ; les glycannes représentent 24 % du poids de la molécule. Ce constituant est relativement labile, en particulier à des pH inférieurs à 5,0 ; il est aussi dénaturé après un séjour de 30 minutes à 56°. La molécule est dépourvue de cystéine. Elle inhibe la chymotrypsine, mais n'a pas d'action sur la trypsine, la plasmine ou la thrombine. L' α_1 Achy est un marqueur de l'inflammation : son taux peut doubler en l'espace de 8 heures après une atteinte tissulaire (3).

RYLEY et BROGAN font en 1973 une étude comparative de certains constituants protéiques dans le plasma et dans la sécrétion bronchique (170). Ils constatent que le rapport α_1 PI/ α_1 Achy est, de façon significative, plus élevé dans le sérum que dans la phase soluble du mucus bronchique humain. L' α_1 Achy peut vraisemblablement jouer un rôle important dans le poumon : elle possède en effet un pouvoir d'inhibition spécifique à l'égard de 3 protéases neutres isolées de granulocytes neutrophiles, appelées protéases cationiques, qui présentent une activité de type chymotrypsique (167). Le rôle physiologique de l' α_1 Achy serait d'autant plus déterminant que dès les premiers stades du processus inflammatoire, les facteurs chimiotactiques libérés attirent les neutrophiles.

OHLSSON et AKESSON (151) ont comparé l'efficacité de l' α_1 Achy, de l' α_1 PI et l' α_2 M pour l'inhibition des protéines cationiques de granulocytes qui ont une activité de type chymotrypsique. Ils ont effectué des mélanges de sérum humain et du composant 3 (de M_r égale à 28 500), marqué par l'isotope 125 I, qui est l'une des quatre protéines cationiques individualisées par ces auteurs. Ils

ont ensuite déterminé la quantité de protéine marquée liée à l' α_1 Achy, l' α_1 PI et l' α_2 M en mesurant, après immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec les immunosérums spécifiques, la radioactivité contenue dans les différents pics. Leurs résultats montrent que la protéine cationique se fixe préférentiellement sur l' α_2 M et qu'elle a une affinité plus forte pour l' α_1 Achy que pour l' α_1 PI. Les complexes α_1 Achy-protéine cationique ont une mobilité β_2 -globulinique en électrophorèse en gel d'agarose. Ainsi pour OHLSSON et AKESSON (151), la présence dans un liquide biologique d'un constituant ayant une mobilité β_2 -globulinique et réagissant avec l'immunsérum anti- α_1 Achy indique qu'il y a eu dans ce liquide libération de protéines cationiques ayant une activité de type chymotrypsique.

La concentration sérique de l' α_1 Achy (400 mg/litre) est bien inférieure à celle de l' α_1 PI (2 à 4 g/litre), mais la rapidité avec laquelle s'élève le taux sérique de l' α_1 Achy lors d'une réaction inflammatoire laisse supposer un rôle très important de l' α_1 Achy dans la défense des tissus contre les protéines cationiques de type chymotrypsique libérées des granulocytes neutrophiles.

Notons enfin que ORJASAETER (155) a montré que l' α_1 Achy était présente dans des extraits perchloriques de tumeurs malignes. De plus, il a établi que l' α_1 Achy se caractérisait par des réactions antigéniques croisées avec l'antigène carcinoembryonnaire, mais cela a été infirmé depuis (104).

Pour terminer, mentionnons que BREHM et coll (31) ont identifié l' α_1 Achy parmi les protéines sériques présentant de l'affinité pour l'ADN. Cette propriété a d'ailleurs été ultérieurement mise à profit pour isoler l' α_1 Achy sérique, nous reviendrons sur les différents protocoles mis au point dans le chapitre II.

Les connaissances sur l' α_1 Achy étaient donc très limitées et, en particulier, aucun élément concernant le mécanisme d'action de cet inhibiteur sur les sérine-protéases n'était déterminé.

En ce qui concerne les quatre principaux inhibiteurs de sérine protéases que nous avons passés en revue, deux types de mécanisme d'action peuvent être schématisés comme suit. Il y a tout d'abord le mécanisme particulier de l' α_2 M : l'hydrolyse d'une liaison peptidique dans la région cible de la molécule (dans 2 des 4 sous-unités de M_r 185 000 pour la liaison d'une molécule de trypsine) est suivie d'un changement de conformation qui entraîne la rupture des

liaisons thioester ; l' α_2 M peut alors "encercler" jusqu'à 2 molécules d'enzyme par molécule d'inhibiteur ; dans ce cas la sérine du site actif de l'enzyme n'est pas engagée dans une liaison avec l'inhibiteur et la sérine-protéase possède encore une activité au moins sur les petits substrats. En ce qui concerne les trois autres inhibiteurs, c'est-à-dire l' α_1 PI, l'AT et l'AP, même si le consensus n'est pas encore général, un certain nombre d'observations communes laissent penser qu'ils doivent obéir à un mécanisme d'action qui pourrait être le suivant : il y a formation très rapide d'un complexe inhibiteur-enzyme équimoléculaire de type "enzyme-substrat" stable en présence de SDS, ce qui pourrait suggérer un complexe de nature covalente. Les auteurs pensent généralement qu'une liaison s'établit entre l'hydroxyle de la sérine du site actif de l'enzyme et le carbonyle de la liaison cible qui a été coupée lors de la formation du complexe. Cette réaction d'acylation pouvant être suivie d'une désacylation permettrait d'expliquer la dissociation spontanée qui a pu être observée dans chacun des cas, conduisant à de l'enzyme au moins partiellement actif et à une forme d'inhibiteur ayant perdu ses propriétés inhibitrices.

Nous essaierons de définir à quel type de mécanisme peut se rattacher celui de l' α_1 Achy.

Le premier chapitre rassemble les généralités sur les sérine-protéases et les connaissances actuelles sur leurs principaux inhibiteurs du sérum humain (α_2 -macroglobuline, α_1 -antiprotéase, antithrombine III et α_2 -antiplasmine).

L' α_2 -macroglobuline se distingue nettement des autres inhibiteurs par sa taille, la grande variété des enzymes qu'elle inhibe et son mécanisme d'action : l'inhibition de l'activité protéasique de l'enzyme est due à un empêchement stérique dans le complexe formé entre l'inhibiteur et l'enzyme. Le site actif de l'enzyme n'est pas impliqué dans la liaison enzyme-inhibiteur.

Les autres inhibiteurs diffèrent les uns des autres par leurs propriétés physico-chimiques, leurs taux sériques normaux et leurs enzymes-cibles. Ils peuvent néanmoins être rassemblés dans un même groupe car ils présentent un mécanisme d'action similaire. Le complexe équimoléculaire formé avec l'enzyme est de type "enzyme substrat" : après la coupure d'une liaison peptidique dans la partie C-terminale de l'inhibiteur, une liaison se forme entre le nouvel acide aminé en position C-terminale et la sérine du site actif de l'enzyme. L'instabilité des complexes a été mentionnée par de nombreux auteurs.

Aucun mécanisme n'est décrit dans la littérature pour l' α_1 -antichymotrypsine.

CHAPITRE II

PURIFICATION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L' α_1 -ANTICHYMOTRYPSINE

II - 1 PURIFICATION DE L' α_1 -ANTICHYMOTRYPSINE

II - 1.1 Choix des méthodes

II - 1.2 Protocoles actuels

II - 1.3 Protocoles de purification de l' α_1 Achy publiés par d'autres auteurs

II - 2 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

II - 2.1 Masse moléculaire relative

II - 2.2 Comportement en électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 %) à pH 8,3 et en immunoélectrophorèse bidimensionnelle

II - 2.3 Détermination du point isoélectrique

II - 2.4 Composition chimique de l' α_1 Achy

II - 2.5 Interactions avec la concanavaline A

II - 2.6 Détermination de la séquence amino-terminale

II - 2.7 Stabilité de l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy après divers traitements physiques ou chimiques.

BBA 38669

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α_1 -ANTICHYMOTRYPSIN FROM HUMAN PLEURAL FLUID AND HUMAN SERUM

A. LAINE and A. HAYEM

Unité des Proteines No. 16 INSERM, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex (France)

(Received October 14th, 1980)

Key words: Human α_1 -antichymotrypsin; Chymotrypsin inhibitor; (Human serum)

Summary

Human α_1 -antichymotrypsin was purified from human pleural fluid and from human serum. Four affinity chromatographic steps were required to obtain pure α_1 -antichymotrypsin. Pleural and serum α_1 -antichymotrypsin have the same molecular weight, which was estimated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis to be 58 000. The chemical composition of the two types of α_1 -antichymotrypsin is the same. Using a technique for visualization of the chymotrypsin inhibitors, we showed that the pure α_1 -antichymotrypsin obtained from the two physiological fluids had its inhibitory capacity preserved.

Introduction

Human protease inhibitors are extensively studied because of their possible role in the development of diseases such as cystic fibrosis [1], pulmonary emphysema [2] and thrombotic episodes [3]. However, as compared to other protease inhibitors, scant data have been reported concerning α_1 -antichymotrypsin. Interest upon this inhibitor lies in its specificity for chymotrypsin-like enzymes which seem to play an important role in different physiological mechanisms [4,5].

α_1 -Antichymotrypsin was first isolated from human serum by Heimburger and Haupt [6] but their purification procedure was very complicated. More recently Travis et al. [7] have described another method for the purification of serum α_1 -antichymotrypsin and reported some of its properties. This method was less complicated, but it was based upon a weak interaction between the inhibitor molecule and Cibacron Blue Sepharose which seemed difficult to con-

Abbreviation: SDS, sodium dodecyl sulfate.

trol because it was dependent on factors such as temperature and pH.

The present work describes an easier procedure to purify serum type α_1 -antichymotrypsin from pleural fluid, which is easy to obtain in large amounts. Since our results were different from those of Travis et al. [7] obtained with serum α_1 -antichymotrypsin (particularly with regard to the molecular weight), we also had to purify α_1 -antichymotrypsin from human serum using the same procedure.

During the isolation procedure of α_1 -antichymotrypsin, a fraction containing mainly α_1 -antitrypsin was also obtained. Some of the chemical properties of pleural and serum purified α_1 -antichymotrypsin are described and discussed in relation to the previous data [7].

Materials and Methods

Materials. Thiopropyl-Sepharose, Thiol-Sepharose and Sepharose 4B were purchased from Pharmacia Fine Chemicals. Acrylamide, *N,N'*-methylene bisacrylamide and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine were from BDH chemicals Ltd. α -Chymotrypsin treated with *N*- α -*p*-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone hydrochloride, *N*-acetyl-DL-phenylalanine- β -naphthyl ester and *O*-dianisidine tetrazotized were obtained from Sigma. Antisera to whole plasma and specific plasma proteins were purchased from Behring. Other chemicals were of analytical grade from Merck.

Human pleural fluid was collected from a patient suffering from pleurisy; it was an exudate fluid (Hospital Calmette, Lille, Chest Unit Pr. Voisin). Normal human pooled serum was obtained from the Chemistry Laboratory of the Lille hospital.

Immunoelectrophoretic studies. Crossed immunoelectrophoresis was carried out according to Clarke and Freeman [8].

Fused rocket immunoelectrophoresis was performed according to Svendsen and Rose [9]. At each chromatographic step, this method was applied to follow the distribution of proteins among fractions obtained in the separation experiment.

Using antiserum to whole plasma and specific antisera to α_1 -antichymotrypsin and α_1 -antitrypsin, we were able to localize these two antigens and determine the presence of other contaminants.

Polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical electrophoresis was carried out on polyacrylamide slab gels using the technique described by Kerckaert [10]. Electrophoresis was performed on 10% gels at pH 8.3 using the gel buffer system of Davis [11]. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on 10% gels or on 10–20% gel gradient using Laemmli's buffer system [12]. The Pharmacia low molecular weight electrophoresis calibration kit was used for molecular weight determination. After migration, proteins were precipitated in the gel with 12.5% trichloroacetic acid for 5 min and then the gel slabs were stained overnight by adding 10 ml 0.25% aqueous solution of Coomassie Brilliant Blue G250 per 100 ml 12.5% trichloroacetic acid (slight modification of the method described by Diezel et al. [13]).

Characterization of proteinase inhibitors in polyacrylamide gel. Chymotrypsin inhibitors were made visible in polyacrylamide gels by the method of Uriel

and Berges [14] which was slightly modified. After electrophoresis, the gel was first washed with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) and then incubated at 37°C for 1 h in 100 ml of the same buffer containing 2 mg α -chymotrypsin. After washing with the same buffer, staining was performed according to Uriel and Berges [14].

Chromatographic separations

These were performed at room temperature and monitored with absorbance at 280 nm. Concentrations were carried out by ultrafiltration in a Diaflo apparatus with a YM 5 membrane.

Preparation of the antihuman α_1 -antichymotrypsin column. 10 ml of antiplasma α_1 -antichymotrypsin antiserum (No. 3502 A, 0.71 mg antibodies/ml) were treated with 1.8 g Na_2SO_4 and kept at 25°C for 1 h and then overnight at 4°C. After centrifugation, the precipitate was washed with 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.3 M NaCl and 180 mg Na_2SO_4 /ml, and then centrifuged again. The precipitate was dissolved in deionized water, dialyzed against water for 3 days (three changes a day) and then freeze-dried. These anti- α_1 -antichymotrypsin antibodies were coupled with 45 ml Sepharose 4B, previously activated according to the CNBr method of March et al. [15].

Preparation of the antihuman serum albumin column. 10 ml antihuman serum albumin antiserum (No. 3105 A, 1.06 mg antibodies/ml) were treated using the same procedure as that used for the anti- α_1 -antichymotrypsin column.

Carbohydrate and amino acid analyses. The amino acid analysis was performed with a Multichrom B Beckman analyzer after hydrolysis of the sample in 5.6 M HCl for 24 h at 110°C in a tube sealed under vacuum. The cysteine content was measured as cystic acid after performic oxidation and hydrolysis.

Quantitative gas-liquid chromatography of carbohydrate was performed by the slightly modified method of Reinhold [16] according to Roussel et al. [17] with columns containing 3% OV17 on Chromosorb W.AW.DMCS 80–100 mesh (Supelco). The sialic acid content was measured with the thiobarbituric acid assay of Aminoff [18] after hydrolysis with 0.05 M H_2SO_4 for 30 min at 80°C.

N-terminal amino acid determination. The N-terminal amino acid was analyzed after Edman degradation [19] as phenylthiohydantoin amino acid which was identified by HPLC according to Hermann et al. [20] in a Hewlett Packard 1084 B Chromatograph.

Results

(I) α_1 -Antichymotrypsin purification from human pleural fluid

After filtration through a gauze, pleural fluid was kept frozen in 20 ml fractions until use. The pleural fluid contained 55–60 mg/100 ml of α_1 -antichymotrypsin (quantified by radial immunodiffusion [21]).

(1) The first step is affinity chromatography on a column of Thiopropyl-Sepharose (12 $\times$ 2.5 cm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl/0.01 M EDTA buffer (pH 8.1). 20 ml pleural fluid were diluted with 60 ml buffer and applied on the column and then recycled overnight. Elution was performed with the same buffer until the $A_{280\text{nm}}$ returned to the baseline. 250 ml were collected, α_1 -antichymotrypsin was found in the unbound fraction (fraction A) by fused

rocket immunoelectrophoresis with monospecific antiserum. The column was then washed with 0.1 M Tris-HCl/0.01 M EDTA (pH 8.1) containing 0.02 M mercaptoethanol. Fraction B contained mainly serum albumin (about 60% of the albumin present in pleural fluid).

(2) The α_1 -antichymotrypsin-containing fraction (fraction A), mixed with 1 μ l mercaptoethanol, was then applied on a Thiol-Sepharose column (14 $\times$ 2 cm) equilibrated in 0.1 M Tris-HCl/0.01 M EDTA (pH 8.1) buffer. The column was washed with the equilibrium buffer until the $A_{280\text{nm}}$ returned to the baseline. By fused rocket immunoelectrophoresis, α_1 -antichymotrypsin was detected in the unbound fraction (fraction A₁). When the column was subsequently washed with 0.1 M Tris-HCl/0.01 M EDTA buffer (pH 8.1) containing 0.02 M mercaptoethanol, fraction A₂ was eluted. Fused rocket immunoelectrophoresis indicated that this fraction consisted mainly of α_1 -antitrypsin, some serum albumin and traces of other proteins.

Fraction A₁ was dialyzed against deionized water for 48 h at 4°C with six changes and the precipitated euglobulins were then removed by centrifugation. The supernatant was concentrated in a Diaflo apparatus to a final volume of 30 ml: fraction A₁ conc.

(3) Immunoaffinity chromatography on the antihuman- α_1 -antichymotrypsin column. The anti- α_1 -antichymotrypsin column was equilibrated with 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.3 M NaCl and 0.02% NaN₃ (buffer 1). Fraction A₁ conc. was applied on this column in 20 ml fractions to which 2 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.65) containing 3 M NaCl and 0.2% NaN₃ were added, to adjust the ionic strength of the fraction to that of the column.

The column was washed with buffer 1 until the $A_{280\text{nm}}$ returned to the baseline. The bound α_1 -antichymotrypsin was then desorbed with 0.2 M glycine hydrochloride (pH 2.8) containing 0.5 M NaCl (buffer 2). 40 3.5 ml fractions were collected and were adjusted to pH 7.5 at once by adding 0.1 M NaOH. The elution was followed by fused rocket immunoelectrophoresis with anti-

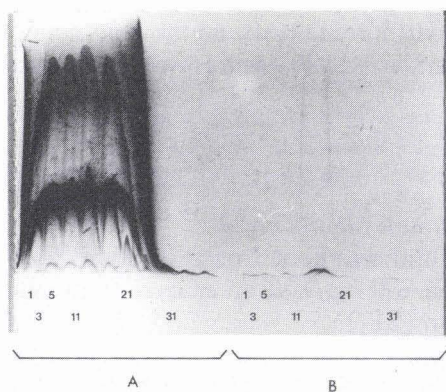


Fig. 1. Fused rocket immunoelectrophoresis with antiserum to whole human plasma on the fractions eluted during immunoaffinity chromatography on a anti- α_1 -antichymotrypsin column. Part A, washing of the column with 0.01 M sodium phosphate/0.3 M NaCl/0.02% NaN₃, pH 7.4 (buffer 1). Part B, elution with 0.2 M glycine hydrochloride/0.5 M NaCl, pH 2.8. (buffer 2). 3 μ l of every other fraction were placed in the slots.

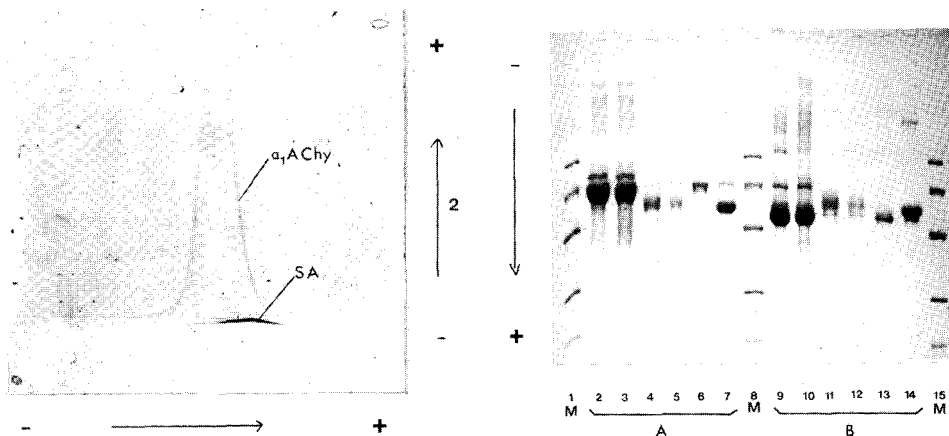


Fig. 2. Crossed immunoelectrophoresis with antiserum to whole human plasma of pleural α_1 -antichymotrypsin fraction eluted by buffer 2 from anti- α_1 -antichymotrypsin column (before the last step). α_1 -Achy, α_1 -antichymotrypsin; SA, serum albumin.

Fig. 3. SDS gel electrophoresis in a 10–20% gradient of polyacrylamide containing 1% SDS. Slots 1–8–15 (M), molecular weight markers: Phosphorylase *b* (94 000), bovine albumin (67 000), ovalbumin (43 000), carbonic anhydrase (30 000) and trypsin inhibitor (20 100). M and samples in part A of the gel were treated with 1% SDS/5% mercaptoethanol for 5 min, in boiling water. Samples in part B of the gel were treated with 1% SDS (without any mercaptoethanol) for 5 min in boiling water. Slots 2 and 9, fraction A₁ conc.; Slots 3 and 10, unbound proteins on anti- α_1 -antichymotrypsin column; Slots 4 and 11, 5 and 12, two samples of pleural α_1 -antichymotrypsin fraction eluted from anti- α_1 -antichymotrypsin column; Slots 6 and 13, human serum albumin (Behring); Slots 7 and 14, fraction A₂ (containing mainly α_1 -antitrypsin).

serum to whole human plasma (Fig. 1) or with antiserum to α_1 -antichymotrypsin.

The fractions eluted with buffer 2 were the only ones reacting with anti- α_1 -antichymotrypsin antiserum; they were combined and concentrated in a Diaflo apparatus. The electrophoretic study of this fraction showed that a trace of serum albumin still persisted (Fig. 2, and Fig. 3, slots 4 and 5). The purification procedure was completed by affinity chromatography on an antihuman serum albumin column in order to obtain pure α_1 -antichymotrypsin for amino acid and carbohydrate composition and for determination of its inhibitory capacity.

(4) Immunoaffinity chromatography on anti-serum albumin column. The chromatography was performed according to the same procedure and with the same buffers as in the third step. The α_1 -antichymotrypsin-containing fraction was applied on the column which was then washed with buffer 1. Fractions of 3.5 ml were collected. Only α_1 -antichymotrypsin was detected by fused rocket immunoelectrophoresis in the first 20 fractions. The bound serum albumin was eluted with buffer 2. The α_1 -antichymotrypsin-containing fractions were combined, concentrated in a Diaflo apparatus and then stored frozen.

(II) α_1 -antichymotrypsin purification from human serum

α_1 -Antichymotrypsin was obtained from human serum using the same purification steps with 20 ml serum samples.

(III) Study of the α_1 -antichymotrypsin fractions

In crossed immunoelectrophoresis with an antiserum against whole human plasma, the α_1 -antichymotrypsin fraction, obtained before the last step (Fig. 2) from pleural fluid, showed a major peak of α_1 -antichymotrypsin and a very small arc of serum albumin.

The results of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on a 10–20% gradient are shown in Fig. 3. In the left part of the gel, samples were treated with 1% SDS/5% 2-mercaptoethanol for 5 min in boiling water. This procedure is required for the calibration kit protein mixture (slots 1–8–15) used for the determination of protein molecular weight; otherwise all the proteins in the kit could not be completely reduced and denatured. The two samples of the pleural α_1 -antichymotrypsin fraction eluted from the anti- α_1 -antichymotrypsin column (slots 4 and 5) contained mainly α_1 -antichymotrypsin and only a trace of serum albumin. α_1 -Antichymotrypsin moved farther than human serum albumin (slot 6) but slightly less than α_1 -antitrypsin, which is the main component in fraction A_2 (slot 7). To evaluate the molecular weight of α_1 -antichymotrypsin, a standard curve was made with the results obtained with the calibration kit protein mixture. The apparent molecular weight of α_1 -antichymotrypsin was estimated to be 58 000, while a value of 54 000 was obtained for α_1 -antitrypsin and 68 000 for human serum albumin.

In the right part of the gel, samples were treated with 1% SDS (without any mercaptoethanol) for 5 min in boiling water. In slots 11 and 12, α_1 -antichymotrypsin had the same mobility as in slots 4 and 5. α_1 -Antitrypsin (slot 14)

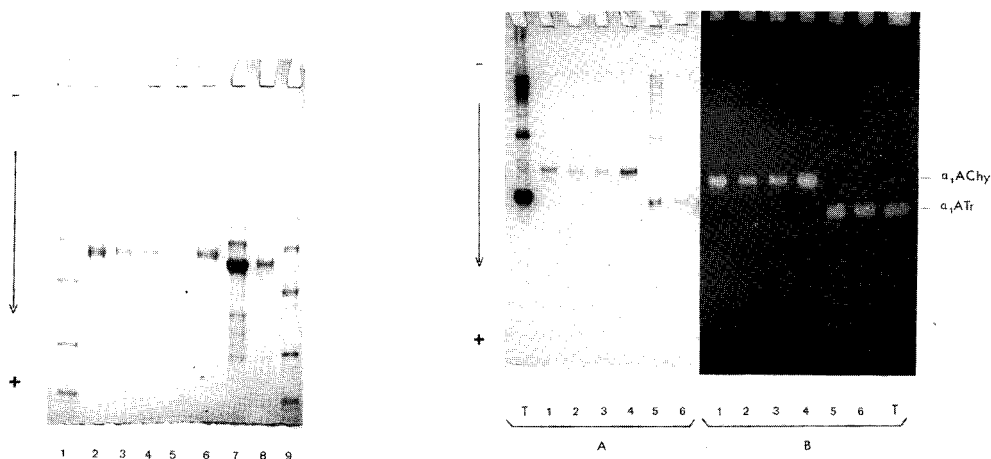


Fig. 4. SDS gel electrophoresis in 10% polyacrylamide containing 1% SDS. Samples were treated with 1% SDS/5% mercaptoethanol for 5 min in boiling water. Slots 1 and 9, molecular weight markers; Slots 2 and 3, α_1 -antichymotrypsin from human pleural fluid (two different preparations; about 2.5 and 1.5 μ g, respectively); Slots 4–5–6, α_1 -antichymotrypsin from human serum (three different preparations; about 1.5, 1 and 2.5 μ g, respectively); Slot 7, fraction A_2 ; Slot 8, purified α_1 -antitrypsin. The molecular weight markers are the same as in Fig. 3.

Fig. 5. Analytical gel electrophoresis on 10% polyacrylamide gel at pH 8.3. Part A, coloration with Coomassie Brilliant Blue G250; Part B, Visualization of chymotrypsin inhibitors by the Uriel technique; T, normal serum. Slots 1 and 2, α_1 -antichymotrypsin from pleural fluid; Slots 3 and 4, α_1 -antichymotrypsin from serum; Slot 5, fraction A_2 ; Slot 6, pure α_1 -antitrypsin. α_1 -Achy, α_1 -antichymotrypsin; α_1 ATr, α_1 -antitrypsin.

also showed the same behavior as in the left part of the gel (slot 7). On the other hand, serum albumin (slot 13) did not have the same mobility as in the presence of mercaptoethanol (slot 6), its molecular weight seemed to be smaller here. Similar patterns were observed for the remaining albumin in the α_1 -antichymotrypsin fractions (slots 11 and 12), and more visible for the albumin present in fraction A₁ (slots 2 and 9), it is the major protein constituent of this fraction.

In Fig. 4 are shown the results obtained upon SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel with pure α_1 -antichymotrypsin from serum and from pleural fluid after removing the remaining albumin.

Purified α_1 -antitrypsin obtained from fraction A₂ with an additional step (unpublished results) is also shown on this gel (slot 8). It is useful as a reference for electrophoretic mobility and for inhibition capacity. The molecular weight previously estimated to be 58 000 was confirmed on this gel for pleural and serum α_1 -antichymotrypsin.

During gel electrophoresis in 10% polyacrylamide at pH 8.3 (Fig. 5, part A), pleural α_1 -antichymotrypsin and serum α_1 -antichymotrypsin moved with the same α_1 mobility but distinctly slower than purified α_1 -antitrypsin (slot 6). In Fig. 5, part B, zones having antichymotrypsin activity were revealed with the Uriel technique. This method allowed us to detect 0.5 μ g of active α_1 -antichymotrypsin. It could be noticed that the purified α_1 -antichymotrypsin had the same mobility as in the serum (T). α_1 -Antitrypsin having an antichymotrypsin activity was also visualized under these conditions (slots 5, 6 and in T, the faster band).

TABLE I

AMINO ACID COMPOSITION OF α_1 -ANTICHYMOTRYPSIN

Results are expressed as residues per 100 residues.

	Serum *	Pleural fluid	Serum
Asx	11.2	11.6	11.6
Thr	7.1	7.3	7.3
Ser	7.3	8.0	8.1
Glx	11.4	12.2	12.1
Pro	3.4	4.1	4.3
Gly	4.1	4.6	4.8
Ala	7.8	7.8	7.8
Val	6.2	5.0	5.0
Cys/2	0.5	0	0
Met	2.5	2.4	2.4
Ile	5.2	3.6	3.6
Leu	12.8	12.9	12.6
Tyr	2.1	2.6	2.5
Phe	5.9	5.1	5.2
Lys	6.2	6.5	6.4
His	2.1	2.2	2.2
Arg	3.4	4.1	4.1
Trp	0.9	n.d.	n.d.

* Calculated according to the data of Travis et al. [7]. n.d., not determined.

TABLE II

PERCENTAGE OF CARBOHYDRATE RESIDUES IN α_1 -ANTICHYMOTRYPSIN

Results are expressed as g carbohydrate/100 g dry material.

	Serum *	Pleural fluid	Serum
Neutral sugars	10.3	10.4	10.9
N-acetyl hexosamines	9.8—11.3	6.9	7.3
Sialic acid	4 — 5.1	5.9	5.8

* calculated according to the data of Travis et al. [7].

Amino acid and carbohydrate composition

The amino acid composition was determined on five different preparations of pleural and serum α_1 -antichymotrypsin. The results were very similar and the averages are given in Table I. No important difference was observed in the amino acid composition of α_1 -antichymotrypsin from human pleural fluid and from human serum. Under the conditions used for hydrolysis, no residue of cysteine was observed in the amino acid analysis. The amino acids represented 62 g/100 g of the dry material.

The carbohydrate composition was also very similar for the both α_1 -antichymotrypsin (Table II).

N-terminal amino acid determination

The amino terminal group determination gave arginine. Until now it had only been carried out on α_1 -antichymotrypsin from serum.

Discussion

The procedure presently described for the purification of α_1 -antichymotrypsin from the human pleural fluid and from human serum requires only four affinity chromatographic steps. It carefully avoids all stages which may destroy the inhibitory capacity of the glycoprotein. Because of the high content of serum albumin in pleural fluid and serum, it is preferable to eliminate this protein as much as possible before the immunoaffinity chromatography in order to avoid nonspecific interactions, and to prolong the life of the anti- α_1 -antichymotrypsin column. Thiopropyl-Sepharose was chosen for this purpose because of the high number of its reactive groups. The second step was inserted in order to eliminate α_1 -antitrypsin from the α_1 -antichymotrypsin fraction. But it appeared also interesting to have α_1 -antitrypsin from the same fractionated fluid to serve as reference in enzyme inhibition experiments.

The use of buffer 2 (pH 2.8) to elute α_1 -antichymotrypsin, in the third step, did not destroy the inhibitory capacity if the pH was quickly adjusted to pH 7.5 after elution. Other less acidic buffers were also able to elute α_1 -antichymotrypsin from the immunoaffinity column, but yields obtained were too low. Immunoaffinity chromatography usually results in the preparation of pure antigen. But in the present case, the interactions between serum albumin and α_1 -antichymotrypsin are too strong and a trace of serum albumin (better stained on polyacrylamide gel than α_1 -antichymotrypsin which is a glycopro-

tein) still persists. Thus, the fourth step was essential to obtain pure α_1 -antichymotrypsin even if a loss of some α_1 -antichymotrypsin occurred. In fact, 75% of the α_1 -antichymotrypsin present in the starting material was recovered in fraction A₁ conc., and 50% still remained before the chromatography on the anti-serum albumin column. A final recovery of 25–30 per 100 was obtained. This fact might be due to the several concentration steps and to the centrifugation sometimes needed to discard some precipitated material. Thus, with the present procedure, about 15 mg of pure α_1 -antichymotrypsin were obtained from 100 ml pleural fluid containing 55–60 mg of α_1 -antichymotrypsin.

As regards molecular weight, our results are different from those presented in previous data [7]. Instead of a molecular weight of 68 000 found by these authors, we obtained a value of 58 000 for both pleural and serum α_1 -antichymotrypsin, and these molecules had their complete inhibitory capacity. It seemed possible that α_1 -antichymotrypsin from pleural fluid might be partially destroyed by some proteases but the serum α_1 -antichymotrypsin gave the same result. This difference could be explained by the way these authors carried out SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; they used serum albumin as reference but without mercaptoethanol treatment. We have shown (Fig. 3) that the behavior of serum albumin during SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was very different depending on whether it was treated with mercaptoethanol, while α_1 -antichymotrypsin behavior remained unchanged. The apparent molecular weight of serum albumin studied without mercaptoethanol seemed to be smaller; thus, taking serum albumin without mercaptoethanol as reference would lead to an error in the estimation of α_1 -antichymotrypsin molecular weight. Under these conditions, α_1 -antichymotrypsin molecular weight would appear greater.

Concerning the chemical composition of α_1 -antichymotrypsin, we found no half-cystine in both molecules, while Travis et al. [7] found 0.5 per 100 half-cystine, Heimburger et al. [22] also did not find any half-cystine in the molecule. No significant difference was observed concerning the other amino acids. Concerning the carbohydrate content, we found less *N*-acetyl-hexosamine and slightly more sialic acid than Travis et al. The characterization of the inhibitory capacity with the technique of Uriel and Berges [14] is an easy way to determine if the inhibitor molecule is damaged. Since our results on serum and pleural α_1 -antichymotrypsin are alike, the pleural fluid can be chosen as starting material to purify serum type α_1 -antichymotrypsin.

We sometimes noticed some splitting of the pure α_1 -antichymotrypsin band in analytical polyacrylamide gel electrophoresis (for example, Fig. 5, slot 1). We still have no explanation for the occurrence of this minor faster band, but it was found that lyophilized samples gave two bands more often than nonlyophilized material. The band which appeared after lyophilization moved faster at pH 8.6, so it is doubtful that desialylation occurred. Further studies will probably explain the splitting process.

Acknowledgements

We thank Mrs. Kopaczewski A. for her technical assistance. This work was supported by INSERM (CRL No. 78-5-202-5 and ATP 64-78-96-014).

References

- 1 Shapira, E., Martin, C.L. and Nadler, H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7923—7929
- 2 Laurell, C.B. and Eriksson, S. (1963) *Scand. J. Clin. Invest.* 15, 132—140
- 3 Harpel, P.C. and Rosenberg, R.D. (1976) *Prog. Hemostasis. Thromb.* 3, 145—150
- 4 Ohlsson, K. (1977) FEBS 11th Meeting Copenhagen, 47, Symposium A6, 187—196, *Regulatory Proteolytic Enzymes and their Inhibitors*
- 5 Reilly, C.F. and Travis, J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 621, 147—157
- 6 Heimburger, N. and Haupt, H. (1965) *Clin. Chim. Acta* 12, 116—118
- 7 Travis, J., Garner, D. and Bowen, J. (1978) *Biochemistry* 17, 5647—5651
- 8 Clarke, H.G.M. and Freeman, T. (1967) *Protides of the Biological Fluids*, 14th Colloquium 1966 (Peeters, H., ed.), pp. 503—509, Elsevier, Amsterdam
- 9 Svendsen, P.J. and Rose, C. (1970) *Sci. Tools* 17, 13—17
- 10 Kerckaert, J.P. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 354—360
- 11 Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404—427
- 12 Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680—685
- 13 Diezel, W., Koppers-Chläger, G. and Hofmann, E. (1972) *Anal. Biochem.* 48, 617—620
- 14 Uriel, J. and Berges, J. (1968) *Nature* 218, 578—580
- 15 March, S.C., Parikh, I. and Cuatrecasas, P. (1974) *Anal. Biochem.* 60, 149—152
- 16 Reinhold, V.N. (1972) *Methods Enzymol.* 25, 244—249
- 17 Roussel, P., Lamblin, G., Degand, P., Walker-Nasir, E. and Jeanloz, R.W. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2114—2122
- 18 Aminoff, D. (1961) *Biochem. J.* 81, 384—392
- 19 Edman, P. (1970) in *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics* (Needleman, S.B., ed.), pp. 211—255, Springer Verlag, New York
- 20 Hermann, J., Titani, K., Ericsson, L.H., Wade, R.D., Neurath, H. and Walsh, K.A. (1978) *Biochemistry* 17, 5672—5679
- 21 Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F. (1965) *Immunochemistry* 2, 235—254
- 22 Heimburger, N., Haupt, H. and Schwick, H. (1971) *Proc. 1st Int. Res. Conf. Proteinase Inhibitors*, pp. 1—21, Walter de Gruyter, New York

II - 1 PURIFICATION DE L' α_1 -ANTICHYMOTRYPSINE.

Quand nous avons entrepris le travail de cette thèse, le seul protocole de purification de l' α_1 Achy sérique dont nous disposions avait été publié en 1962 (179). Il était particulièrement complexe. Il faisait appel en premier lieu à la différence de solubilité des constituants du sérum dans le sulfate d'ammonium (l' α_1 Achy est soluble dans une solution à 50 % en sulfate d'ammonium). Un fractionnement par le Rivanol constituait l'étape suivante, puis une électrophorèse de zone était effectuée à pH 5,2 et la dernière étape consistait en une chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G 100.

De 1962 à 1977, le choix des techniques pouvant être utilisées pour la séparation des protéines sériques s'est considérablement élargi. Le matériel de départ que nous avons initialement choisi était le liquide pleural. Cet exsudat peut être obtenu en quantité importante ; il contient des constituants protéiques et glycoprotéiques pour la plupart identiques à ceux du sérum.

En raison de divergences entre certaines propriétés physico-chimiques de l' α_1 Achy que nous avons isolée du liquide pleural et celles de l' α_1 Achy isolée du sérum par TRAVIS et coll (202) et publiées pendant l'avancement de nos travaux, nous avons été amenée à appliquer notre protocole de purification à du sérum humain normal. Après avoir montré que l' α_1 Achy du sérum présente les mêmes caractéristiques que celles de l' α_1 Achy du liquide pleural, nous avons préféré poursuivre notre travail sur de l' α_1 Achy isolée du sérum.

Dans ce chapitre, nous décrirons la mise au point du protocole de préparation aboutissant à la publication n°1 dans laquelle quelques propriétés physico-chimiques ont également été décrites. Certaines propriétés physico-chimiques seront ensuite étudiées plus en détail et nous comparerons au fur et à mesure nos résultats avec ceux qui ont été publiés pendant le déroulement de nos recherches.

II - 1.1 Choix des méthodes.

Nous insisterons dans cette partie sur les différentes méthodes de purification de l' α_1 Achy que nous avons essayées et sur les difficultés rencontrées pour obtenir un constituant ayant conservé ses propriétés biologiques.

La difficulté est d'autant plus grande que, dans un sérum normal, l' α_1 Achy représente en moyenne moins de 1 % des protéines totales (soit 40 à 60 mg/100 ml).

Selon HEIMBURGER et coll (75), l' α_1 Achy est une glycoprotéine possédant une M_r égale à 69 000 et ayant une mobilité α_1 -globulinique en électrophorèse à pH 8,2. D'après ces indications nous pouvions nous attendre à ce que la séparation entre l' α_1 Achy et des constituants tels que l' α_1 PI, l' α_1 -glycoprotéine acide, la préalbumine et la sérumalbumine pose des problèmes : en effet, ces constituants présentent un certain nombre de propriétés physico-chimiques voisines de celles de l' α_1 Achy, telles que la M_r et le point isoélectrique.

Toutefois, selon les mêmes auteurs, la molécule d' α_1 Achy serait dépourvue de résidus de cystéine, tandis que les constituants cités précédemment en possèdent. Ceci nous a amenée à choisir la chromatographie covalente. Cette technique peut être employée dans divers domaines et en particulier pour séparer des protéines ou des peptides contenant des groupements thiol de polypeptides qui en sont dépourvus. Dans cette méthode, le produit possédant des groupements thiol est fixé de façon covalente au support chromatographique. Le support chromatographique est une matrice de Sepharose sur laquelle est greffé un dérivé contenant un groupement thiol : il s'agit soit d'un groupement propanethiol, soit du glutathion. Le groupement thiol du propanethiol ou du glutathion est engagé dans un pont disulfure avec un reste mercapto-2-pyridine qui peut être facilement échangé au cours de la chromatographie covalente avec des protéines ou des peptides contenant des groupements thiol libres. Il s'ensuit la formation d'autres ponts disulfure mixtes reliant de façon covalente ces protéines ou ces peptides à la matrice de Sepharose modifiée. Après lavage de la colonne pour éliminer les substances non combinées, le produit contenant le ou les groupements thiol peut être séparé de la matrice de Sepharose par réduction des liaisons disulfure.

Deux produits ont été spécifiquement mis au point par PHARMACIA pour cette technique : Activated-Thiol-Sepharose 4 B, dérivé de faible capacité et Thiopropyl-Sepharose 6 B, dérivé de grande capacité; ils possèdent respectivement 1 μ mol et 20 μ moles de groupes 2-pyridyl-disulfure par millilitre de gel.

Une chromatographie covalente sur une colonne de Thiopropyl-Sepharose 6 B constitue la première étape de notre protocole. Elle permet d'éliminer, entre autres, environ 60 % de la sérumalbumine du sérum qui est ainsi fixée sur la colonne. L' α_1 Achy se trouve dans la fraction non retenue sur la colonne ; celle-ci

est soumise à une nouvelle chromatographie covalente sur une colonne de Activated-Thiol-Sepharose 4 B. Comme dans les travaux de LAURELL et coll (119), la fraction est, avant cette étape, soumise à une réduction douce par le β -mercaptoéthanol (molarité finale 0,07 mM) avant d'être déposée sur la colonne. L' α_1 Achy se trouve dans la fraction qui n'est pas retenue sur la colonne de Activated-Thiol-Sepharose 4 B. Le matériel fixé par la colonne peut être élué en lavant la colonne par du tampon contenant du β -mercaptoéthanol (0,02 M). La fraction alors éluée contient une proportion importante d' α_1 PI dont la purification a pu être achevée par un procédé original (16).

L' α_1 Achy se trouve donc dans la fraction du sérum qui n'est retenue ni sur la colonne de Thiopropyl-Sepharose 6 B, ni sur la colonne d'Activated-Thiol-Sepharose 4 B. Cette fraction est dialysée pendant 3 jours contre de l'eau désionisée. Les euglobulines précipitées sont alors éliminées par centrifugation à 6 000 tours /minute* pendant 20 minutes (tableau II).

De nombreux essais ont ensuite été effectués, avant de choisir en définitive, la chromatographie d'immunoaffinité pour purifier l' α_1 Achy. Il fallait en effet, obtenir, avec un bon rendement, de l' α_1 Achy purifiée ayant conservé ses propriétés inhibitrices.

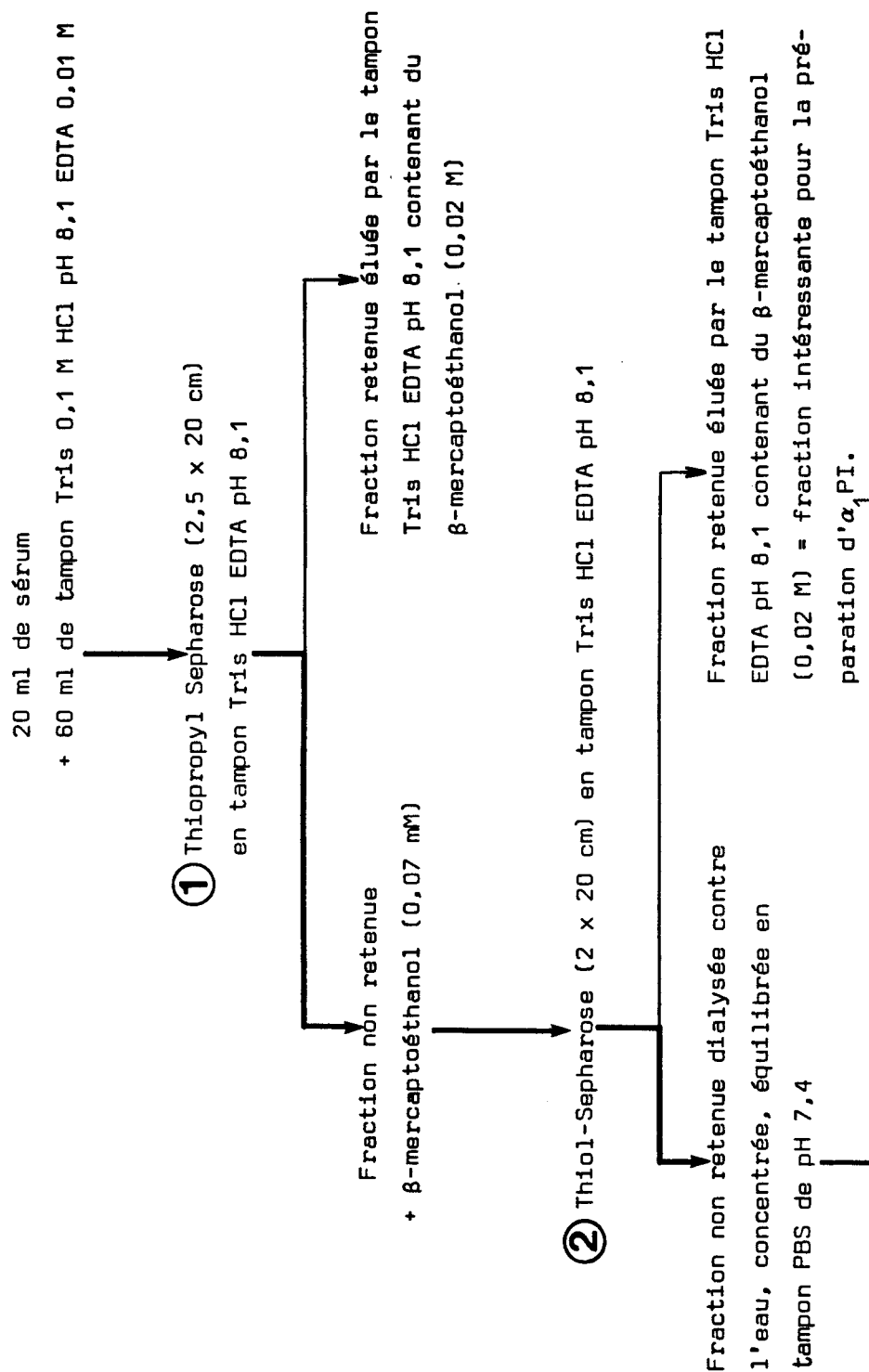
La précipitation par le sulfate d'ammonium, méthode assez classique utilisée dans la préparation de nombreuses protéines sériques, a d'abord été employée. Le surnageant obtenu après élimination des euglobulines par centrifugation est amené à la concentration de 2,4 M en sulfate d'ammonium et laissé à 4°C pendant 24 heures. Après élimination du précipité par centrifugation (pendant 20 minutes à 6 000 tours/minute*), le surnageant est amené à la concentration de 3,2 M en sulfate d'ammonium puis conservé à 4°C pendant 24 heures. Le précipité recueilli après centrifugation (pendant 20 minutes à 6 000 tours/minute*) est repris par de l'eau désionisée, dialysé pendant 3 jours contre de l'eau désionisée puis lyophilisé. L'analyse électrophorétique de cette fraction indique qu'elle contient des constituants ayant des points isoélectriques (pI) différents, ce qui peut être mis à profit pour leur séparation. Nous avons alors choisi l'isotachophorèse pour tenter de mener à bien la purification de l' α_1 Achy.

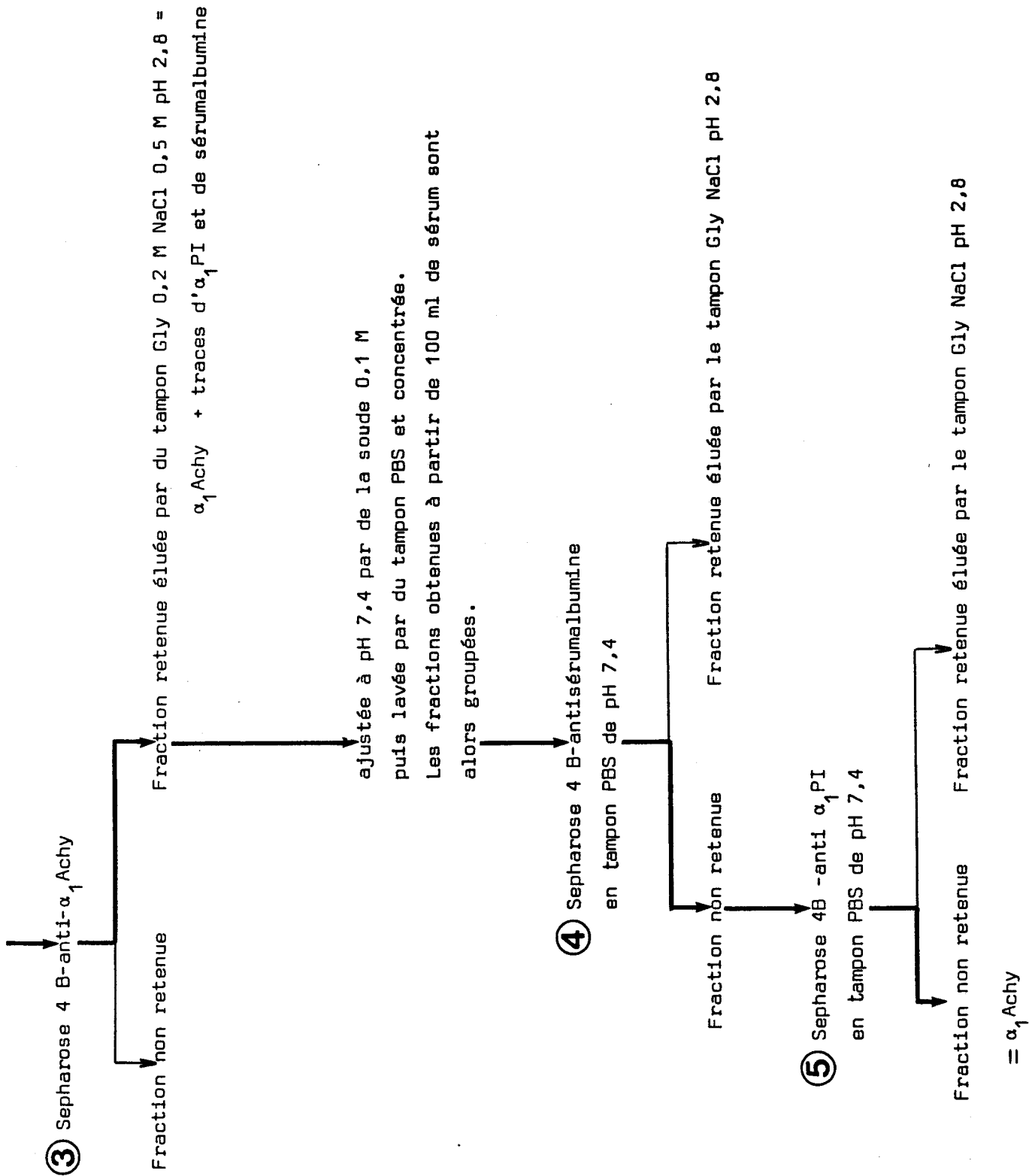
En effet, l'isotachophorèse permet de séparer dans un champ électrique, les ions en fonction de leur mobilité électrique. Les ions de l'échantillon se "rangent" en zones derrière l'ion de tête ("leading ion") choisi pour

* 6 000 tours/minute = 4 000 g avec le rotor utilisé.

TABLEAU II

Protocole de purification de l' α_1 antichymotrypsine sérique.





sa mobilité plus élevée que celle des ions de l'échantillon ; lorsque tous les ions sont rangés en zones suivant leur mobilité électrophorétique dans le système choisi, ils se déplacent à la même vitesse dans le champ électrique. La séparation en isotachophorèse se fait dans une colonne de gel de polyacrylamide ; les zones correspondant aux ions de points isoélectriques voisins sont "écartées" les unes des autres par l'addition à l'échantillon d'ampholytes dont les mobilités sont comprises entre celles des ions de l'échantillon (Ampholines LKB).

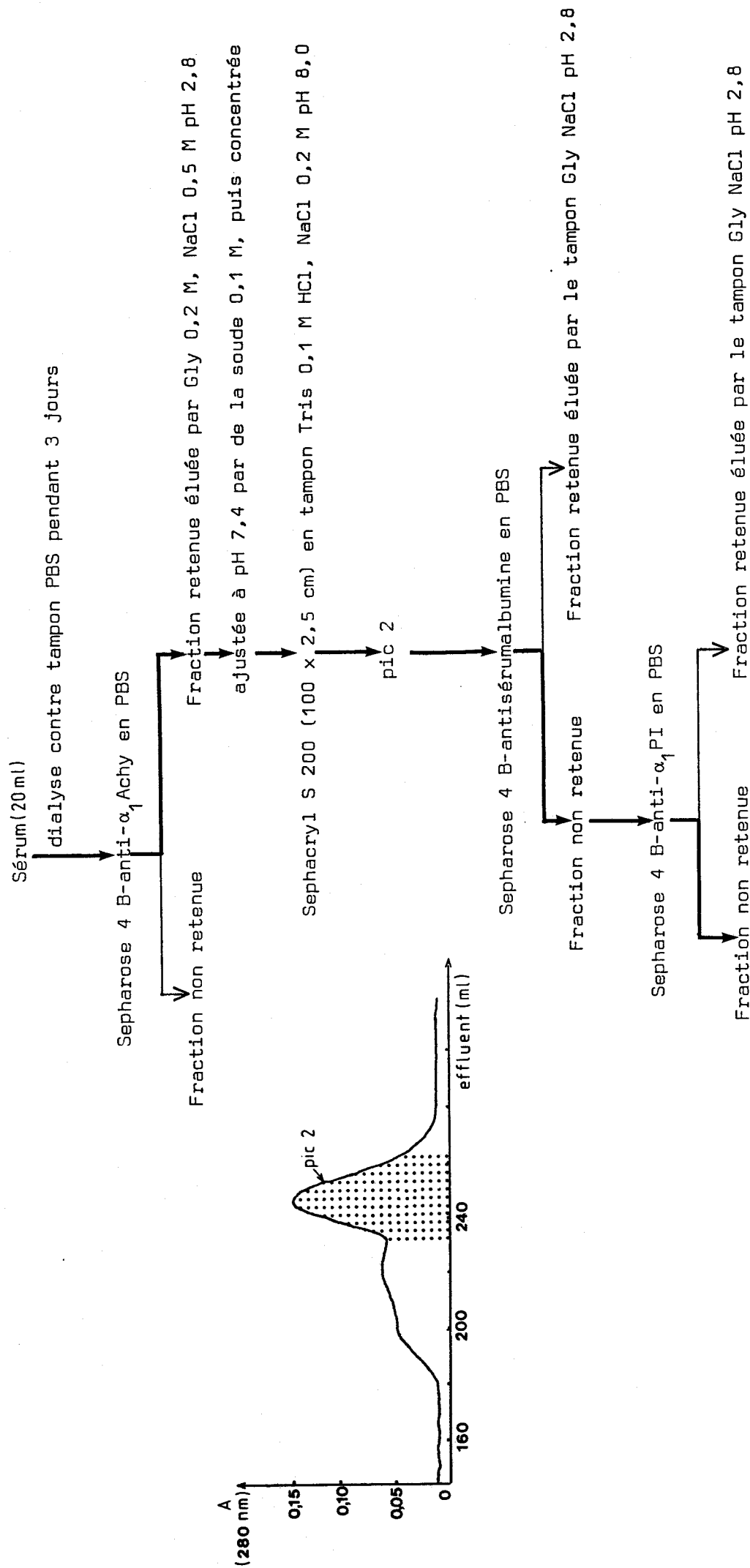
De très nombreux essais ont été effectués en utilisant cette technique, mais en fait, si la méthode semblait très séduisante, les rendements obtenus ont été très médiocres et, de plus, l'élimination des Ampholines est difficilement complète : ces constituants peuvent en effet rester fixés sur les protéines même après une étape de gel-filtration.

D'autre part, nous avons pu observer que l' α_1 Achy est un constituant particulièrement fragile : la précipitation par le sulfate d'ammonium suivie d'étapes de dialyse et de lyophilisation fait perdre à l' α_1 Achy une partie importante de son activité inhibitrice. Cette précipitation au sulfate d'ammonium et l'isotachophorèse ont été ainsi éliminées.

La chromatographie d'immunoaffinité connaissait alors un important développement. A partir d'un immunosérum spécifique de l' α_1 Achy (fabriqué par les laboratoires BEHRING), nous avons préparé les immunoglobulines qui ont ensuite été couplées à du gel de Sepharose 4 B activé par le bromure de cyanogène. Les méthodes de préparation des immunoglobulines, d'activation du gel, de couplage ainsi que le protocole de la chromatographie d'immunoaffinité sont décrits dans la partie technique (p :T2). Malgré la grande spécificité qui était reconnue à la chromatographie d'immunoaffinité, nous avons préféré conserver les deux premières étapes de chromatographie covalente. Ces étapes se déroulent en effet dans les conditions de pH et de force ionique qui ne risquent pas de dénaturer l' α_1 Achy et permettent d'obtenir une fraction enrichie en α_1 Achy avant d'aborder l'étape d'immunoaffinité ; il est de plus particulièrement intéressant d'éliminer le plus possible de sérumalbumine qui, ayant toujours tendance à se lier de façon non spécifique y compris sur la colonne d'immunoaffinité, pourrait donc diminuer le rendement de cette étape et entraîner une contamination plus importante. Tout au long du protocole de préparation, il faut veiller à ce que les fractions contenant l' α_1 Achy restent un minimum de temps à un pH inférieur à 7,0 ou en milieu désionisé pour éviter une altération de ses propriétés inhibitrices. Dès la fin de l'élution de la colonne d'immunoaffinité par le tampon glycolle 0,2 M, NaCl

TABEAU III

Nouveau protocole de purification de l' α_1 antichymotrypsine sérique



0,5 M de pH 2,8, les fractions contenant l' α_1 Achy sont ajustées à pH 7,4 avec de la soude 0,1 M puis abondamment lavées par ultrafiltration dans un appareil Diaflo (membrane YM 5) par le tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,3 M pH 7,4 contenant 0,02 % d'azide de sodium que nous appellerons PBS dans la suite.

La dernière étape indiquée dans la publication n° 1 consiste en une chromatographie d'immunoaffinité sur une colonne de Sepharose 4 B à laquelle des anticorps anti-sérumalbumine ont été couplés selon la méthode présentée page T 2 . Cette étape permet d'éliminer de la préparation d' α_1 Achy les traces de sérumalbumine qui subsistent.

Publication n° 1.

II - 1.2 Protocoles actuels.

La plupart des études d'interactions α_1 Achy-protéases qui seront présentées dans le chapitre III ont été effectuées avec de l' α_1 Achy obtenue en appliquant à du sérum le protocole présenté dans la publication n° 1 auquel est ajoutée une étape d'immunoaffinité sur une colonne de Sepharose 4 B-anti- α_1 PI. Dans certaines préparations d' α_1 Achy subsistaient en effet des traces d' α_1 PI, il était indispensable de les éliminer avant d'aborder les études d'inhibition enzymatique qui auraient pu être faussées. Le tableau II présente en détail le protocole complet.

Très récemment, nous avons été amenée à modifier un peu ce protocole de purification car nous avons mis en évidence la présence de résidus de cystéine dans l' α_1 Achy (voir p : 69) et nous avons voulu doser les groupements thiol libres. Afin de ne laisser subsister aucun doute sur nos résultats, nous avons préféré supprimer les étapes de chromatographie covalente (étapes n° 1 et 2 du tableau II), car avant l'étape n° 2, un peu de réducteur est ajouté à la fraction, de plus lors de ces deux étapes, l' α_1 Achy est en contact avec des supports chromatographiques pour l'élution desquels des concentrations importantes de β -mercaptoéthanol sont utilisées. Un protocole un peu différent a donc été mis au point récemment, il est présenté dans le tableau III. Après une dialyse de trois jours contre le tampon PBS, le sérum est immédiatement soumis à la chromatographie d'immunoaffinité sur colonne de Sepharose 4B-anti- α_1 Achy. La fraction contenant l' α_1 Achy est ensuite soumise à une étape de gel filtration sur une colonne de Sephacryl S 200 (100 x 2,5 cm) en tampon Tris 0,1 M HCl, NaCl 0,2 M pH 8,0. L'éluat de cette colonne est étudié par la méthode d'électroimmunodiffusion

avec prédiffusion de l'antigène en utilisant un immunsérum anti-protéines sériques totales et un immunsérum spécifique de l' α_1 Achy. Au cours de cette étape, l' α_1 Achy est séparée de plusieurs constituants de taille moléculaire plus élevée. Les fractions contenant l' α_1 Achy sont rassemblées. Cette solution est alors concentrée dans un appareil Diaflo (membrane YM 5) et équilibrée en tampon PBS. Elle est soumise ensuite aux deux chromatographies d'immunoaffinité (étapes identiques aux étapes 4 et 5 du tableau II).

II - 1.3 Protocoles de purification de l' α_1 Achy publiés par d'autres auteurs.

Un protocole de préparation de l' α_1 Achy a été préconisé par TRAVIS et coll (202) en 1978. Il consiste essentiellement en trois étapes séparées par des dialyses et ultrafiltrations nécessaires à l'équilibration de la préparation pour l'étape suivante. Ces trois étapes sont successivement un fractionnement par le sulfate d'ammonium (la fraction précipitant entre 50 % et 80 % de saturation est conservée), une chromatographie sur colonne de Cibacron Blue Sepharose en tampon phosphate de sodium 0,03 M pH 7,0 (sur laquelle l' α_1 Achy est retenue puis éluée par augmentation de la force ionique) et enfin une chromatographie sur colonne de SP-Sephadex C-50 en tampon citrate de sodium 0,025 M à pH 5,5. La solution d' α_1 Achy pure est alors équilibrée par dialyse en tampon Tris 0,05 M NaCl 0,05 M pH 8,0, puis est conservée congelée. Ce protocole a été récemment modifié par TRAVIS et MORII (204) : l'étape de chromatographie à pH 5,5 est supprimée. En 1980, KATSUNUMA et coll (104) purifient à partir du sérum humain une glycoprotéine caractérisée par sa capacité à se lier à de l'ADN. SIDDIQUI et coll (184) montrent, peu après, que cette glycoprotéine est identique à l' α_1 Achy. Les protocoles de purification préconisés par ces deux équipes sont très semblables. Entre chaque étape, une dialyse permet d'équilibrer la préparation dans le tampon utilisé pour l'étape suivante. Dans le protocole de KATSUNUMA et coll (104), la première étape est une chromatographie d'échange ionique sur colonne de DEAE-Sephadex A 50 en tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,5 NaCl 0,15 M; l'élution de la fraction contenant l' α_1 Achy est effectuée avec du tampon contenant du NaCl 0,225 M. Cette fraction est alors déposée sur une colonne de DNA-cellulose en tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,8. Le matériel élué en augmentant la force ionique (NaCl 0,3 M) est soumis à un fractionnement par le sulfate d'ammonium ; la fraction précipitant entre 50 et 70 % de saturation est ensuite déposée, pour l'étape finale, sur une colonne de Sephadex G 150 équilibrée et éluée en tampon Tris 0,01 M HCl pH 7,8, KCl 0,1 M.

La première étape du protocole mis au point par SIDDIQUI et coll (184) consiste en une étape de chromatographie d'échange ionique sur une colonne de QAE-Sephadex équilibrée en tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,5. Un gradient linéaire de molarité en NaCl (0 à 0,5 M) est alors appliqué à la colonne. La fraction éluée par une molarité en NaCl comprise entre 0,125 et 0,225 M est dialysée contre le tampon de départ et soumise à une deuxième chromatographie identique. L'étape suivante consiste en une chromatographie d'affinité sur une colonne de DNA-cellulose en tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,8, dont l'élution est effectuée en augmentant la force ionique. La purification se termine par une chromatographie de gel filtration sur une colonne de Sephadex G 200 équilibrée et éluée en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,0.

A partir de 100 ml de sérum, TRAVIS et coll (202) obtiennent 9 mg d' α_1 Achy pure ; KATSUNUMA et coll (104) purifient 3,5 mg d' α_1 Achy à partir de la même quantité de sérum, tandis que SIDDIQUI et coll (184) en obtiennent 4 mg. Les rendements obtenus par ces trois équipes sont plus faibles que le nôtre puisque nous obtenons 16 à 20 mg d' α_1 Achy à partir de 100 ml de sérum. Par ailleurs, notre méthode évite la précipitation par le sulfate d'ammonium et un séjour prolongé à un pH inférieur à 7,0 qui semblent préjudiciables à l'activité.

II - 2 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.

Plusieurs propriétés physico-chimiques sont décrites dans la publication n° 1, mais nous revenons sur certaines d'entre elles pour les préciser ou pour corriger quelques inexactitudes dont nous nous sommes rendue compte en utilisant des techniques d'analyse plus précises mises au point ou appliquées depuis la rédaction de cet article.

II - 2.1 Masse moléculaire relative.

La détermination de la masse moléculaire relative a été effectuée après électrophorèse en milieu SDS sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) en gradient de 10 à 20 % d'acrylamide comme dans la publication n° 1 ou en gradient de 5 à 30 % d'acrylamide comme nous l'effectuons maintenant. Que la molécule d' α_1 Achy soit ou non traitée par le β -mercaptoéthanol avant l'électrophorèse, elle conserve la même migration dans ce système. Contrairement à l' α_1 PI qui migre sous la

forme d'une bande étroite, l' α_1 Achy se présente sous la forme d'une bande assez large, moins bien définie (figure 8) ; ceci est peut-être dû à l'importance de la partie glycanique qui représente à peu près le quart de la molécule*. La masse moléculaire relative est estimée à $58\,000 \pm 1\,000$. TRAVIS et coll (202) ont trouvé une M_r proche de 69 000. Nous avons donc cherché à vérifier par deux moyens différents la valeur que nous avons déterminée.

En premier lieu, après avoir réduit les éventuels ponts disulfure par un excès molaire de dithiothréitol de 40 fois, nous avons alkylé l' α_1 Achy par aminoéthylation (voir page T 15). La M_r de l' α_1 Achy réduite et aminoéthylée est déterminée en SDS-PAGE ; elle est égale à celle qui a été estimée pour la molécule native soit 58 000 (figure 9).

En second lieu, nous avons cherché à modifier au moins partiellement la structure secondaire de la molécule d' α_1 Achy. La succinylation des amines primaires, souvent utilisée pour limiter l'action de la trypsine aux seules liaisons arginyl, permet également de "déplier" la chaîne polypeptidique. En se fondant sur la valeur estimée pour la M_r et sur la teneur en glucides de l' α_1 Achy, le nombre total de résidus d'acides aminés par molécule d' α_1 Achy serait d'environ 400 et le nombre de résidus de lysine s'élèverait à 26 d'après le pourcentage déterminé dans la publication n° 1. La molécule porterait donc 27 groupements amine primaire. La molécule d' α_1 Achy succinylée devrait avoir une M_r de $58\,000 + 2\,700$ soit 60 700, puisque chaque groupement succinyl ajouté représente une masse moléculaire relative de 100. En SDS-PAGE (en gradient de 5 à 30 % d'acrylamide), la M_r de l' α_1 Achy succinylée est estimée à 61 000 (figure 10). La concordance entre cette valeur expérimentale et la valeur calculée est tout à fait satisfaisante.

Les résultats obtenus après les deux types de modification chimique nous permettent de penser que la valeur 58 000 que nous avons obtenue est correcte. Une explication du fait que TRAVIS et coll (202) aient trouvé une M_r égale à 69 000 pourrait être que le témoin d'albumine humaine qu'ils ont employé comme référence n'a peut-être pas été suffisamment réduit et traité par le SDS : dans ce cas, la molécule n'est pas suffisamment déroulée et se comporte alors comme une protéine de M_r inférieure. L'utilisation de tels témoins pour déterminer une M_r en SDS-PAGE conduit à des erreurs par excès.

* Deux bandes de M_r nettement supérieures à 94 000 sont parfois visibles, et doivent correspondre à des agrégats d' α_1 Achy. Elles ne sont en effet plus observées dans des préparations d' α_1 Achy effectuées en appliquant le nouveau protocole (tableau III).

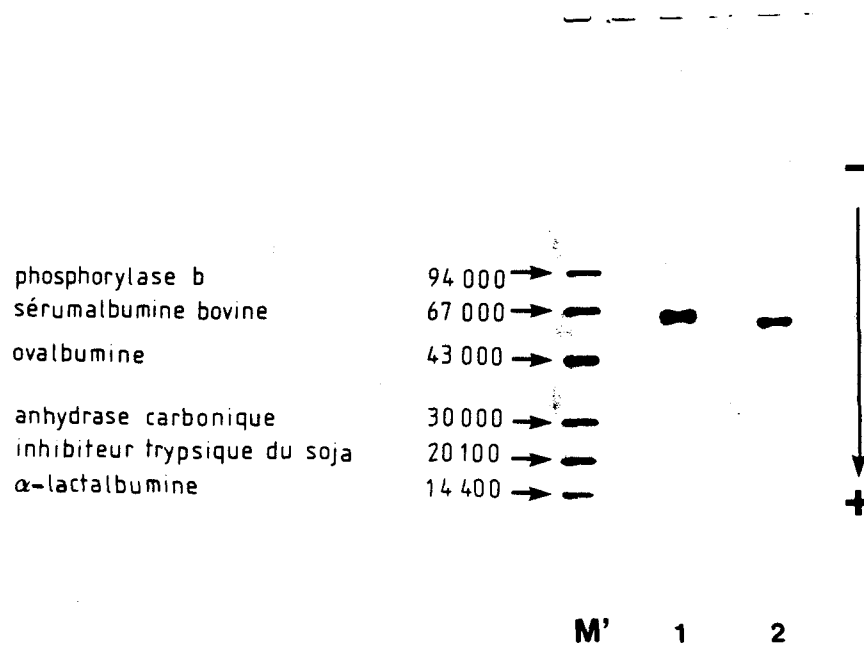


Figure 8 : Migration électrophorétique de l' α_1 Achy et de l' α_1 PI en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS.

M' : Témoins de M_r (après réduction) PHARMACIA
 1 : α_1 Achy
 2 : α_1 PI

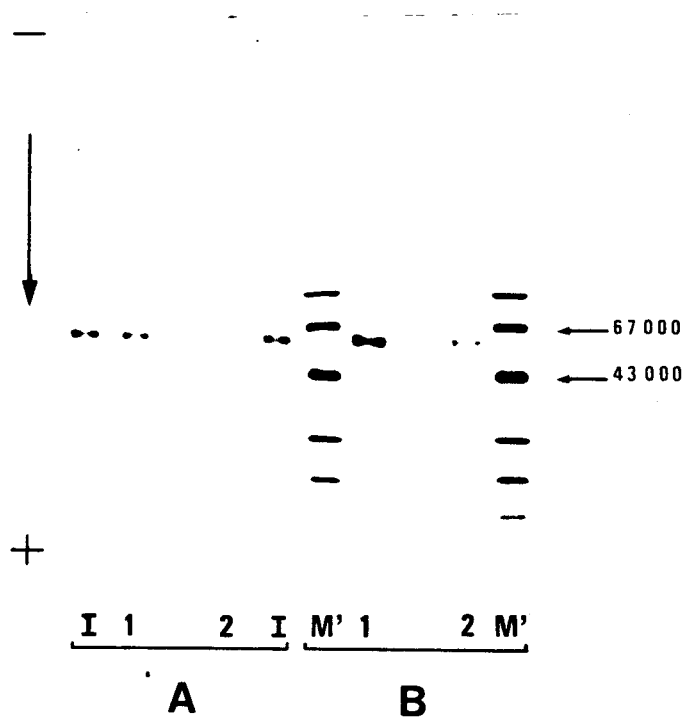


Figure 9 : Migration électrophorétique de l' α_1 Achy après divers traitements chimiques. L'étude est effectuée en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS.

M' : Témoins de M_r

I : α_1 Achy en tampon PBS : α_1 Achy native

1 : α_1 Achy après lavage par NH_4HCO_3 0,005 M en appareil Diaflo, lyophilisation et remise en solution en PBS

2 : α_1 Achy aminoéthylée

partie A : en présence de SDS

partie B : en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol.

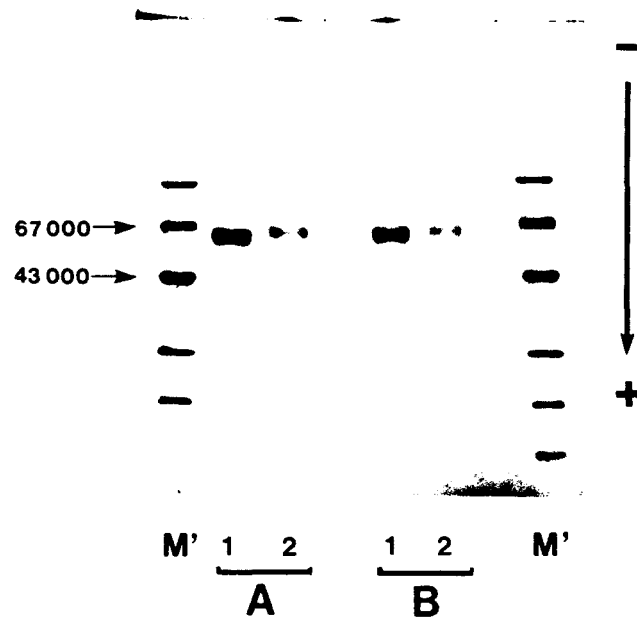


Figure 10 : Détermination de la M_r de l' α_1 Achy succinylée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS.

- M' : témoins de M_r après réduction
- 1 : α_1 Achy conservée en tampon PBS : α_1 Achy native
- 2 : α_1 Achy succinylée
- A : échantillons réduits
- B : échantillons non réduits

II - 2.2 Comportement en électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 %) à pH 8,3 et en immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

Une fraction d' α_1 Achy purifiée présente bien souvent plusieurs bandes en gel de polyacrylamide à pH 8,3. D'une préparation à l'autre, le rapport densitométrique de ces différentes bandes varie (figure 11). Les bandes peu importantes en γ et en β sont vraisemblablement dues à la formation de polymères d' α_1 Achy. Les deux bandes migrant en α_1 réagissent avec l'immunsérum anti- α_1 Achy mais seule la bande la moins rapide possède une activité inhibitrice envers la chymotrypsine. Nous reverrons ultérieurement (page 75) les conditions qui peuvent provoquer l'inactivation de l' α_1 Achy.

Un peu d' α_1 -glycoprotéine acide contamine généralement notre préparation, nous avons pu l'identifier en immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec l'immunsérum spécifique. L' α_1 -glycoprotéine acide dosée par la technique d'électro-immunodiffusion (ou rockets) par rapport à des dilutions d'un sérum standard BEHRING, représente 3 à 4 % de la préparation d' α_1 Achy.

En immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec un immunsérum anti-protéines sériques totales, les préparations d' α_1 Achy ne donnent en général qu'un seul arc. En effet la quantité d'immunsérum nécessaire pour avoir un rapport antigène-anticorps permettant le développement d'un beau pic de précipitation pour l' α_1 Achy ne correspond pas à la quantité nécessaire pour la visualisation de l' α_1 -glycoprotéine acide. Le pic de précipitation de l' α_1 Achy avec l'immunsérum antiprotéines sériques totales a une forme identique à celle du pic obtenu avec l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy BEHRING ou DAKO (figure 12).

II - 2.3 Détermination du point isoélectrique.

La détermination du point isoélectrique est effectuée par isoélectrofocalisation en plaque d'Isogel, agarose dépourvu d'électroendosmose (F M C Corporation Marine Colloids), dans lequel ont été ajoutés des ampholytes choisis pour obtenir un gradient de pH pratiquement linéaire entre les valeurs de pH 3 et 7. A 21 ml d'Isogel à 1 % dans l'eau déminéralisée, nous ajoutons les quantités suivantes de Pharmalytes (PHARMACIA) pour chacune des gammes de pH indiquées :

0,5 ml	(pH 2,5 - 5)
0,4 ml	(pH 4 - 6,5)
0,5 ml	(pH 6,5 - 9)

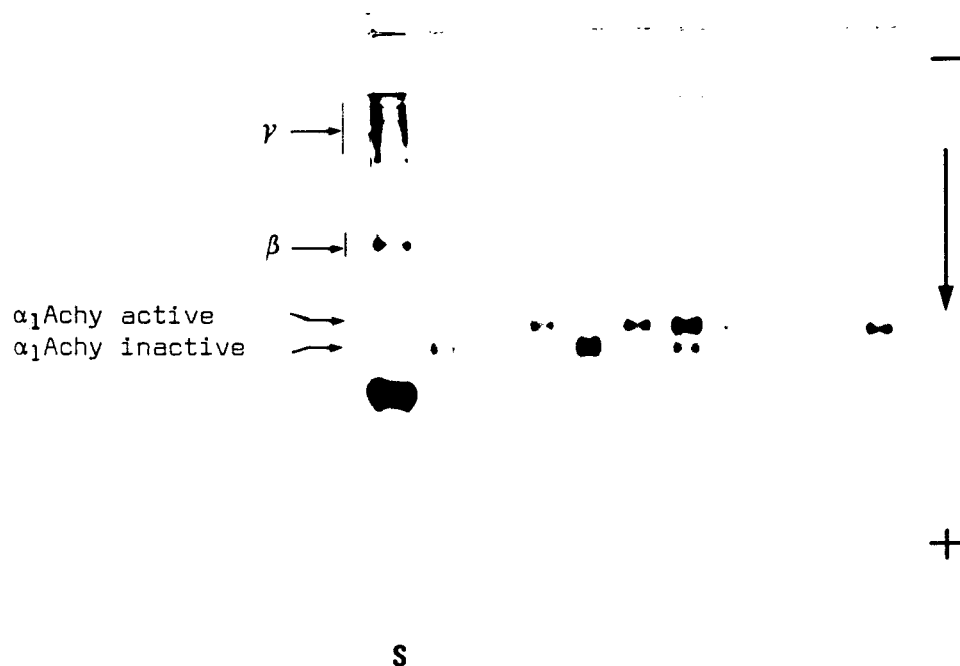


Figure 11 : Comparaison de différentes préparations d' α_1 Achy en électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide) à pH 8,3.

S : sérum témoin.

Les autres dépôts correspondent à différentes préparations d' α_1 Achy.

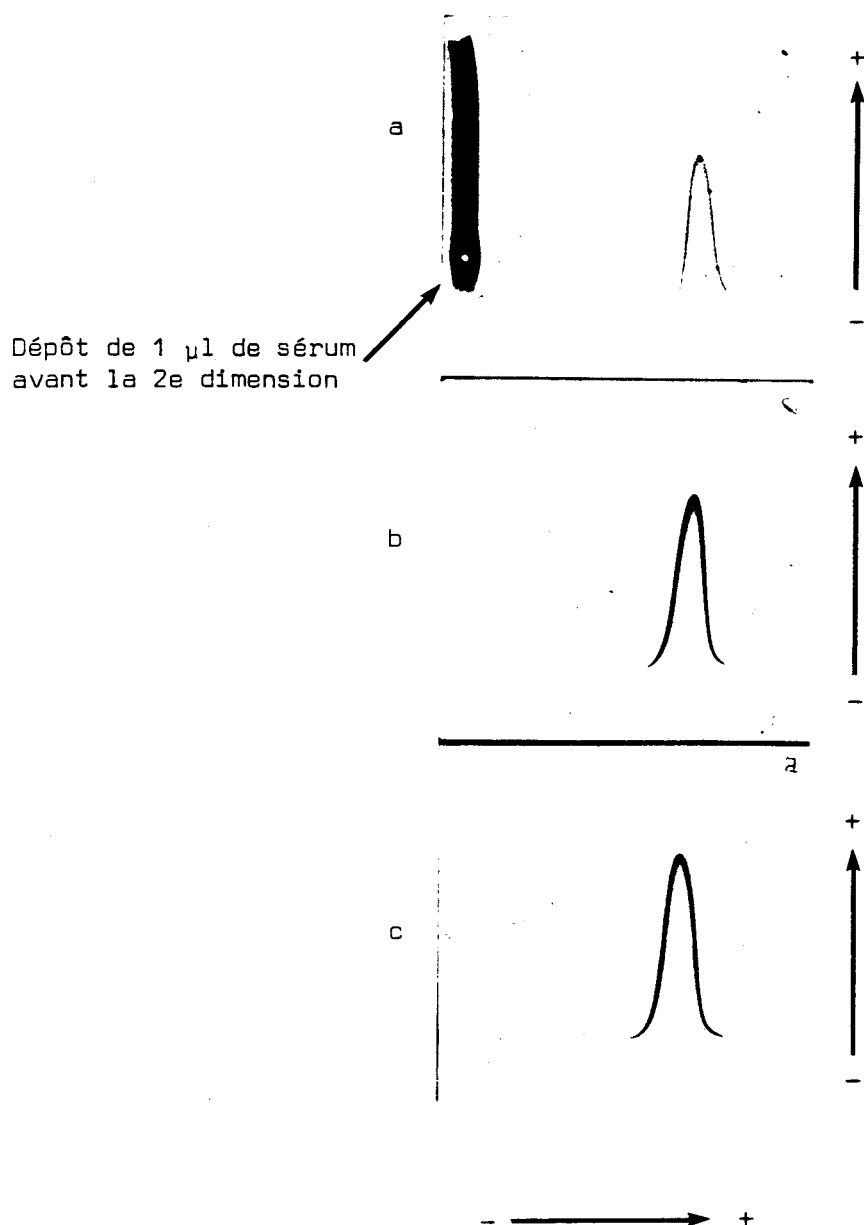


Figure 12 : Comparaison des diagrammes obtenus avec l' α_1 Achy purifiée en immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec différents immunosérums.

a : immunosérum anti-protéines sériques totales (BEHRING)

b : immunosérum spécifique de l' α_1 Achy (DAKO)

c : immunosérum spécifique de l' α_1 Achy (BEHRING)

Pour un dépôt de 2 μ g d' α_1 Achy purifiée, nous avons ajouté 80 μ l d'immunosérum à 12 ml d'agarose (pour 80 cm^2) pour les immunosérums spécifiques utilisés dont les titres sont les suivants :

T : 0,51 mg/ml pour l'immunosérum BEHRING: c

T : 0,60 mg/ml pour l'immunosérum DAKO: b

(le titre T désigne la quantité en mg de l'antigène protéinique précipité dans 1 ml d'antisérum au moyen de l'immunodiffusion radiale simple).

Cette solution d'Isogel est coulée sur un "Gel Bond"^{*} (12,5 X 11 cm). Après gélification, des puits sont ménagés au milieu de la plaque. Le contact au niveau des électrodes est effectué par une mèche imbibée par de l'acide phosphorique 1 M du côté de l'anode et par de la soude 1 M du côté de la cathode. Les échantillons que l'on analyse dans cette technique sont généralement mis en solution dans l'eau. Or, comme nous le verrons ultérieurement (page 76), si on dessale l' α_1 Achy et si on la garde en solution dans l'eau, l' α_1 Achy passe de la forme active à la forme inactive qui, devenue plus acide, migre plus rapidement en gel alcalin. Nous avons donc étudié en isoélectrofocalisation d'une part de l' α_1 Achy native qui est conservée en PBS, et d'autre part de l' α_1 Achy qui, après avoir été dialysée contre de l'eau désionisée puis lyophilisée, a été mise en solution dans de l'eau désionisée; il s'agit alors d' α_1 Achy inactive.

On commence l'électrofocalisation sous un ampérage constant de 25 mA pendant 15 minutes (le voltage s'élève à 200 volts environ au départ). Puis la puissance est maintenue constante et égale à 10 watts. On arrête l'électrofocalisation lorsque l'ampérage, après avoir diminué, reste constant pendant 15 minutes au moins. L'expérience dure environ 1 heure et demie. La mesure du pH est effectuée à l'aide d'une électrode de contact et la courbe du gradient de pH est tracée en fonction de la distance de migration. La plaque d'Isogel est ensuite placée dans la solution de fixation (page T 11) pendant 2 heures, au minimum. Après avoir été séchée, la plaque est colorée (page T 12).

L' α_1 Achy native apparaît sous la forme de deux bandes de pI moyens différents : la bande la plus importante a un pI moyen égal à 4,0, l'autre bande a un pI moyen proche de 3,75. L' α_1 Achy qui a été dessalée, lyophilisée puis remise en solution dans l'eau se présente sous une forme unique de pI moyen égal à 3,75. La forme active d' α_1 Achy a donc un pI moyen égal à 4,0 tandis que l' α_1 Achy inactive possède un pI moyen égal à 3,75. Des résultats analogues ont été obtenus avec un gradient de pH un peu différent (2,5 - 10,5) ; ils sont présentés figure 34, page 142.

En étudiant du sérum humain par isoélectrofocalisation en gel de polyacrylamide suivie d'immunofixation avec l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy, GIANAZZA et ARNAUD (68) ont montré que l' α_1 Achy migre sous la forme de 7 bandes dont les pI sont compris entre 4,1 et 4,45. Après traitement par la neuraminidase, il reste 4 bandes de pI plus élevés. Des différences dans le taux de sialylation de l' α_1 Achy n'expliqueraient donc que partiellement la microhétérogénéité de cette glycoprotéine.

* "Gel bond" : film polyester servant de support (FMC Corporation, Marine colloids division).

II - 2.4 Composition chimique de l' α_1 -antichymotrypsine.

II - 2.4.1 Composition en acides aminés.

Depuis la rédaction de la publication n° 1, un certain nombre de déterminations complémentaires ont été effectuées pour mieux définir la composition en acides aminés.

II - 2.4.1.1 Dosage du tryptophane et de la méthionine.

Le tryptophane a été dosé après une hydrolyse de 22 heures par l'acide mercaptoéthane sulfonique 3 N à 110°C (159) : le tryptophane représente 0,94 % des résidus d'acides aminés dosés dans la même analyse.

PENKE et coll (159) ont par ailleurs constaté que cette hydrolyse permettait également le dosage précis des résidus de méthionine de la molécule. Après une hydrolyse par HCl 5,6 N, cet acide aminé est très souvent dosé par défaut puisqu'une oxydation partielle peut le transformer en méthionine sulfoxyde. Après hydrolyse de l' α_1 Achy par HCl 5,6 N, nous avons remarqué, d'une expérience à l'autre, des variations importantes du taux de méthionine. Lorsque le pourcentage de méthionine était faible, nous observions dans le diagramme, en avant du pic d'acide aspartique, un pic correspondant vraisemblablement à de la méthionine oxydée sous forme de méthionine sulfoxyde. Lors de l'hydrolyse par l'acide mercaptoéthane sulfonique, l'effet réducteur de cet acide protège la méthionine contre l'oxydation. La méthionine représente 3,1 % des résidus d'acides aminés dosés après cette hydrolyse.

II - 2.4.1.2 Dosage de la cystéine.

Lors des études effectuées pour la publication n° 1, nous n'avons pas décelé de cystine dans le diagramme d'analyse en acides aminés ; la composition en acides aminés était à cette époque déterminée après analyse sur un auto-analyseur BECKMAN multichrome B. Par contre, dans certaines analyses faites ultérieurement sur un autoanalyseur plus performant, l'appareil BECKMAN 119 CL, un pic peu important de cystine a pu être observé. Le pourcentage de cystéine dans la molécule d' α_1 Achy constitue un point de désaccord entre HEIMBURGER et coll (75), qui n'en trouvent pas, et TRAVIS et coll (202) qui décrivent la présence de

deux résidus de cystéine par molécule d' α_1 Achy. Pour préciser le pourcentage que peut représenter cet acide aminé dans la molécule, nous avons donc effectué d'une part une transformation de la cystéine en acide cystéique par oxydation performique et, d'autre part, la transformation en aminoéthylcystéine.

L'oxydation performique est effectuée selon la technique de HIRS (80) et nous nous sommes inspirée de la stratégie adoptée par GLASER et coll. (69) pour l' α_1 PI.: le produit obtenu après oxydation performique est, ou bien soumis d'emblée à l'hydrolyse par HCl 5,6 N, ou bien soumis au préalable à une dialyse contre de l'eau désionisée ; dans ce dernier cas, l'hydrolyse par HCl 5,6 N est effectuée sur le matériel adialysable et sur le matériel dialysable. Il se pourrait en effet, comme cela a été observé pour l' α_1 PI, qu'un pont disulfure existât entre un résidu de cystéine de l' α_1 Achy et un résidu de cystéine d'un peptide comme le glutathion présent dans le sérum. La dialyse effectuée après l'oxydation performique doit permettre d'éliminer cet éventuel peptide. Les résultats indiquent que l'acide cystéique représente environ 0,9 % des résidus d'acides aminés du produit obtenu après oxydation performique et qui n'a pas subi de dialyse. Il n'y a pas de perte d'une quantité significative d'acide cystéique lors de la dialyse. L'acide cystéique dosé doit donc bien appartenir à la molécule d' α_1 Achy.

D'autre part, nous avons soumis l' α_1 Achy à une réduction suivie d'une aminoéthylation selon le protocole décrit dans la partie technique (page T 15). Nous avons préféré effectuer l'aminéthylation plutôt que la S-carboxyméthylation, car dans le diagramme d'acides aminés, la S-carboxyméthylcystéine est éluee juste avant l'acide aspartique ; or, nous avons vu qu'après hydrolyse de l' α_1 Achy native par HCl 5,6 N, nous obtenions très souvent à cette même place un pic vraisemblablement dû à de la méthionine sulfoxyde, ce qui rend moins aisée la comparaison entre les diagrammes obtenus avant et après la modification chimique. L'aminéthylcystéine, éluee entre la lysine et l'arginine, est par contre bien individualisée : elle représente dans l' α_1 Achy 0,5 % des résidus d'acides aminés. En fait, la réaction d'aminéthylation peut n'avoir pas été complète : cela expliquerait que le pourcentage d'aminéthylcystéine soit inférieur au pourcentage d'acide cystéique.

TABLEAU IV

Composition chimique de l' α_1 -antichymotrypsine sérique

	Résultats personnels		HEIMBURGER et coll (75)	TRAVIS et coll (202)
ACIDES AMINES	Nombre de résidus pour 100	Nombre de résidus par mole	Nombre de résidus par mole*	Nombre de résidus par mole
Acide aspartique	11,4	46	47	49
Thréonine ^a	7,7	31	32	31
Sérine ^a	7,2	29	31	32
Acide glutamique	10,7	43	54	50
Proline	3,5	14	15	15
Glycocolle	4,1	16	16	18
Alanine	7,7	31	31	34
Cystine/2 ^b	0,9	4	0	2
Valine	5,2	21	25	27
Méthionine ^c	2,6	10	12	11
Isoleucine	4,3	17	20	23
Leucine	13,4	53	54	56
Tyrosine	2,7	11	10	9
Phénylalanine	5,1	20	26	26
Histidine	2,2	9	9	9
Lysine	6,4	26	28	27
Arginine	4,0	16	15	15
Tryptophane ^c	0,9	4	3	4
Nombre total		401	428	438
SUCRES	en g pour 100 g (poids sec)	Nombre de résidus par mole	en g pour 100 g (poids sec)	Nombre de résidus par mole
Fucose	/	/	0,7	38 à 40
Mannose	4,7	15 à 16	9,9	
Galactose	5,4	17 à 18		
N-acétyl-glucosamine ^d	8,1	21 à 22	7,4	30 à 35
Acide N-acétyl neuraminique	5,4	10 à 11	6,6	11 à 14

* Résultats indiqués sous cette forme par TRAVIS et coll (202).

a La valeur est déduite par extrapolation linéaire au temps zéro des valeurs obtenues après 24 et 72 heures d'hydrolyse.

b La cystine n'est pas dosable après hydrolyse de 24 heures par HCl 5,6 N ; le pourcentage de cystine/2 a été déterminé après transformation en acide cystéique par oxydation performique.

c Acide aminé dosé après hydrolyse de 22 heures par l'acide mercapto-éthane sulfonique 3 N à 110° C.

d Les osamines sont dosées sur autoanalyseur après 4 heures d'hydrolyse par HCl 4 N 4 h.

Après ces déterminations, la composition en acides aminés de l' α_1 Achy peut être recalculée, elle figure dans le tableau IV, ainsi que les compositions publiées par HEIMBURGER et coll. (75) et TRAVIS et coll. (202).

L'existence de résidus de cystéine dans la molécule d' α_1 Achy ne semble donc plus à mettre en doute après ces résultats, leur nombre s'élèverait à 4 résidus par molécule si l'on considère le pourcentage d'acide cystéique dosé. Nous avons vu que, lors des étapes de chromatographie covalente du protocole de purification, l' α_1 Achy n'est pas retenue sur les deux colonnes utilisées ; on peut donc penser que les groupements thiol de l' α_1 Achy ne sont pas facilement accessibles. L'addition d'une faible quantité de β -mercaptoéthanol indispensable pour la fixation de l' α_1 PI sur la colonne de Activated-Thiol-Sepharose 4 B (étape n° 2 du protocole du tableau II page 54) ne doit pas être suffisante pour ouvrir les éventuels ponts disulfure de l' α_1 Achy.

Par ailleurs, nous pouvions nous demander si nous n'avions pas dans l' α_1 Achy une ou plusieurs liaisons thioester comme celles qui existent dans l' α_2 M (186). Lors de la formation du complexe α_2 M-protéase, ces liaisons thioester sont coupées et quatre groupements thiol libres peuvent alors être dosés par molécule d' α_2 M.

Le dosage de groupement thiol libre par la méthode au DTNB (ou réactif d'ELLMAN (56) : acide 5,5' dithiobis - (2-nitrobenzoïque)) indique qu'il n'existe pas de groupement thiol libre dans l' α_1 Achy native. Cependant, pour continuer dans cette voie, il nous a semblé nécessaire d'essayer de purifier l' α_1 Achy sans utiliser les deux étapes de chromatographie covalente qui nécessitent un contact avec du β -mercaptoéthanol (voir II-1.2 page 56). Ce protocole modifié est maintenant au point et nous pourrions appliquer le dosage de groupement thiol libre à l' α_1 Achy purifiée selon ce protocole. Il sera ensuite intéressant de voir si après action d'un enzyme ou après transformation en forme inactive par différents procédés physico-chimiques, il est possible, comme dans le cas de l' α_2 M (186) de mettre en évidence un ou plusieurs groupements thiol libres.

II - 2.4.2 Composition en sucres.

Pour comparer nos résultats avec ceux de TRAVIS et coll. (202), nous avons, dans la publication n° 1, présenté la composition en sucres de l' α_1 Achy en exprimant la composition globale en sucres neutres et en N-acétylhexosamines. Cependant, les méthodes d'analyse utilisées, précisées dans cette même publication

permettent de définir la composition détaillée en sucres ; elle est indiquée dans le tableau IV.

Si nous considérons que la M_r moyenne de l' α_1 Achy est égale à 58 000 et que sa teneur en glucides s'élève à 24 % (en poids), nous pouvons en déduire que la contribution en sucres représente une M_r d'environ 14 000. Si l'on estime que la M_r moyenne d'une chaîne glycanique de glycoprotéine sérique humaine est d'environ 2 500, il est possible de déterminer le nombre de chaînes glycaniques par molécule : il doit être de l'ordre de 4 à 5. Il s'agit très vraisemblablement de glycannes de type N-acetyllactosaminique ou complexe.

II - 2.5 Interactions avec la concanavaline A.

La lectine de fève Jack ou concanavaline A possède quatre sites de liaison ; elle réagit spécifiquement avec les structures glucidiques ayant la configuration d'un α -D-mannopyranoside ou une configuration analogue (d'après la revue de LIS et SHARON (122)). Puisque le mannose représente une partie importante des glycannes de nombreuses glycoprotéines, l'interaction avec la concanavaline A peut être utilisée pour une caractérisation structurale partielle de ces glycoprotéines.

KRUSIUS et coll (110) ont montré, en utilisant des glycopeptides de fétuine et de transferrine que les glycannes ayant une structure biantennée sont capables de réagir avec la concanavaline A, tandis que les glycannes ayant une structure triantennée ne le sont pas. Les travaux de BAYARD et KERCKAERT sur l' α_1 -foetoprotéine (15) et l' α_1 -glycoprotéine acide (14) et ceux de BAYARD et coll sur l' α_1 PI (16) ont permis de confirmer cette observation pour chacune des glycoprotéines étudiées : la fraction réagissant avec la concanavaline A contient uniquement des glycannes ayant une structure biantennée, tandis que la fraction ne réagissant pas avec la concanavaline A peut être un mélange de plusieurs types de glycannes, à l'exception des glycannes ayant une structure biantennée.

L'étude des interactions avec la concanavaline A peut être effectuée en appliquant la technique d'immuno-affinoélectrophorèse bidimensionnelle qui permet simultanément la détection et l'identification de glycoprotéines pouvant se lier à la lectine ; elle combine en effet l'interaction spécifique avec la lectine et l'identification des glycoprotéines par l'immunoprécipitation. La technique originale a été décrite en 1973 par BØG-HANSEN et coll (26), la modi-

fication qui consiste à incorporer la lectine directement dans la bande de gel de la première dimension a été introduite ultérieurement (27) ; elle augmente encore la sensibilité de la technique. Le protocole que nous avons utilisé est décrit dans la partie technique (page T 12).

La concanavaline A incorporée dans le gel de la première dimension est immobile lors de l'électrophorèse. Sa présence provoque un retard de migration de la glycoprotéine et ce retard est proportionnel à l'affinité de la glycoprotéine pour la lectine. Il faut donc que la quantité de concanavaline A incorporée dans le gel de la première dimension soit suffisante pour que toutes les molécules présentes dans le dépôt puissent réagir avec la concanavaline A, si elles ont une affinité pour elle. Ceci nécessite donc un certain nombre d'essais préliminaires. Pour un dépôt de 1 à 1,5 μg d' $\alpha_1\text{Achy}$, il faut incorporer 100 μl d'une solution de concanavaline A à 10 mg/ml dans 1,1 ml d'agarose qui recouvrira ensuite un espace de 1 x 8 cm ménagé dans la bande de première dimension. L'immunosérum spécifique de l' $\alpha_1\text{Achy}$ est utilisé dans la deuxième dimension.

Nous avons analysé, en appliquant cette technique, le sérum de départ, l' $\alpha_1\text{Achy}$ purifiée et l' $\alpha_1\text{Achy}$ qui a réagi avec la chymotrypsine bovine ou avec la cathepsine G*. Une immunoélectrophorèse, sans concanavaline A dans le gel de première dimension, est effectuée en témoin pour l' $\alpha_1\text{Achy}$ pure et l' $\alpha_1\text{Achy}$ qui a réagi avec la cathepsine G. Les diagrammes obtenus sont présentés dans la figure 13. En présence de concanavaline A, les profils de précipitation obtenus sont très semblables, que ce soit avec le sérum, l' $\alpha_1\text{Achy}$ purifiée, l' $\alpha_1\text{Achy}$ qui a réagi avec la chymotrypsine ou avec la cathepsine G. Le pic le plus anodique correspond à de l' $\alpha_1\text{Achy}$ qui n'est pas retenue par la concanavaline A. Lorsque l' $\alpha_1\text{Achy}$ a réagi avec la chymotrypsine ou la cathepsine G, la migration de ce pic est plus élevée que celle du pic obtenu avec l' $\alpha_1\text{Achy}$ native ou le sérum. Le pic intermédiaire correspond à de l' $\alpha_1\text{Achy}$ faiblement retenue par la concanavaline A. Une certaine hétérogénéité est observée pour le pic le moins anodique qui correspond à l' $\alpha_1\text{Achy}$ retenue par la concanavaline A.

Dans le cas de l' α_1 -foetoprotéine (15), de l' α_1 -glycoprotéine acide (14) et de l' $\alpha_1\text{PI}$ (16), la présence du pic intermédiaire caractérisé par des interactions faibles avec la concanavaline A est due à des interactions hydrophobes et/ou à la conformation de la chaîne polypeptidique de la molécule qui empêche l'interaction des glycanes avec la concanavaline A. Pour chacune de ces glycoprotéines, il a en effet été démontré que la réduction suivie de l'alkylation

* cathepsine G leucocytaire humaine, voir p : 85.

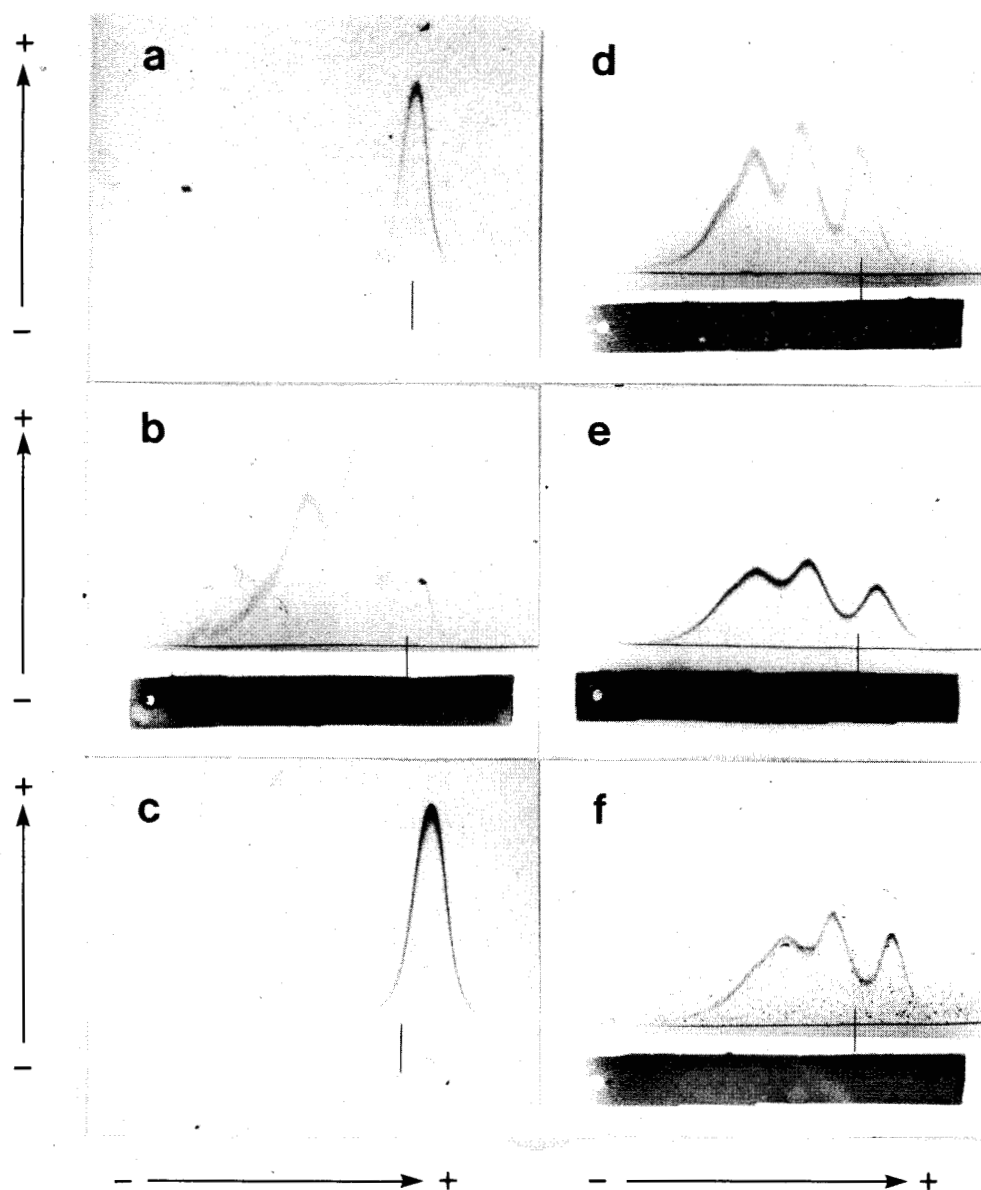


Figure 13 : Diagrammes d'immunoélectrophorèse (a et c) et d'immuno-affinoélectrophorèse avec la concanavoline A (b, d, e, et f) en utilisant l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy (DAKO) dans la deuxième dimension.

a et d : α_1 Achy native ; b : sérum humain normal ; c et e : α_1 Achy ayant réagi avec la cathepsine G ; f : α_1 Achy ayant réagi avec la chymotrypsine.

Un trait indique la position du sommet du pic de l' α_1 Achy native obtenu en (a) prise comme point de repère.

transforme le diagramme obtenu en immuno-affinoélectrophorèse : les interactions faibles avec la concanavaline A ne se créent plus et il n'existe plus que le pic retenu et le pic non retenu.

Les essais d'immuno-affinoélectrophorèse bidimensionnelle effectués sur l' α_1 Achy réduite et aminoéthylée n'ont pas permis d'obtenir des résultats intéressants. En effet, après cette modification chimique, les déterminants antigéniques de l' α_1 Achy sont modifiés de façon trop importante pour que l'on puisse obtenir des réactions d'immunoprécipitation correctes.

Le pic le moins anodique correspond aux molécules d' α_1 Achy possédant des structures glycaniques capables de réagir avec la concanavaline A, c'est-à-dire des structures biantennées. L'hétérogénéité de ce pic peut être due à deux phénomènes supplémentaires : d'une part, des liaisons hydrophobes peuvent s'ajouter à l'affinité des chaînes glycaniques et donc augmenter encore l'interaction des molécules avec la concanavaline A ; d'autre part, la conformation de la chaîne polypeptidique peut gêner la réaction des glycanes, dans ce cas l'interaction des molécules avec la concanavaline A est moins forte.

Ces études des interactions de l' α_1 Achy avec la concanavaline A ne peuvent permettre une définition plus précise de la structure des glycanes de la molécule. Elles permettent, par contre, de montrer que :

1) le traitement subi par l' α_1 Achy pendant le protocole de purification n'induit pas dans les glycanes de modification qui perturbe leurs interactions avec la concanavaline A,

2) la réaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G leucocytaire ou la chymotrypsine bovine qui aboutit à la transformation de l'inhibiteur en α_1 Achy modifiée (voir le chapitre III) ne change pas le taux respectif des formes d' α_1 Achy qui se différencient par leur interaction avec la concanavaline A.

II - 2.6 Détermination de la séquence amino-terminale de l' α_1 -antichymotrypsine.

A chaque cycle de la dégradation récurrente de EDMAN (54), la chaîne polypeptidique est amputée à son extrémité N-terminale d'un acide aminé et un dérivé cyclique instable est libéré : la 2-anilino-5-thiazolinone d'acide aminé. Ce composé est converti en dérivé plus stable : la phenylthiohydantoïne

d'acide aminé (PTH acide aminé). Les PTH d'acides aminés sont identifiées et quantifiées par HPLC.

L' α_1 Achy (35 nanomoles) a été soumise à la méthode manuelle de la dégradation de EDMAN. L'acide aminé en position N-terminale est l'asparagine. Le rendement obtenu est faible (6 %), ceci est sans doute dû à la mauvaise solubilité de l' α_1 Achy dans le tampon de couplage (la diméthylallylamine). La mauvaise solubilité et la proportion élevée de sucres dans la molécule d' α_1 Achy sont sans doute les causes de l'erreur que nous avons faite auparavant (publication n° 1) dans la détermination de l'acide aminé N-terminal.

Un échantillon d' α_1 Achy (130 nanomoles) a ensuite été soumis à la dégradation automatique de EDMAN sur un séquenceur BECKMAN 890 C. Le tampon quadrol 1 M pH 9,0 (programme BECKMAN 122974) a été utilisé en espérant obtenir une meilleure solubilisation de l' α_1 Achy. Au départ un cycle complet, sans clivage, est effectué pour éliminer les acides aminés libres éventuellement adsorbés sur l'échantillon. La présence de l'asparagine en position N-terminale est confirmée sans ambiguïté. Les résultats obtenus permettent de proposer pour l' α_1 Achy la séquence amino-terminale suivante :

Asn-Pro-Asn-Leu-Asp-

Il sera toutefois nécessaire de confirmer cette séquence car nous avons été confrontée à deux problèmes : d'abord, la réaction de clivage pour libérer le dérivé d'acide aminé proline en position 2 a été incomplète et dès le troisième cycle nous observons un recouvrement important dû à une remanence des acides aminés des cycles précédents. Ensuite, il semble qu'il y ait eu coupure partielle d'une liaison interne de la molécule, puisqu'il y a apparition d'une séquence mineure dès le deuxième cycle de la dégradation. La coupure de cette liaison peptidique pourrait résulter des conditions nécessaires à la réaction de clivage (en présence d'acide heptafluorobutyrique et à 57° C). Nous verrons en effet dans la suite de notre travail que l' α_1 Achy purifiée est particulièrement labile dans des conditions analogues d'acidité et de température.

La séquence que nous avons déterminée présente une similitude avec celle publiée récemment par MORII et TRAVIS (138) et qui est présentée ci-dessous sous l'intitulé séquence 1. Une autre séquence amino-terminale de l' α_1 Achy, présentée ci-dessous sous l'intitulé séquence 2, avait été publiée en 1978 par TRAVIS et coll (202). C'est dire que les études structurales de la molécule native posent des problèmes.

séquence 1 :

Asp-Pro-Asn-Leu-Asn-Glu-Asp-Asp-Leu-Thr-Glu-Gly-Asp-Glu-Asn-Arg-Gly-Thr-His-
10 15 16

séquence 2 :

Arg-Gly-Thr-His-

En fait, la séquence 1 publiée par MORII et TRAVIS (138) allonge de 15 acides aminés du côté N-terminal la séquence 2 publiée en 1978. L' α_1 Achy utilisée à cette époque avait été préparée à partir de sérum de sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde ; de plus, le protocole de purification comportait une étape de chromatographie à pH 5,5 qui aurait pu, selon MORII et TRAVIS (138) activer un enzyme capable d'hydrolyser la liaison peptidique entre les acides aminés en position 15 et 16.

Cependant, MORII et TRAVIS (138) montrent que même en effectuant toutes les étapes de purification à un pH égal à 8,0, l' α_1 Achy présente les deux séquences amino-terminales décrites, que l' α_1 Achy soit préparée à partir de sérum normal ou de sérum de sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde. 90 % des molécules d' α_1 Achy purifiées à partir du sérum normal possèdent la séquence 1, les 10 % de molécules restantes présentent la séquence 2 ; quand l' α_1 Achy est préparée à partir de sérum de sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde, 55 % des molécules possèdent cette fois la séquence 2. MORII et TRAVIS (138) envisagent, en conclusion, l'existence éventuelle soit d'un système enzymatique particulier pouvant provoquer la libération du peptide, soit d'un deuxième gène, l'un ou l'autre pouvant être activé quand intervient une réaction inflammatoire.

La première détermination de séquence amino-terminale de l' α_1 Achy nous permet de tirer quelques enseignements qui seront mis à profit lors d'une étude ultérieure :

1) Le remplacement de la diméthylallylamine utilisée en méthode manuelle par le quadrol utilisé en méthode automatique a permis d'améliorer un peu le rendement du premier cycle qui reste cependant relativement faible (25 %). Nous envisageons donc de détruire la conformation de la molécule d' α_1 Achy par réduction et alkylation ce qui devrait permettre d'obtenir une meilleure solubilisation.

2) L'identification d'un résidu de proline en deuxième position nous conduira à effectuer un double clivage afin d'obtenir une meilleure libération du dérivé proline et d'éviter ainsi les recouvrements aux cycles suivants.

II - 2.7 Stabilité de l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy après divers traitements physiques ou chimiques.

Nous reverrons beaucoup plus en détail dans le chapitre III les études de l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy. Dans cette partie, nous nous limitons à suivre l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy lorsque la molécule est soumise à différents traitements physiques ou chimiques. L'activité inhibitrice est mise en évidence soit après migration en gel d'agarose ou en gel de polyacrylamide sans agent dénaturant selon la méthode décrite dans la partie technique (page T 13) soit par la mesure, à l'aide de la méthode spectrophotométrique, de l'activité résiduelle de l'enzyme dans des mélanges inhibiteur-enzyme (voir page T 16).

Nous avons vérifié en SDS-PAGE si l' α_1 Achy conserve, après certains traitements, sa capacité de former un complexe avec la chymotrypsine bovine ou la cathepsine G d'origine leucocytaire humaine.

II - 2.7.1 Effet de la température.

L' α_1 Achy se trouve dans tous les cas en solution dans le PBS. Lorsque l' α_1 Achy est congelée et conservée à -25°C , elle conserve ses propriétés inhibitrices pendant au moins 2 ans. Conservée à 4°C , l' α_1 Achy garde ses propriétés inhibitrices pendant 2 à 3 mois au minimum. Aucune perte d'activité inhibitrice significative n'a pu être décelée après une conservation de l' α_1 Achy pendant 4 jours à 25°C ou à 37°C . Dans tous les cas, nous avons pu constater après électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 8,3 sans agent dénaturant que le rapport densitométrique des bandes obtenues au niveau des α -globulines reste le même, ce qui indique que la proportion d' α_1 Achy active ne varie pas. Notons cependant que l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy est détruite après traitement à 100°C pendant 3 minutes.

Récemment, MATSUMOTO et coll (130) ont montré que l' α_1 Achy gardée à 60°C pendant 15 minutes perd totalement son activité inhibitrice, tandis qu'un traitement de 15 minutes à 55°C fait disparaître seulement la moitié de son activité. HEIMBURGER et coll (75) pour leur part ont observé que l' α_1 Achy perd sa capacité d'inhiber la chymotrypsine après 30 minutes à 56°C (56°C est la température utilisée pour inactiver le complément dans un sérum).

II - 2.7.2 Effet du dessalage et de la lyophilisation.

Une dialyse contre de l'eau désionisée ou un lavage par l'eau désionisée dans une cellule d'ultrafiltration (avec une membrane YM 5) suivi d'une lyophilisation et d'une remise en solution dans l'eau désionisée provoque la perte de la quasi-totalité de l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy. Il est pourtant nécessaire pour certaines études telles que les analyses chimiques (composition chimique ou détermination de la séquence N-terminale par exemple) de disposer de matériel lyophilisé.

Nous tenions à ce que le matériel ait conservé le maximum des caractéristiques de la molécule native, y compris les propriétés inhibitrices.

Après de nombreux essais, il s'est avéré qu'un lavage dans une cellule d'ultrafiltration (membrane Y M 5) par 100 volumes au moins de bicarbonate d'ammonium 0,005 M (pH 7,4) permet d'éliminer les sels en n'altérant pas les propriétés inhibitrices. Dans ces conditions, l' α_1 Achy acquiert, à pH 8,6, une mobilité électrophorétique un peu plus anodique, mais conserve son activité inhibitrice. Le bicarbonate d'ammonium peut être éliminé par lyophilisation. La lyophilisation provoque néanmoins une augmentation d'environ 10 % de la bande d' α_1 Achy inactive observée en gel de polyacrylamide à pH 8,3 sans agent dénaturant.

Le bicarbonate d'ammonium 0,1 M de pH 8,3 a été utilisé par PETERSEN et coll (162) pour la conservation de l'antithrombine III. CARP et coll (34) conservent également l' α_1 PI en solution dans du bicarbonate d'ammonium (0,05 M, pH 7,8).

II - 2.7.3 Effet de la succinylation.

L' α_1 Achy succinylée ne présente plus d'activité inhibitrice. Ce résultat a été obtenu par des mesures spectrophotométriques et par révélation après électrophorèse en plaque d'agarose ou en gel de polyacrylamide à pH 8,3. Aucune formation de complexe n'est observée en SDS-PAGE quand l' α_1 Achy succinylée est incubée avec de la chymotrypsine (figure 14).

II - 2.7.4 Effet de l'oxydation performique.

Après oxydation performique, dialyse et lyophilisation, très peu d' α_1 Achy peut être observée en SDS-PAGE ou après électrophorèse en gel de poly-

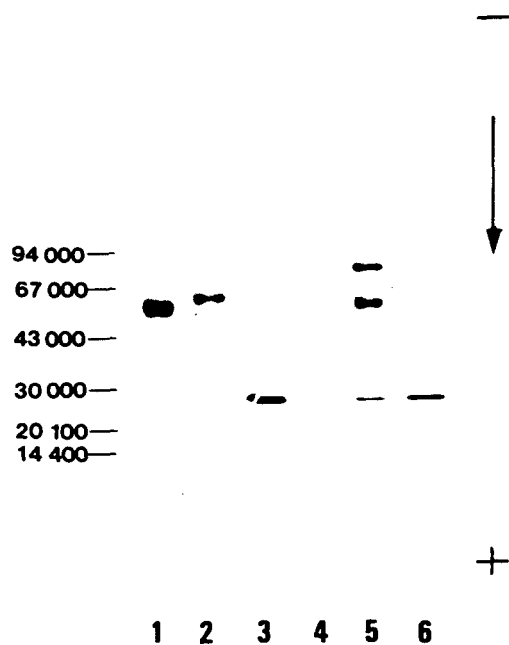


Figure 14 : Inactivation de l' α_1 Achy par la succinylation. L'étude est effectuée en électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS.

- 1 : α_1 Achy native
- 2 : α_1 Achy succinylée
- 3 : chymotrypsine
- 4 : chymotrypsine succinylée
- 5 : mélange d' α_1 Achy + chymotrypsine
- 6 : mélange d' α_1 Achy succinylée + chymotrypsine.

crylamide à pH 8,3 sans agent dénaturant. Dans ce dernier système, nous observons un matériel insoluble important qui ne pénètre pas dans le gel. Aucune bande présentant une activité inhibitrice envers la chymotrypsine ne peut être mise en évidence dans cet échantillon.

II - 2.7.5 Effet de l'aminoéthylation.

Nous avons montré que l' α_1 Achy aminoéthylée présente une M_r égale à celle de la molécule native (figure 9). Elle n'est plus capable cependant de former un complexe avec la chymotrypsine ou la cathepsine G. Après électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 8,3 en l'absence d'agent dénaturant, aucune activité inhibitrice n'est mise en évidence dans cet échantillon.

II - 2.7.6 Effet d'un agent dénaturant : le SDS.

Il aurait été intéressant de pouvoir révéler l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy après SDS-PAGE d'autant plus que des techniques d'élimination du SDS sont décrites (59,70). Mais il ne faut pas faire subir à l' α_1 Achy le traitement généralement appliqué aux échantillons que l'on étudie en SDS-PAGE, et qui consiste à maintenir l'échantillon à 100°C pendant 3 minutes en présence d'une concentration finale de 1 % en SDS. En effet, nous avons vu que l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy est détruite après 3 minutes à 100°C (voir II - 2.7.1 p.76). L' α_1 Achy a donc été traitée à température ambiante par le SDS (concentration finale de 1 %) et étudiée en SDS-PAGE. Dans ces conditions, la majeure partie de l' α_1 Achy a une migration identique à celle qu'elle a après avoir subi le traitement à 100°C, mais la révélation de l'activité inhibitrice après élimination du SDS par la technique de GRANELLI-PIPERNO et REICH (70) montre que l' α_1 Achy a perdu sa capacité inhibitrice. La présence de SDS provoque, même à température ambiante, la perte des propriétés inhibitrices de l' α_1 Achy.

Nous pouvons donc constater que l' α_1 Achy perd relativement facilement son activité inhibitrice. HEIMBURGER et coll (75) ont indiqué que l' α_1 Achy est particulièrement instable en milieu acide (pH < 5,0), ceci expliquerait d'ailleurs que l' α_1 Achy dont le pI est inférieur à 4,0, perde son activité lorsqu'elle est en solution dans l'eau. TRAVIS et coll (202) ont précisé qu'ils stockent l' α_1 Achy purifiée en solution congelée dans un tampon Tris 0,05 M, NaCl 0,05 M de pH 8,0 et que s'ils poursuivaient la concentration de leur solution par ultrafiltration au-delà de 3 mg / ml, une précipitation vraisemblablement due à la polymérisation de l'inhibiteur intervenait.

Nous avons constaté une augmentation importante de la forme inactive de l' α_1 Achy lorsque la concentration d'une solution d' α_1 Achy purifiée dépasse 1,5 mg/ml. Nous ne pouvons actuellement expliquer ce phénomène.

Par contre, l' α_1 PI que nous avons également purifiée et dont nous commençons à étudier les propriétés inhibitrices supporte mieux la dialyse contre l'eau désionisée et la lyophilisation. De plus, cet inhibiteur conserve au moins en partie son activité inhibitrice après avoir subi un séjour de 3 minutes à 100° C en présence de 1 % de SDS.

D'autres inhibiteurs de sérine-protéases sont caractérisés par une grande instabilité. Ainsi l' α_2 M se transforme facilement en forme inactive (voir I - 3.1). L'AP ($M_r = 67\ 000$) se transforme spontanément "in vitro" en une forme modifiée de $M_r = 60\ 000$ (43). Ces changements sont associés à la fois à une diminution de la M_r et à une augmentation de la mobilité électrophorétique en gel d'agarose à pH 8,6. Les processus aboutissant à ces transformations ne sont pas connus (43).

Le deuxième chapitre présente :

1) la mise au point de deux protocoles de purification de l' α_1 -antichymotrypsine sérique fondés sur la chromatographie d'immuno-affinité ; l'un d'entre eux permet en outre d'obtenir une fraction très enrichie en α_1 -antiprotéase.

2) les critères de pureté de l' α_1 -antichymotrypsine ainsi obtenue :

- un seul arc de précipitation avec un immunsérum anti-sérum humain total.
- une seule bande après électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS ($M_r = 58\ 000$).
- un seul acide aminé en position N-terminale (Asn).

3) les propriétés physico-chimiques :

- l' α_1 -antichymotrypsine dont la composition chimique est détaillée, est une glycoprotéine contenant 24 % de sucres (en poids), soit 4 ou 5 chaînes glycaniques. Son point isoélectrique est voisin de 4,0.

4) l'étude de la stabilité de la molécule :

- l' α_1 -antichymotrypsine perd relativement facilement ses propriétés inhibitrices. La molécule inactive est caractérisée par un point isoélectrique plus bas et une M_r plus faible que ceux de la molécule native.

CHAPITRE III

REACTION DE L' α_1 -ANTICHYMOTRYPSINE AVEC 4 SERINE-PROTEASES.

- III - 1 CHOIX ET PROPRIETES PRINCIPALES DES PROTEASES UTILISEES AU COURS DE NOTRE ETUDE
 - III - 1.1 Choix des protéases
 - III - 1.2 Propriétés principales des protéases choisies

- III - 2 APPROCHE TECHNOLOGIQUE DES PHENOMENES D'INTERACTION. APPORT ET LIMITES DES DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES.
 - III - 2.1 Dosage spectrophotométrique de l'activité enzymatique
 - III - 2.2 Révélation de l'activité inhibitrice et révélation de l'activité estérasique après séparation électrophorétique
 - III - 2.3 Méthodes faisant intervenir la précipitation antigène-anticorps.
 - III - 2.4 Modifications des propriétés physicochimiques de l'inhibiteur et des enzymes.

- III - 3 DEFINITION DES CONDITIONS OPERATOIRES CHOISIES POUR LES ETUDES DES INTERACTIONS DE L' α_1 -ANTICHYMOTRYPSINE AVEC LES ENZYMES.
 - III - 3.1 Tampon utilisé.
 - III - 3.2 Détermination des concentrations des solutions d'inhibiteur et d'enzyme.
 - III - 3.3 Mélange de contrôle : α_1 -antichymotrypsine - enzyme inactivé.

- III - 3.4 Arrêt de la réaction.
- III - 3.5 Température choisie pour l'incubation.
- III - 3.6 Dispositions générales.

III - 4 REACTION AVEC LA CHYMOTRYPSINE BOVINE.

- III - 4.1 Titration des sites actifs de la chymotrypsine.
- III - 4.2 Courbe d'inhibition de la chymotrypsine par l' α_1 -antichymotrypsine.
- III - 4.3 Etude de l'inhibition à 0° C de la chymotrypsine par l' α_1 -antichymotrypsine.
- III - 4.4 Stabilité dans le temps du complexe α_1 Achy-chymotrypsine.
- III - 4.5 Résultats publiés par d'autres auteurs.
- III - 4.6 Considérations sur le caractère temporaire de l'inhibition par certains inhibiteurs sériques.
- III - 4.7 Etude de la stabilité du complexe α_1 Achy-chymotrypsine en présence de PMSF.

III - 5 REACTION AVEC LA CATHEPSINE G.

- III - 5.1 Résumé des résultats présentés dans les publications n° 2 et 3.
- III - 5.2 Questions posées par ces résultats et par l'utilisation d'une nouvelle préparation de cathepsine G.
- III - 5.3 Stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G dans un mélange préparé en présence d'inhibiteur en excès.
- III - 5.4 Stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G lorsqu'une activité enzymatique résiduelle existe dans le mélange au début de la réaction.

- III - 5.5 Etude de la stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G en présence de PMSF.
- III - 5.6 Essai de synthèse des résultats obtenus dans l'étude de la réaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G.
- III - 5.7 Résultats publiés par d'autres auteurs.

III - 6 REACTION AVEC LA TRYPSINE BOVINE ET L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE HUMAINE.

- III - 6.1 Réaction avec la trypsine bovine.
- III - 6.2 Réaction avec l'élastase leucocytaire humaine.
- III - 6.3 Synthèse et comparaison avec la réaction entre d'autres inhibiteurs et des enzymes qu'ils n'inhibent pas.

III - 7 CONCLUSION. HYPOTHESE D'UN MECANISME D'ACTION DE L' α_1 -ANTICHYMO-TRYPSINE.

INTERACTION BETWEEN HUMAN SERUM α_1 -ANTICHYMOTRYPSIN AND HUMAN
LEUKOCYTE CATHEPSIN G
COMPLEX FORMATION AND PRODUCTION OF A MODIFIED INHIBITOR

Anne LAINE, Monique DAVRIL and Annette HAYEM

Unité des Protéines, INSERM N°16, Place de Verdun 59045 LILLE Cédex
(FRANCE)

Received December 16, 1981

SUMMARY. The stoichiometry of the inhibition of leukocyte cathepsin G by serum α_1 -antichymotrypsin was determined spectrophotometrically to be 1 : 1. Complex formation was assessed by both SDS and alkaline polyacrylamide gel electrophoreses at various molar ratios of inhibitor to enzyme ; formation of a complex with a molecular weight near 80,000 was demonstrated. Even in excess of enzyme a modified inactive form of α_1 -antichymotrypsin was shown to be produced free in solution during the reaction. Moreover this modified inhibitor could not be differentiated electrophoretically and immunologically from inhibitor spontaneously dissociated from the complex.

Plasma protease inhibitors such as α_2 -macroglobulin, α_1 -protease inhibitor and more recently antithrombin III have been given great attention and the manners in which these inhibitors react with proteases have been investigated by several authors (1-12). With regard to the mechanism for inhibition of cathepsin G by α_1 Achy, details have not been worked out. According to Travis et al. (13), the reaction results in a complex of Mr near 90,000 by SDS-PAGE. Previously they had noticed (14) that the reaction required an excess of inhibitor to inactivate all of the cathepsin G, without giving more explanations except for the possible presence of an unknown cofactor needed to activate all of the inhibitor molecules in the purified preparation.

A search for a possible mechanism of interaction between α_1 Achy and cathepsin G led us to examine the products obtained for different molar ratios of these two components under various experimental conditions. This paper demonstrates that, as for antithrombin III (11), we obtain concurrently the formation of an inhibitor-enzyme complex and the appearance of a free modified inactive inhibitor. Moreover when the enzyme excess is not inactivated after formation of the complex, some degraded complex can be observed in SDS-PAGE as for antithrombin III (12).

Abbreviations: SDS, sodium dodecyl sulfate ; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride ; Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA, N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-prolyl-L-phenylalanyl-p-nitroanilide ; α_1 Achy, α_1 -antichymotrypsin ; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

MATERIAL AND METHODS

Human serum α_1 Achy was prepared by the procedure detailed previously (15). Human leukocyte cathepsin G (EC 3.4.21.20) was obtained in our laboratory from purulent sputum using the procedure described previously (16). α_1 Achy was kept frozen in 0.01 M sodium phosphate buffer, 0.3 M NaCl, pH 7.5; the concentration of the solution (1.05 mg/ml) was measured after electroimmunodiffusion according to Weeke (17) (with dilutions of a standard serum Behring) and with the method of Lowry et al. (18). Cathepsin G, which was stored lyophilized, was dissolved just before the assays in 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 containing 0.45 M NaCl. Its concentration was measured with the method of Lowry et al. (18) which gave results in good agreement with spectrophotometric measurements using an extinction coefficient ($E_{280}^{1\%}$) of 10.0 (19). The solution we used was 1.3 mg/ml.

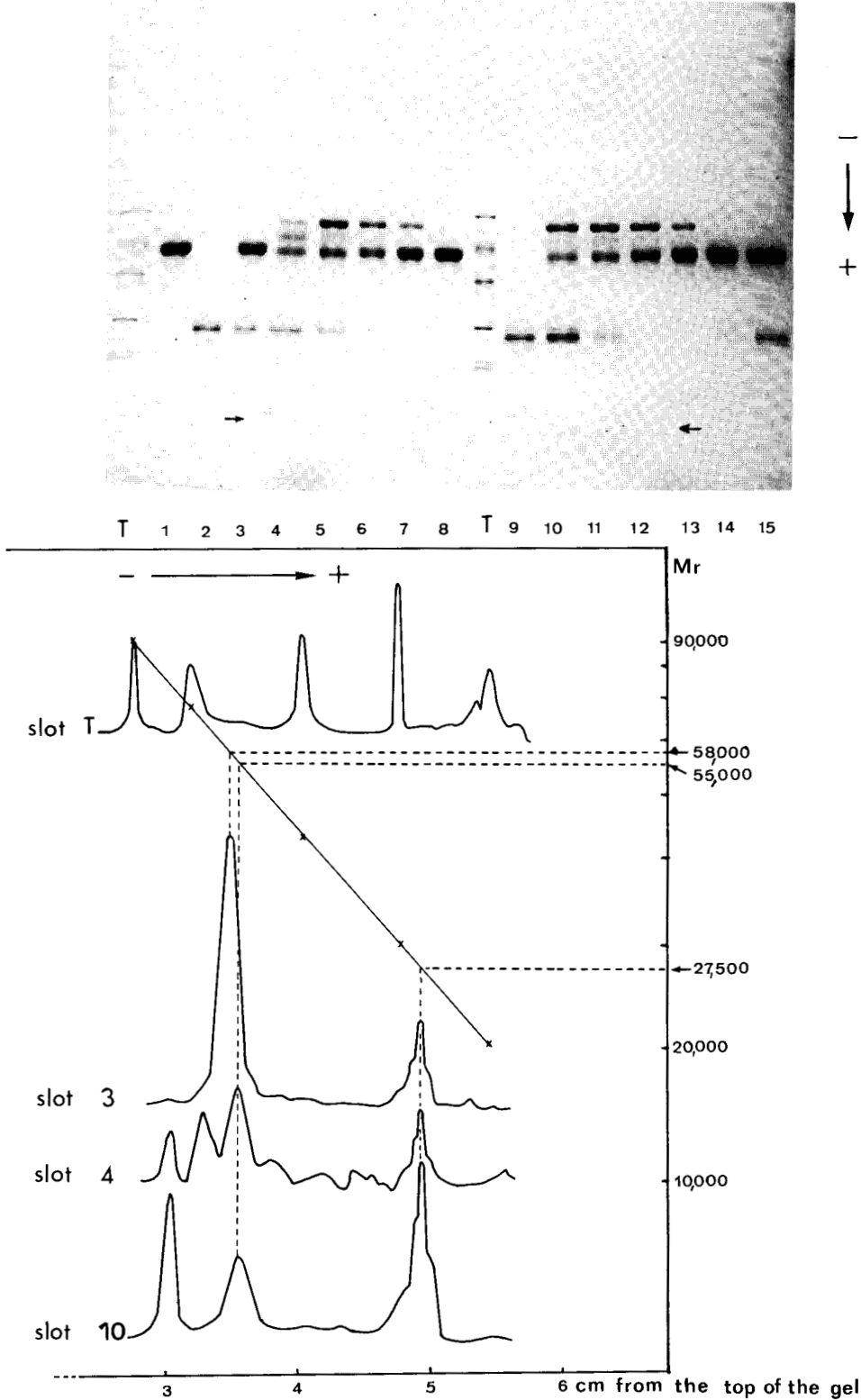
Cathepsin G activity was determined by a spectrophotometric method in which the release of p-nitroaniline from a synthetic chromogenic substrate, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA, was measured at 410 nm. The conditions were 0.1 M HEPES buffer, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 % dimethylsulfoxide, 9×10^{-8} M enzyme and 10^{-3} M substrate (final concentrations), at 25°C. The concentration of cathepsin G was determined with the above substrate using the kinetic constants which are based on titrated enzyme (20).

Analytical electrophoreses were carried out on polyacrylamide slab gels using the technique described by Kerckaert (21). Alkaline PAGE was performed on 10 % acrylamide gels, at pH 8.3, using the gel buffer system of Davis (22). SDS PAGE was performed on a 5-30 % gel gradient using the buffer system of Laemmli (23). Before SDS-PAGE, samples were heated for 3 min in a boiling water bath, in a buffer containing 1 % SDS and 2 % mercaptoethanol. Protein precipitation and staining were performed as in our previous work (15). Mr were determined in SDS PAGE using the Pharmacia low Mr calibration kit and were estimated to be 58,000 and 27,500 for α_1 Achy and leukocyte cathepsin G respectively.

RESULTS

A constant amount of cathepsin G was incubated with increasing amounts of α_1 Achy for 5 min at 25°C and the remaining cathepsin G activity was measured by the spectrophotometric assay described under "Materials and Methods". The results were plotted and led to an estimation of the molar ratio between α_1 Achy and cathepsin G of 1.1 : 1 at the point of full inhibition. In spite of the precautions taken during the purification procedure, a small part of the purified α_1 Achy (less than 10 %) is inactive. Therefore α_1 Achy and cathepsin G must form a 1 : 1 stoichiometric complex. Furthermore, we observed that α_1 Achy completely inhibited cathepsin G at a molar ratio 1.1 : 1 after an incubation time as short as 1 min at 25°C. The same results were also obtained after 10 min incubation at 0°C, so these more practical conditions were used for further experiments.

Complex formation was assessed by SDS PAGE. A constant amount of α_1 Achy (4 nanomoles) was incubated with varying amounts of cathepsin G. The incubation was performed for 10 min at 0°C at pH 7.5. Four different incubation mixtures were made and led to the following molar ratios of α_1 Achy to cathepsin G = 0.46 : 1, 0.92 : 1, 1.85 : 1, 4.6 : 1. The remaining cathepsin G activity which was measured at the end of the incubation time for the molar ratio of 0.92 : 1 was equal to 20 % of the initial activity. That was in agreement with the previous spectrophotometric assays.



An aliquot of each incubation mixture was immediately treated for SDS PAGE as described under "Materials and Methods". To the remaining part of each incubation mixture was added a hundred-fold molar excess of PMSF over cathepsin G initially present in order to stop the enzymatic action of excess cathepsin G or of cathepsin G which might have dissociated from the complex. This enzymatic action actually could occur when the samples were heated before SDS PAGE. After 15 min of contact with PMSF, an aliquot of each of these incubation mixtures was treated for SDS PAGE. The following controls were also analyzed : α_1 Achy alone, cathepsin G alone and a mixture (molar ratio 1.85 : 1) of α_1 Achy and cathepsin G which had been inactivated before mixing with the inhibitor by treatment with a hundred fold molar excess of PMSF for 15 min at 0°C. The SDS PAGE results are shown in Fig 1. The sample volumes analyzed were calculated to have the same initial amount of inhibitor (2 μ g). We obtained the same results when mercaptoethanol was omitted during the preparation of the samples (data not shown). In slot 2 and 9, cathepsin G has not been inhibited with PMSF before the treatment for SDS PAGE, thus some autolysis occurred during this treatment and smaller components are visible. In all the incubation mixtures, we observe the presence of a component having a lower electrophoretic mobility, thus a higher Mr (estimated to be 80,000) than the native inhibitor. Since its amount in each mixture depends on the inhibitor-enzyme molar ratio, it must be a complex between α_1 Achy and cathepsin G. In the mixtures with molar ratio of 0.46 : 1 a smaller amount of the 80,000 complex is detected in slot 4 than in slot 10 where PMSF was added to the mixture at the end of the incubation time. But in slot 4 another form (of Mr near 69,000) is clearly visualized. This form must be the result of degradation of the 80,000 complex, when the samples were heated, by the untreated with PMSF cathepsin G in excess. In all the incubation mixtures we can see a component which migrates in nearly the same position as the native inhibitor. When there is an excess of enzyme (Fig 1, slots 4, 5, 10 and 11) this protein band moves slightly faster than the native inhibitor ; in excess

Figure 1

SDS PAGE.

T : Mr markers : phosphorylase B (94,000), bovine albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100), α -lactalbumin (14,400).

Slots 1, 8, 14 : α_1 Achy. Slots 2, 9 : leukocyte cathepsin G. Slots 3, 15 : mixture of α_1 Achy with previously inactivated leukocyte cathepsin G. Slots 4 to 7 : incubation mixtures without PMSF. Slots 10 to 13 : incubation mixtures with PMSF.

Molar ratios : α_1 Achy : cathepsin G = Slots 4, 10 : 0.46 : 1, Slots 5, 11 : 0.92 : 1, Slots 6, 12 : 1.85 : 1, Slots 7, 13 : 4.6 : 1. (2 μ g of initial inhibitor present in each slot.)

The stained gel was scanned with a densitometer Vernon PHI4. Densitometric traces are shown for slots 3, 4, 10 and T. The major band of cathepsin G was chosen as reference for the slots 3, 4 and 10 in order to compare the mobilities more precisely. The mobilities of the reference proteins (in slot T) were plotted versus the logarithm of their molecular weight. Then the comparison of the molecular weight of the two forms of α_1 Achy was made with cathepsin G (Mr : 27,500) as reference.

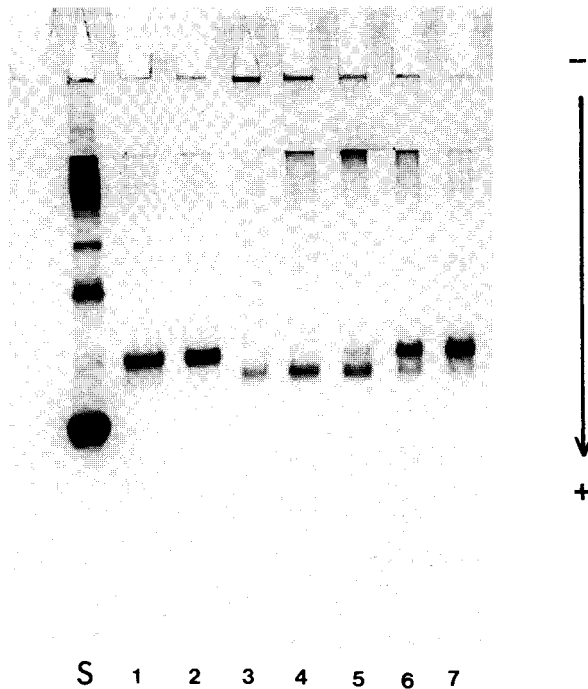


Figure 2

Alkaline PAGE

S : normal serum. Slots 1, 7 : α_1 Achy. Slot 2 : mixture of α_1 Achy and previously inactivated cathepsin G. Slots 3 to 6 : incubation mixtures with PMSF. Molar ratios α_1 Achy : cathepsin G = slot 3 = 0.46 : 1, slot 4 = 0.92 : 1, slot 5 = 1.85 : 1, slot 6 = 4.6 : 1. ($3\mu\text{g}$ of initial inhibitor present in each slot.)

of inhibitor (Fig 1, slots 6, 7, 12 and 13) this band is broader and consists of a mixture of the native inhibitor and the other faster migrating component. Densitometric traces of slots 3, 4 and 10 are shown as the trace of slot 1 which allows us to estimate the M_r difference between the slightly faster band and the native inhibitor : about 3,000. In the mixtures with active cathepsin G we are able to observe a diffuse band of M_r near 6,000, slightly stained with Coomassie Blue (marked with an arrow, Fig 1).

The incubation mixtures treated with PMSF were studied in alkaline PAGE (Fig 2). The mixture of α_1 Achy with inactivated cathepsin G gives the same pattern as α_1 Achy alone (Fig 2, slots 1 and 2). At pH 8.3 cathepsin G ($pI > 10$) is not able to migrate towards the anode. The volumes of the analyzed samples were calculated to have the same initial amount of inhibitor in each slot ($3\mu\text{g}$). In the first two mixtures (molar ratios 0.46 : 1, 0.92 : 1) (Fig 2, slots 3 and 4) the band corresponding to the native inhibitor has disappeared. We only can see a more lightly stained band which moves faster than the native inhibitor. Its pI , determined by isoelectric focusing, is equal to 3.75 instead of 3.9 for native inhibitor. In crossed immunoelectrophoresis these samples give a precipitation curve with specific antiserum

against α_1 Achy with α_1 mobility at pH 8.6 (data not shown). This faster band corresponds to a modified form of α_1 Achy. In the last two mixtures (slots 5 and 6), when there is an excess of inhibitor, native inhibitor still exists in addition to the faster band. Contrary to the faster band, this native inhibitor has kept the ability to inactivate cathepsin G or bovine chymotrypsin when we use the method for characterization of the activity of protease inhibitors previously described (15). In this electrophoretic system the complex cannot be easily shown because it tends to aggregate : the mixture solutions are more turbid than the initial inhibitor and enzyme solutions. Thus this aggregated complex does not easily enter the gel.

In order to know how the reaction was going on, a mixture with molar ratio of 1.85 : 1 was left in the buffer used for the complex formation (pH 7.5) without PMSF at 4°C for 7 days. As control native inhibitor was kept in the same conditions. After 24 h some complex persisted, after 7 days the complex previously shown by SDS PAGE (Fig 1 slot 6) has completely disappeared (Fig 3A, slot 1) ; the following components are seen : one band migrating slightly faster than the native inhibitor (of Mr near 55,000) and the diffuse band of Mr near 6,000 that we have seen before. When the mixture was studied in alkaline PAGE (Fig 3B, slot 1) and compared to the same mixture left for 10 mn at 0°C (Fig 2, slot 5) only the faster component was visualized. This component reacted with antiserum against α_1 Achy.

DISCUSSION. The spectrophotometric assays bring to the fore the fact that equimolar amounts of α_1 Achy and cathepsin G are required for full inhibition of the enzyme. The complex formed has a Mr (80,000) in SDS PAGE smaller than the one expected ($58,000 + 27,500 = 85,500$) ; however its Mr confirms a 1 : 1 stoichiometric reaction. The diffuse band of Mr near 6,000 corresponds probably to the missing peptide. Besides these two components, in the presence of excess enzyme, while all of the inhibitor should be complexed, an unexpected band is observed after SDS PAGE, having a slightly faster mobility than the native inhibitor. Considering the results obtained in alkaline PAGE, without dissociation agent, this form does not represent the result of a partial complex dissociation due to the presence of SDS in the gel and in the samples. Actually, in these incubation mixtures no native inhibitor is found using the alkaline PAGE, only a new faster moving component is detected ; it reacts with antiserum against α_1 Achy but has lost the ability to inhibit cathepsin G or bovine chymotrypsin. This modified α_1 Achy is probably a product of cathepsin G action because none of it is formed when α_1 Achy is incubated with cathepsin G which had been previously inactivated with PMSF.

In the last experiment, we demonstrated that a dissociation or a degradation of the complex occurred spontaneously in 7 days ; it leads to a

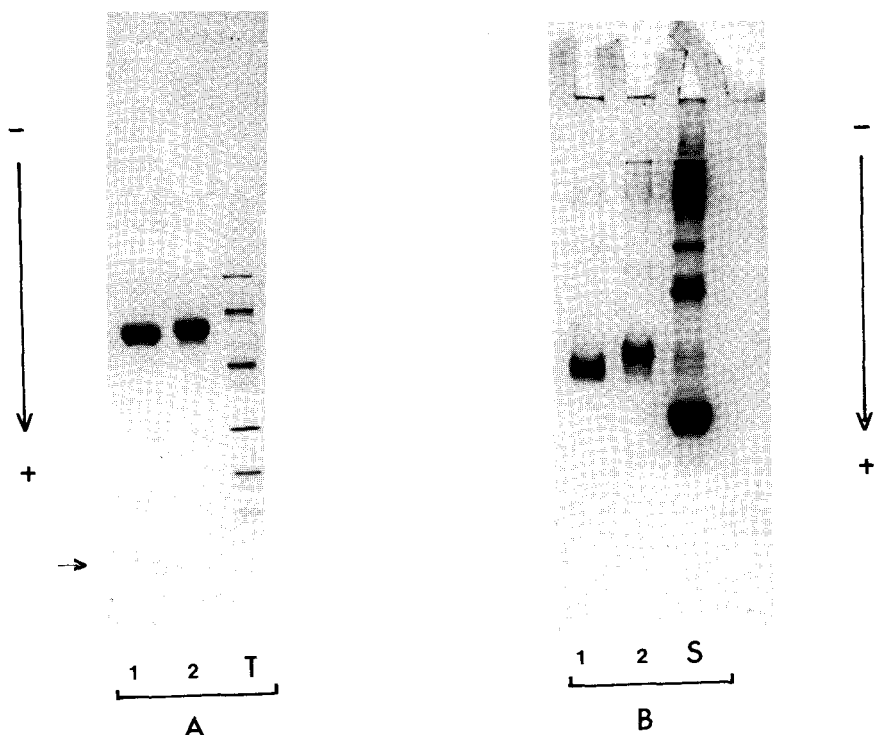


Figure 3

PAGE patterns of a mixture of α_1 Achy and leukocyte cathepsin G molar ratio 1.85 : 1 kept for 7 days at 4°C at pH 7.5 (slots 1), and of α_1 Achy alone (slots 2).

A - SDS PAGE. T = Mr markers (the same as in Fig. 1). (the diffuse band with a molecular weight of about 6,000 is marked with an arrow).

B - Alkaline PAGE. S = normal serum.

modified form of α_1 Achy, which cannot be electrophoretically and immunologically differentiated from the modified inhibitor detected after 10 min incubation at 0°C.

All these data suggest that as for the interaction between antithrombin III and thrombin (24), limited proteolysis of the inhibitor by the enzyme may be involved in the mechanism by which α_1 Achy inhibits leukocyte cathepsin G. Such a mechanism has been much debated in the interaction between α_1 -protease inhibitor and proteases (5-8). Tentative hypothesis given by Fish and Björk (24) for the mode of action of antithrombin III in the inhibition of thrombin would seem to be suitable, in the broad lines, in this case. The ratios between the two possible ways these authors have suggested for the modified inhibitor present in the initial complex are probably depending on the association and dissociation rate constants of the reactions.

Acknowledgements

The skilful assistance of Mrs M.P. Ducourouble and M. Lohez is gratefully acknowledged. This work was supported by INSERM (CRL N°79.5.153.3).

REFERENCES

- 1 Ohlsson, K., and Skude, G. (1976) Clin. Chim. Acta 66, 1-7
- 2 Barrett, A.J., Brown, M.A., and Sayers, C.A. (1979) Biochem. J. 181, 401-418
- 3 Sottrup-Jensen, L., Petersen, T.E., and Magnusson, S. (1980) FEBS Lett. 121, 275-279
- 4 Sottrup-Jensen, L., Petersen, T.E., and Magnusson, S. (1981) FEBS Lett. 128, 127-132
- 5 Johnson, D., and Travis J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7142-7144
- 6 James, H.L., and Cohen, A.B. (1978) J. Clin. Invest. 62, 1344-1353
- 7 Baumstark, J.S., Babin, D.R., Lee, C.T., and Allen, R.C. (1980) Biochim. Biophys. Acta 628, 293-302
- 8 Martodam, R.R., and Liener, I.E. (1981) Biochim. Biophys. Acta 667, 328-340
- 9 Griffith, M.J., and Lundblad, R.L. (1981) Biochemistry 20, 105-110
- 10 Björk, I., Danielsson, A., Fenton, J.W., and Jörnvall, H. (1981) FEBS Lett. 126, 257-260
- 11 Fish, W.W., Orre, K., and Björk, I. (1979), FEBS Lett. 98, 103-106
- 12 Fish, W.W., Orre, K., and Björk, I. (1979) Eur. J. Biochem. 101, 39-44
- 13 Travis, J., Bowen, J., and Baugh, R. (1978), Biochemistry 17, 5651-5656
- 14 Travis, J., Baugh, R., Giles, P.J., Johnson, D., Bowen, J., and Reilly, C.F. (1978), in : Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. (Havemann, K. and Janoff, A. eds), pp 118-128, Urban and Schwarzenberg, Inc. Baltimore-Munich
- 15 Laine, A., and Hayem, A. (1981), Biochim. Biophys. Acta 668, 429-438
- 16 Martodam, R.R., Baugh, R.J., Twumasi, D.Y., and Liener, I.E. (1979), Preparative Biochemistry 9, 15-31
- 17 Weeke, B. (1973), Scand. J. Immunol. 2, sup. 1, 1-35
- 18 Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., (1951), J. Biol. Chem. 193, 265-275
- 19 Starkey, P.M., and Barrett, A.J., (1976), Biochem. J. 155, 273-278
- 20 Nakajima, K., Powers, J.C., Ashe, B.M., and Zimmerman, M. (1979), J. Biol. Chem. 254, 4027-4032
- 21 Kerckaert, J.P. (1978), Anal. Biochem. 84, 354-360
- 22 Davis, B.J. (1964), Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427
- 23 Laemmli, U.K. (1970), Nature 227, 680-685
- 24 Fish, W.W., and Björk, I. (1979) Eur. J. Biochem. 101, 31-38

COMPARISON OF THE INTERACTIONS OF HUMAN α_1 -ANTICHYMOTRYPSIN WITH HUMAN
LEUKOCYTE CATHEPSIN G AND BOVINE CHYMOTRYPSINANNE LAINE⁺, MONIQUE D'AVRIL⁺, ANNETTE HAYEM⁺
AND MARIE-HENRIETTE LOUCHEUX-LEFEVRE^{*}⁺Unité 16 INSERM, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France^{*}Unité 124 INSERM, 2, Place de Verdun, BP311, 59020 Lille Cédex, France

Received June 8, 1982

SUMMARY - The interactions of human α_1 -antichymotrypsin with human leukocyte cathepsin G and bovine chymotrypsin were investigated by means of circular dichroism spectroscopy and concurrent polyacrylamide gel electrophoresis. The mixtures were made in inhibitor excess at 0°C and studied at different times. Circular dichroism analyses indicated that within 10 min significant modifications had occurred in the aromatic environment of the components upon interaction. By SDS-polyacrylamide gel electrophoresis a complex having a M_r near 80,000 was observed in both mixtures. By both methods it was demonstrated that these complexes were not stable.

INTRODUCTION

Human α_1 Achy is a serum glycoprotein which is known to inhibit chymotrypsin and chymotrypsin-like enzymes such as leukocyte cathepsin G (1,2). Limited data were available concerning the formation of complexes between this inhibitor and the enzymes. Our previous work (3) dealt with the formation of complexes between human leukocyte cathepsin G and α_1 Achy and showed that production of a modified inhibitor occurred concurrently with the formation of a 1:1 complex of M_r equal to about 80,000. When α_1 Achy was allowed to react with bovine chymotrypsin in different molar ratios (4), a 1:1 complex and a modified inhibitor were also obtained.

CD spectroscopy is a direct method of observing the interaction between the components of an equilibrium mixture, without physical separation of the components such as electrophoresis which may perturb the equilibrium. CD spectra modifications have already been used to follow the minor conformational changes induced by the interaction of α_1 -protease inhibitor with bovine trypsin and chymotrypsin (5-7). Recently complex formation between chymotrypsin and rat α_1 inhibitor₃ (8) was shown to lead to a significant modification of the CD spectra in the near UV.

Abbreviations. α_1 Achy, α_1 antichymotrypsin; M_r , relative molecular mass; TLCK, N α -p-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; CD, circular dichroism; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; UV, ultraviolet.

Such a study was thought to be helpful in following the α_1 Achy interaction with human leukocyte cathepsin G or bovine α -chymotrypsin, since only protease inhibition measurement using a chromogenic substrate and analytical electrophoretic methods have been carried out in our other studies (3,4). In the present work the same enzyme-inhibitor mixtures (in inhibitor excess) were concurrently analyzed at different times by CD spectroscopy and electrophoretic methods.

MATERIALS AND METHODS

Human α_1 Achy was isolated and kept according to a procedure previously described (2). Its concentration (1.35 mg/ml i.e. 2.33×10^{-5} M) was measured by electroimmunodiffusion and with the method of Lowry et al. (9) as described in (3). Leukocyte cathepsin G (EC 3-4.21.20) was obtained in our laboratory from purulent sputum using the procedure described by Martodam et al. (10). Bovine α -chymotrypsin (TLCK-treated, type VII) was from Sigma. Both enzymes were dissolved in 0.01 M sodium phosphate buffer, 0.3 M NaCl, 0.2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (pH 7.5). The solutions were 2.18×10^{-5} M for cathepsin G and 2.9×10^{-5} M for bovine chymotrypsin.

Analytical electrophoreses were carried out on polyacrylamide slab gels using the technique described by Kerckaert (11). Alkaline-PAGE was performed on 10% polyacrylamide gels at pH 8.3 using the gel buffer system of Davis (12). SDS-PAGE was performed on a 5-30% gel gradient using the buffer system of Laemmli (13). Samples treatment before electrophoresis, protein precipitation and staining, M_r determination were carried out as previously described (3). M_r were estimated to be 58,000, 27,500 and 26,500 for α_1 Achy, leukocyte cathepsin G and bovine α -chymotrypsin respectively.

Chymotrypsin inhibitors were made visible in polyacrylamide gels using the slightly modified (2) method of Uriel and Berges (14).

The CD spectra were recorded using a Jobin-Yvon Mark III dichrograph in cells of 1 cm pathlength in the near UV (350 to 255 nm) and 0.01 cm in the far UV (260 to 200 nm) which were thermostated at 4°C.

The buffer baseline was recorded before and after the measurement of the corresponding solution and automatically subtracted. The ellipticity was expressed as mean residual molar ellipticity $[\theta]$ in degree. $\text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ taking 111, 112, 113 as mean residue weight for chymotrypsin, α_1 Achy and cathepsin G respectively. The so-called theoretical spectrum of the mixture corresponds to the sum of individual spectra of its components at the concentrations present in each reaction mixture.

Enzyme-inhibitor incubation mixtures were made at 0°C. The inhibitor-enzyme molar ratio was equal to 1.6 for the mixture of α_1 Achy and cathepsin G and to 1.36 for the mixture of α_1 Achy and α -chymotrypsin, but due to more inactive material in commercial chymotrypsin (20%) than in cathepsin G (less than 10%) we considered that the active components molar ratio was about the same in both cases.

CD spectra were recorded after 10 min, 19 h, 48 h and 6 days for both incubation mixtures. At every time an aliquot of these mixtures was immediately added with a hundred-fold molar excess of PMSF over enzyme initially present for electrophoretic studies to be carried out a few hours later.

RESULTS AND DISCUSSION

The near UV CD spectra of cathepsin G, chymotrypsin and α_1 Achy are presented in Fig. 1A and 1B. The spectrum of chymotrypsin is very similar to published spectra (5-7). Concerning the spectrum of cathepsin G, in accordance with Strickland (15) the positive band at 262 nm and the shoulder at 275 nm are assigned to Phe residues. The large negative band with its maximum at

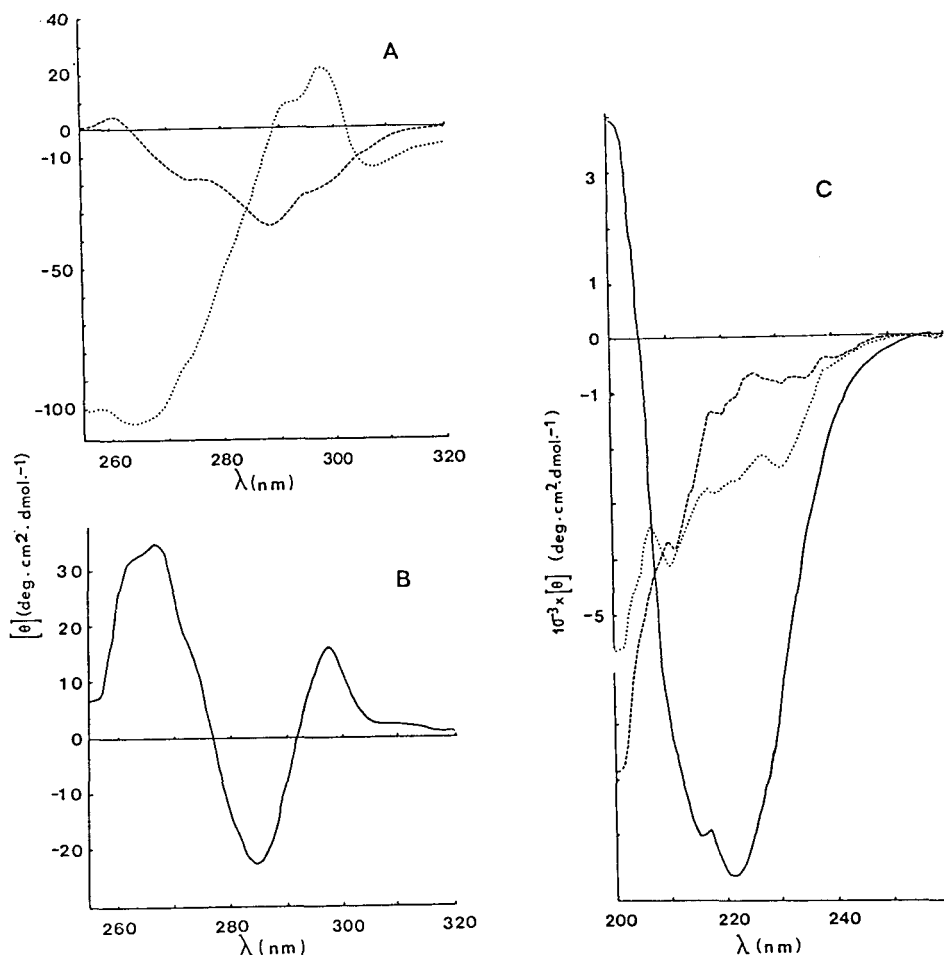


Figure 1 - CD spectra in 0.01 M sodium phosphate buffer, 0.3 M NaCl, 0.2 % NaN_3 (pH 7.5) of α_1 Achy (—), human cathepsin G (----) and bovine chymotrypsin (.....) in the near UV (A and B) and in the far UV (C).

290 nm contains unresolved contributions from Trp and Tyr and the shoulder at 297 nm is due to Trp. The spectrum of α_1 Achy exhibits three bands. The positive band at 298 nm is possibly due to the Trp residues, the negative one at 284 nm contains the contributions of Trp and Tyr. The positive band at 267 nm in addition to the shoulders at 262 and 272 nm correspond to the fine structure of Phe residues. The nullpoints are observed at 277 and 292 nm.

The far UV CD spectra of cathepsin G, chymotrypsin and α_1 Achy are shown in Fig. 1C. Cathepsin G and chymotrypsin secondary structures consist of β sheet, unordered structure and only a weak percentage of α helical form. On the contrary α_1 Achy has an appreciable α helical content in addition to unordered structure. The α_1 Achy spectrum shows a minimum at 220 nm ($[\theta] = 9,600 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) and a shoulder at 214 nm which might be due to the

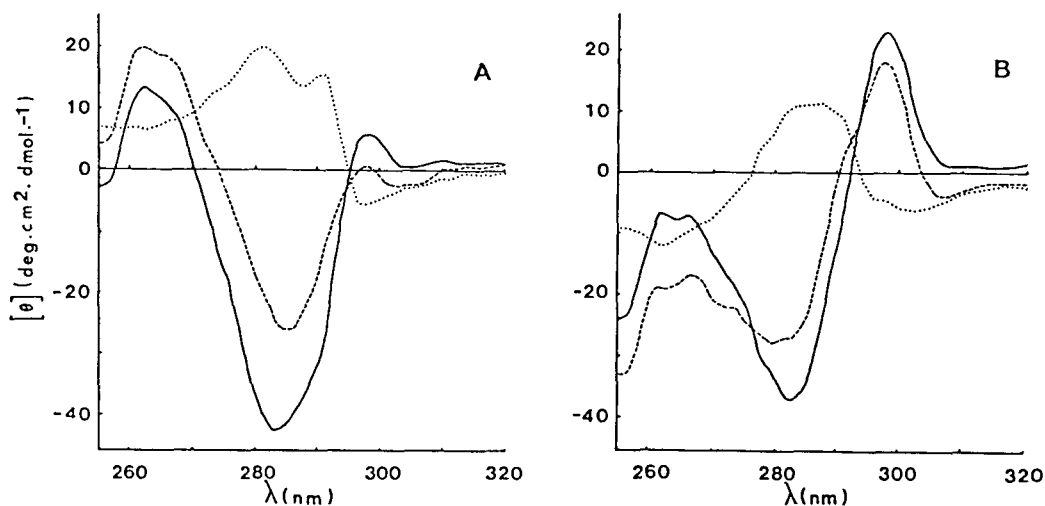


Figure 2 - Near UV spectra of the mixtures after 10 min incubation : (—) experimental spectrum ; (-----) theoretical spectrum ; (.....) difference spectrum. A : α_1 Achy-cathepsin G mixture ; B : α_1 Achy-chymotrypsin mixture.

presence of slightly deformed α helix. The contribution to CD from acetamido groups in the carbohydrate part can be neglected as previously shown (16).

Studies of the mixtures after 10 minutes incubation

CD spectra of the 10 min-mixtures, prepared as described under "Materials and Methods", are shown in Fig. 2. The experimental CD spectra differ significantly from the theoretical spectra in the near UV region and the difference spectrum between the calculated and the observed spectra has been drawn for each mixture. The differences are thus reflections of perturbations that have occurred upon interaction. Both difference spectra show one extremum at about 295 nm which is due to the disturbance of at least one Trp residue. Other extrema are observed around 285 nm and at 280 and 290 nm for the α_1 Achy-chymotrypsin and α_1 Achy-cathepsin G mixtures respectively. In both cases these bands are reflecting changes in the Trp and Tyr residues. The changes in the 270-255 nm region are more difficult to interpret ; indeed a perturbation arising from S-S bond can also be involved in this domain (14).

No marked change was observed in the far UV spectra of both mixtures, indicating the lack of modification in the secondary structure consecutive to the interaction.

In alkaline-PAGE, excess of active inhibitor is seen in the 10 min mixtures (Fig. 3A, slots 4 and 7). A new component having a β -mobility is shown in the α_1 Achy-chymotrypsin mixture (Fig. 3B, slot 7) : it is a complex since coexistence of α_1 Achy and chymotrypsin has been demonstrated in this component (more details will be given elsewhere (4)). No visible complex can be seen in these conditions in the α_1 Achy-cathepsin G mixture (3) (Fig. 3B,

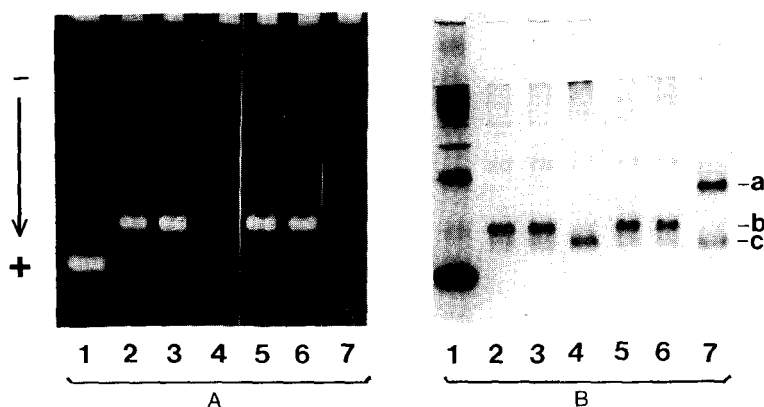


Figure 3 - Alkaline-PAGE. 1 : normal serum ; 2 and 5 : α_1 Achy ; 3 : α_1 Achy + inactivated cathepsin G ; 4: 10 min mixture of α_1 Achy and cathepsin G ; 6 : α_1 Achy + inactivated chymotrypsin ; 7 : 10 min mixture of α_1 Achy and chymotrypsin. A : visualization of chymotrypsin inhibitors. B : protein staining. a : α_1 Achy-chymotrypsin complex ; b : active α_1 Achy ; c : inactive α_1 Achy. Some α_1 Achy polymers are visible in slots 2, 3, 5 and 6 between the top of the gel and band b.

slot 4). Formation of a modified α_1 Achy (band c more acid than active α_1 Achy) is visualized in both cases and this modified form has no inhibitory activity (Fig. 3A and 3B, slots 4 and 7).

Free or complexed chymotrypsin is split when reduced, unlike cathepsin G (3), thus reduction before SDS-PAGE is avoided for chymotrypsin containing samples ; for valid comparison we do not reduce the α_1 Achy-cathepsin G

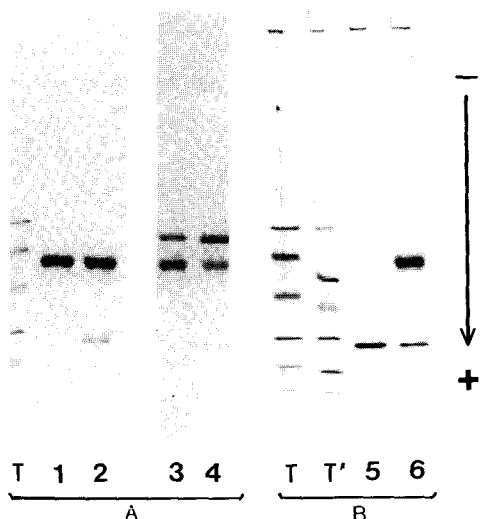


Figure 4 - SDS-PAGE. Only T, 1 and 2 were reduced before electrophoresis. T and T' : M_r markers : phosphorylase b (94,000), bovine albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100), α -lactalbumin (14,400). Slab A : 1 : α_1 Achy ; 2 : α_1 Achy + inactivated cathepsin G ; 3 : 10 min mixture of α_1 Achy and cathepsin G ; 4 : 10 min mixture of α_1 Achy and chymotrypsin. Slab B : 5 : chymotrypsin ; 6 : α_1 Achy + inactivated chymotrypsin.

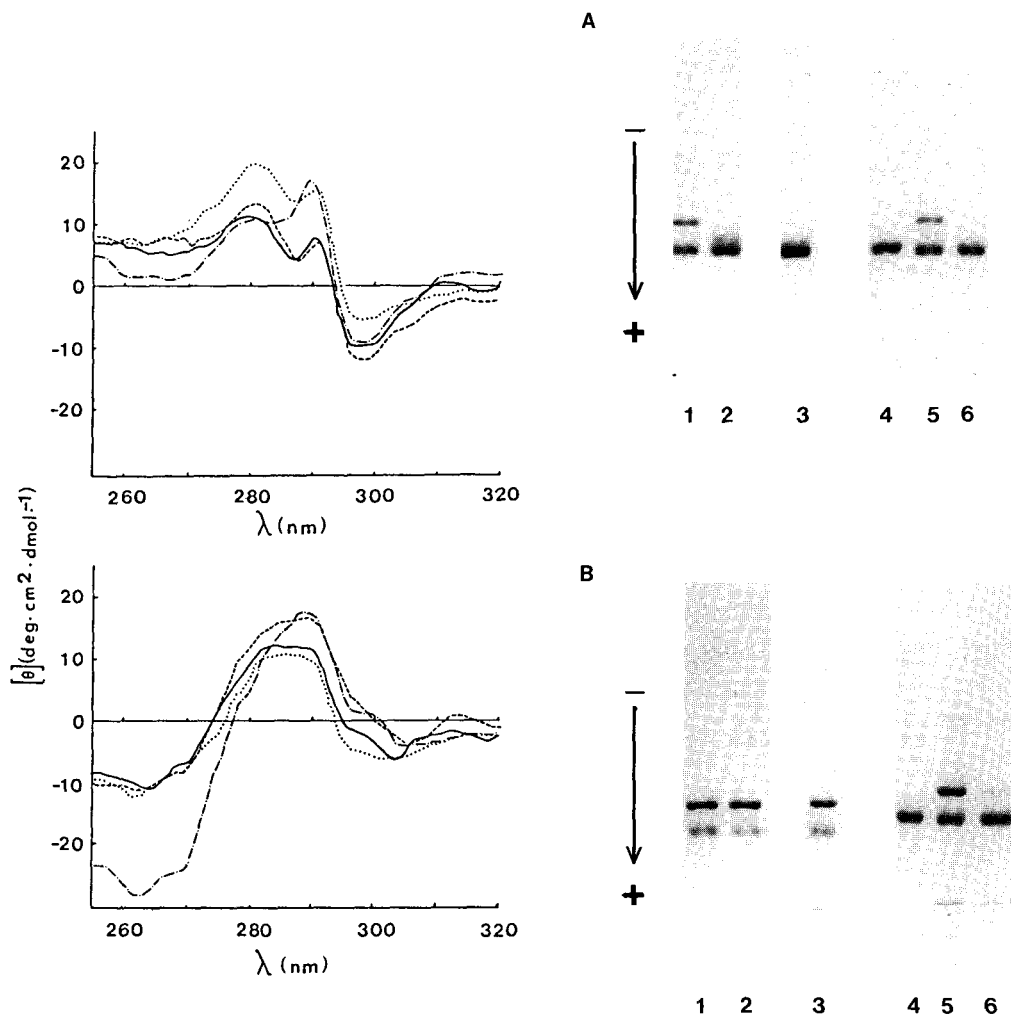


Figure 5 - Time-course studies of the incubation mixtures. The difference spectra were drawn after : (.....) 10 min ; (—) 19 h ; (----) 48 h ; (-.-.-) 6 days incubation. The mixtures were also analyzed by SDS-PAGE without prior reduction after : 10 min (1 and 5 ; 5 was used as control in the gel made for the time 6 days), 19 h (2), 48 h (3), 6 days (6). 4 : native α_1 Achy. A : α_1 Achy-cathepsin G mixture ; B : α_1 Achy-chymotrypsin mixture.

mixture either. Complex formation with both enzymes is seen in Fig. 4. The estimated M_r of α_1 Achy-cathepsin G complex and of α_1 Achy-chymotrypsin complex are respectively 80,000 and 79,000 instead of 85,500 and 84,500 as expected for 1:1 complexes. A diffuse band migrating as a component of M_r near 6,000 (not easily visible on the photograph) probably corresponds to the missing peptide (3,4). No free cathepsin G subsists (slot 3) and just a weak chymotrypsin band is seen (slot 4), it is probably due to inactive enzyme which is always significantly present in commercial preparations.

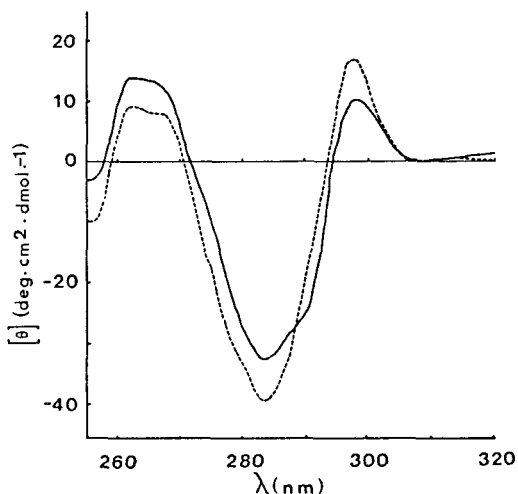


Figure 6 - Comparison of the experimental near UV spectra recorded after 19 h for the α_1 Achy-cathepsin G mixture (—) and after 6 days for the α_1 Achy-chymotrypsin mixture (-----).

Time-course studies of the mixtures

The mixtures kept at 0°C, were analyzed by CD spectroscopy and SDS-PAGE after 19 h, 48 h and 6 days. Only difference spectra, in the near UV, are presented in Fig. 5 for each time, with SDS-PAGE patterns. No evolving was observed in the far UV spectra of both mixtures.

Mixture with cathepsin G (Fig. 5A) - Difference CD spectra have slightly evolved between 10 min and 19 h but significant differences between theoretical and experimental spectra persist. Except in the range of 290 nm, a stationary state is observed as well after 19 h as 6 days indicating that no important modification has occurred in the aromatic environment of the components. However after 6 days a significant variation is observed at 290 nm in accordance with the modification of the environment of at least one Trp residue. In SDS-PAGE patterns, disappearance of the complex of $M_r = 80,000$ is observed after 19 h (slot 2) and a slower migrating component (of M_r near 67,000) is seen in addition to a band migrating just a bit faster than α_1 Achy. After 6 days (slot 6) we observe the same results as in our previous work (3) : modified inhibitor ($M_r = 55,000$) and the component of M_r near 6,000 (not easily visible) are only present. No free enzyme is detected either by SDS-PAGE or by activity measurement.

Mixture with chymotrypsin (Fig. 5B) - Difference CD spectra show no important modification between 10 min and 19 h. Between 48 h and 6 days some differences appear in the range 255-275 nm and the experimental spectrum gets farther from the theoretical spectrum. As shown in SDS-PAGE a noticeable decrease in complex amount occurs only after more than 48 h. Just a few

complex remains after 6 days (slot 6). The most important component migrates just a bit faster than native inhibitor ; in alkaline-PAGE and in electrophoresis on agarose plate at pH 8.6 (data not shown) it has the same behaviour as the modified inhibitor previously described (3).

Comparison of the results obtained with the two enzymes

Using SDS-PAGE it has been possible to show complex formation between α_1 Achy and both enzymes and to demonstrate that some spontaneous dissociation of these complexes occurs ; however α_1 Achy-chymotrypsin complex dissociates more slowly than α_1 Achy-cathepsin G complex.

Since in SDS-PAGE patterns the material observed in the 19 h α_1 Achy-cathepsin G mixture (Fig. 5A, slot 2) and in the 6 days α_1 Achy-chymotrypsin mixture (Fig. 5B, slot 6) consists mainly of modified inhibitor, it seems interesting to compare the experimental spectra of these mixtures. Similarities between the two spectra of Fig. 6 prove that the environments of the aromatic residues are alike in the two mixtures. It is, therefore, possible to think that the modified α_1 Achy molecule would be responsible for these similar spectra since the CD spectra of the two proteases, as shown in Fig. 1A, are very different.

In conclusion, it has been pointed out that some interactions occur between α_1 Achy and both enzymes leading to complexes ; furthermore these components evolve in time but do not go back to the initial state. CD spectroscopy results are in agreement with the results of electrophoretic studies. Therefore it appears that electrophoretic methods do not disturb the equilibrium and are properly usable in the study of interactions between proteases and antiproteases.

Acknowledgements - We would like to thank Mrs Michèle Lohez and Marie-Paule Ducourouble and Mr Claude Denis for their skillful technical assistance.

REFERENCES

1. Travis, J., Garner, D. and Bowen, J. (1978) *Biochemistry* 17, 5647-5651.
2. Laine, A. and Hayem, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 668, 429-438.
3. Laine, A., Davril, M. and Hayem, A. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 186-193.
4. Laine, A., Hayem, A. and Davril, M. manuscript in preparation.
5. Saklatvala, J., Wood, G.C. and White, D.D. (1976) *Biochem. J.* 157, 339-351.
6. Wood, G.C., White, D.D. and Saklatvala, J. (1976) *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.* 23, 129-132.
7. Bloom, J.W. and Hunter, M.J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 547-559.
8. Esnard, F., Gauthier, F. and Maurizot, J.C. (1981) *Biochimie* 63, 767-774.
9. Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
10. Martodam, R.R., Baugh, R.J., Twumasi, D.Y. and Liener, I.E. (1979) *Preparative Biochemistry* 9, 15-31.
11. Kerckaert, J.P. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 354-360.
12. Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
13. Laemmli, U.K. (1970) *Nature (Lond.)* 227, 680-685.
14. Uriel, J. and Berges, J. (1968) *Nature (Lond.)* 218, 578-580.
15. Strickland, E.H. (1974) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 2, 113-175.
16. Aubert, J.P. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 400-409.

III - 1 CHOIX ET PROPRIETES PRINCIPALES DES PROTEASES UTILISEES AU
COURS DE NOTRE ETUDE.

III - 1.1 Choix des protéases.

Parmi les différentes sérine-protéases qui peuvent être utilisées pour étudier les interactions avec l' α_1 Achy, les enzymes d'origine bovine ont l'avantage d'être commercialisés. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les enzymes d'origine bovine ont été largement utilisés dans les études d'interaction entre protéases et inhibiteurs sériques humains de sérine-protéases comme l' α_1 PI, l' α_2 M, l'AT et l'AP. Ce n'est pas l'intérêt physiologique qui justifie ces études, mais ces réactions servent souvent de modèles pour la détermination du mécanisme des réactions plus spécifiques de ces inhibiteurs avec les protéases d'origine humaine.

Nous avons choisi la chymotrypsine et la trypsine bovines ; seul le premier enzyme est inhibé par l' α_1 Achy, mais il nous a semblé intéressant d'étudier les modifications que subit l' α_1 Achy après l'action de la trypsine. Ces enzymes protéolytiques sont extraits en grande quantité à partir du pancréas de boeuf et sont commercialisés à l'état cristallisé.

Deux enzymes d'origine humaine, la cathepsine G et l'élastase, ont également été utilisés pour les études d'interaction. Ils sont préparés au laboratoire à partir de mucus bronchique purulent obtenu par expectoration de malades atteints de dilatation des bronches ou de mucoviscidose. Ces enzymes proviennent des leucocytes que l'on trouve en quantité importante dans ces sécrétions. L' α_1 Achy est donc susceptible d'entrer en contact "in vivo" avec ces protéases que ce soit dans le sérum, dans les sécrétions ou les tissus. Comme nous le verrons, l' α_1 Achy est capable d'inhiber la cathepsine G, alors qu'elle n'a aucune activité inhibitrice envers l'élastase.

Les interactions de l' α_1 Achy avec ces deux enzymes sont particulièrement intéressantes à étudier si l'on désire comprendre les mécanismes par lesquels un déséquilibre des couples protéases-antiprotéases au niveau bronchique et bronchoalvéolaire engendre des altérations du tissu pulmonaire (66).

III - 1.2 Propriétés principales des protéases choisies.

III - 1.2.1 α -Chymotrypsine bovine (E.C.3.4.21.1) (d'après BARRETT (9)).

Cet enzyme est produit par l'action de la trypsine sur un précurseur, le chymotrypsinogène. L' α -chymotrypsine est formée de 3 chaînes polypeptidiques reliées entre elles par 5 ponts disulfure (figure 15). La chymotrypsine migre, en SDS-PAGE, comme un constituant protéique de M_r égale à 26 000. Si avant d'être déposée en gel, la chymotrypsine est traitée par le β -mercaptoéthanol, les trois chaînes polypeptidiques sont dissociées ; la chymotrypsine apparaît alors sous la forme de deux bandes correspondant à des M_r de 15 000 et 12 000 environ, la troisième chaîne (chaîne A) qui est un peptide de 15 acides aminés sort du gel dans les conditions utilisées.

On connaît la séquence en acides aminés complète de cet enzyme et sa structure tridimensionnelle a été établie grâce à des études de diffraction des rayons X. La chymotrypsine a un point isoélectrique égal à 8,6 et un coefficient d'extinction très élevé : $E_{280\text{ nm}}^{1\%} = 20,8$ (216). La chymotrypsine coupe préférentiellement les liaisons peptidiques impliquant le groupement carboxylique d'un acide aminé aromatique ou de la leucine (Tableau V). Un substrat spécifique souvent utilisé est le Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA* (51).

III - 1.2.2 Cathepsine G leucocytaire humaine (E.C. 3.4.21.20)

L'existence d'une protéase de type chymotrypsique dans les leucocytes neutrophiles humains est établie dès 1974 (67, 167, 175).

En 1976, STARKEY et BARRETT (192) isolent un enzyme de type chymotrypsique à partir de la rate humaine et montrent qu'il est identique à l'enzyme de type chymotrypsique caractérisé dans les neutrophiles. Cet enzyme présente un certain nombre de caractéristiques différentes de celles de la chymotrypsine et est individualisé sous le nom de cathepsine G. La cathepsine G est un constituant des granules azurophiles des leucocytes neutrophiles humains et c'est une des protéines majeures de ces organelles.

* Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA : N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-prolyl-L-phenylalanyl-p-nitroanilide.

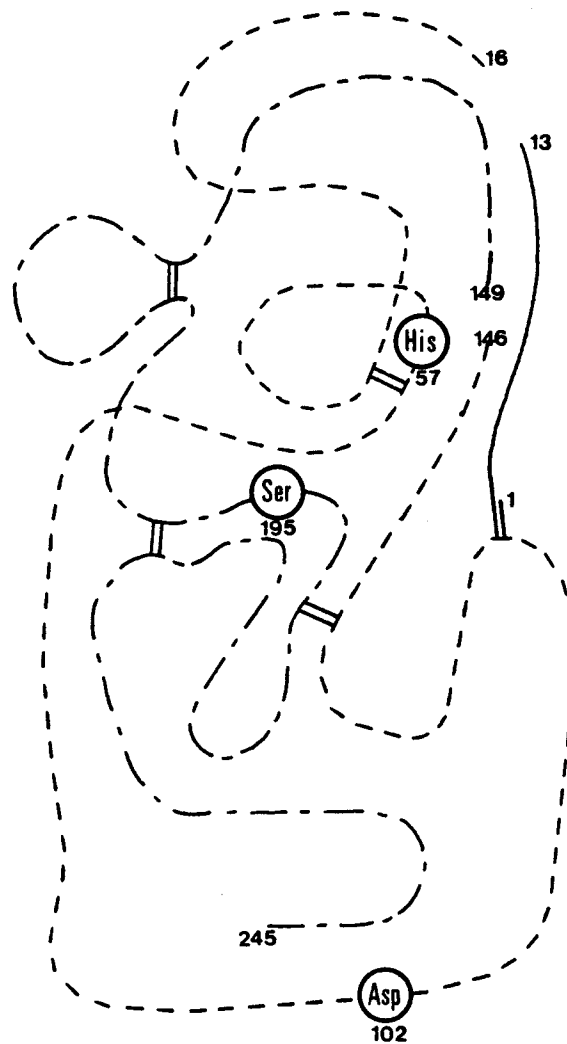


Figure 15 : Représentation schématique de l' α -chymotrypsine bovine mettant en évidence les 3 chaînes polypeptidiques qui la composent (d'après BERNHARD, S.A. Structure et fonction des enzymes. Ediscience 1969, p : 278).

chaîne A ——— résidus 1 à 13

chaîne B ----- résidus 16 à 146

chaîne C - - - - - résidus 149 à 245

== pont disulfure

Les acides aminés His, Asp, Ser (en positions 57, 102 et 195 respectivement) sont les éléments du site actif de la chymotrypsine.

TABLEAU V

Spécificités des enzymes utilisés dans notre étude.

Chymotrypsine bovine : agit essentiellement sur les liaisons :

Tyr - X

Phe - X

Trp - X

Leu - X

Cathepsine G leucocytaire humaine : agit essentiellement sur les liaisons :

Tyr - X

Phe - X

Leu - X

Ile - X

Met - X

Trypsine bovine : a une activité limitée aux liaisons :

Lys - X

Arg - X

Elastase leucocytaire humaine : agit essentiellement sur les liaisons :

Val - X

et Ala - X

Met - X mais moins rapidement.

La purification de la cathepsine G est effectuée au laboratoire à partir du mucus bronchique purulent en appliquant le protocole décrit par MARTODAM et coll (128) et présenté dans le tableau VI. La cathepsine G est séparée de l'élastase par chromatographie sur colonne de carboxyméthyl cellulose en utilisant un gradient de force ionique croissante ; l'élastase est éluée la première.

La cathepsine G n'est que très faiblement glycosylée (201). Elle possède un pourcentage de résidus d'arginine élevé (15 %). Elle est très basique : son point isoélectrique se situe aux environs de pH 10,0. En électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH acide, elle a donc une mobilité très cathodique et migre plus rapidement que le lysozyme de blanc d'oeuf de poule. En SDS-PAGE (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide), la cathepsine G donne 4 bandes qui correspondent à 4 isoenzymes. La M_r de l'isoenzyme majeur est estimée à 27 500. La molécule est constituée d'une seule chaîne polypeptidique et contient 3 ponts disulfure intrachaines. Des valeurs différentes du coefficient d'extinction ($E_{280\text{ nm}}^{1\%}$) ont été données par plusieurs auteurs : il est égal à 6,64 selon TRAVIS et coll (201) et à 10,0 selon STARKEY et BARRETT (192). La cathepsine G est une protéase relativement peu spécifique (tableau V p. 87). Les substrats synthétiques de cet enzyme sont rarement solubles à des concentrations excédant le K_m à cause de la présence des résidus hydrophobes qui sont les sites potentiels de coupure par l'enzyme. NAKAJIMA et coll (144) ont étudié l'action de la cathepsine G sur une série de peptides nitroanilides bloqués. Mais le substrat synthétique le plus souvent utilisé est le Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA, substrat utilisé pour la chymotrypsine (voir p. 85).

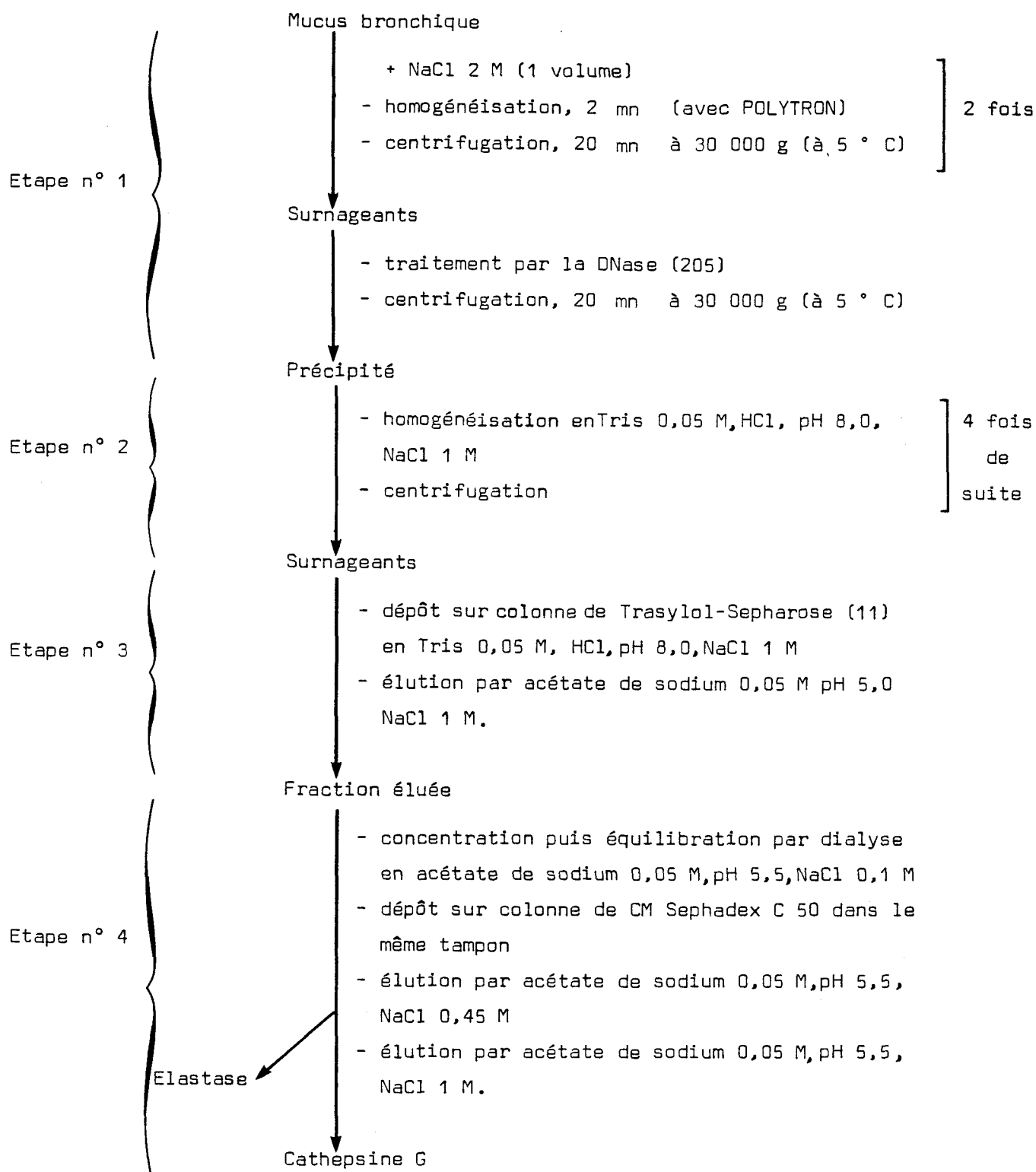
La cathepsine G peut hydrolyser de nombreux constituants comme les protéoglycannes de cartilage et le collagène natif de tendon ou de cartilage (193). L'activité élastolytique de la cathepsine G est restée longtemps méconnue ; c'est en 1980 que REILLY et TRAVIS (166) ont montré que la cathepsine G est capable de dégrader l'élastine, mais beaucoup plus lentement que ne le fait l'élastase leucocytaire. Cette propriété est très importante, car il a été suggéré qu'un résidu de phénylalanine, site potentiel de coupure par la cathepsine G, est localisé près des desmosines qui forment les liaisons croisées de l'élastine (63). La dégradation de l'élastine pourrait donc être initiée par l'action de la cathepsine G.

Plus récemment, BOUDIER et coll (30) ont montré que bien qu'elle n'ait qu'une faible activité élastolytique, la cathepsine G joue un rôle important dans la dégradation de l'élastine, puisqu'elle accroît fortement la solubili-

TABLEAU VI

Protocole de purification de l'élastase et de la
cathepsine G à partir du mucus bronchique.

(128)



sation de l'élastine pulmonaire catalysée par l'élastase : un mélange équimoléculaire d'élastase et de cathepsine G, rapport observé dans les leucocytes humains présente une activité 5 à 6 fois supérieure à celle de l'élastase seule en même quantité. Selon ces auteurs, on peut donc également attribuer à la cathepsine G un rôle dans le développement de l'emphysème pulmonaire, en action avec l'élastase.

III - 1.2.3. Trypsine bovine (E.C. 3.4.21.4) (d'après BARRETT (8)).

Cet enzyme est sécrété par les acini pancréatiques sous forme d'un zymogène, le trypsinogène. L'activation s'effectue dans l'intestin grâce à l'entérokinase, enzyme lui-même sécrété par la muqueuse intestinale sous forme de pro-entérokinase qui est ensuite activée. L'amorçage du processus d'activation du trypsinogène par l'entérokinase est relativement lent, mais la trypsine elle-même est un puissant activateur du trypsinogène et poursuit alors cette activation très rapidement. La β -trypsine est la forme majeure. Elle est constituée par une seule chaîne polypeptidique possédant 6 ponts disulfure intrachaines. La trypsine migre en SDS-PAGE comme un constituant protéique de M_r égale à 24 000. On connaît la séquence complète en acides aminés de cet enzyme ainsi que sa structure tridimensionnelle. Le point isoélectrique de la trypsine est égal à 10,8 et le coefficient d'extinction $E_{280\text{ nm}}^{1\%}$ est égal à 15,4.

La trypsine coupe sélectivement les liaisons lysyl et arginyl dans une chaîne polypeptidique (tableau V p.87) à l'exception des liaisons Lys-Pro et Arg-Pro. Notons que certains esters ou certains amides de substrats synthétiques peuvent être hydrolysés : ainsi le N-acétyl-DL-phénylalanine- β -naphtyl ester utilisé dans la méthode de révélation des inhibiteurs de chymotrypsine de URIEL et BERGES (206).

III - 1.2.4 Elastase leucocytaire humaine (E.C.3.4.21.37) (d'après BARRETT (10))

JANOFF et SCHERER (88) ont été à l'origine de l'intérêt porté à cet enzyme : ils ont identifié l'élastase et montré qu'elle est capable de jouer un rôle dans un grand nombre d'affections y compris l'emphysème pulmonaire.

L'élastase leucocytaire est comme la cathepsine G l'une des protéines majeures des granules azurophiles des neutrophiles humains. Elle est préparée au laboratoire conjointement avec la cathepsine G à partir du mucus bronchique

purulent (tableau VI p. 89). Trois ou quatre formes majeures d'élastase ont pu être individualisées que ce soit en isoélectrofocalisation ou en électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH acide (10). L'élastase est un constituant basique dont le pI se situe entre 8,75 et 9,15. Aucune différence d'activité catalytique n'a pu être démontrée entre les différents isoenzymes. Contrairement à l'élastase pancréatique qui est une holoprotéine, l'élastase leucocytaire est une glycoprotéine : le pourcentage de glucides combinés s'élève à 22 % selon BAUGH et TRAVIS (11), alors que selon OHLSSON et OLSSON (149), les trois élastases qu'ils ont isolées possèdent respectivement des pourcentages en glucides combinés de 6,6 %, 8,3 % et 3,2 %. La préparation d'élastase que nous avons utilisée contient environ 5 % de sucres.

En SDS-PAGE, nous avons estimé à 29 000 la M_r de l'isoenzyme majeur d'élastase. Ceci est en accord avec les résultats de BAUGH et TRAVIS (11). Le coefficient d'extinction de l'élastase $E_{280\text{ nm}}^{1\%}$ est égal à 9,85.

L'élastase leucocytaire est formée d'une seule chaîne polypeptidique. Contrairement à ce qui a été décrit pour l'élastase pancréatique porcine qui est obtenue après activation d'une proélastase, aucun proenzyme de l'élastase leucocytaire n'a été décrit jusqu'à présent. L'élastase coupe préférentiellement les liaisons Val-X et peut couper également les liaisons Ala-X, mais moins facilement (tableau V). Le Boc-Ala-NP* est un substrat qui permet un dosage spectrophotométrique avec une grande sensibilité, mais il n'est pas spécifique et ne peut donc être utilisé que pour l'élastase leucocytaire purifiée. Le substrat Suc-(Ala)₃-NA** (19) est plus spécifique, mais la réaction avec l'élastase leucocytaire est plus lente qu'avec l'élastase pancréatique. L'activité de l'élastase leucocytaire est considérablement influencée par la force ionique (29) : plus la force ionique est élevée, plus l'élastase leucocytaire hydrolyse rapidement le substrat Suc-(Ala)₃-NA**. C'est ainsi qu'en présence de NaCl 5 M, l'activité est augmentée de 20 fois par rapport à l'activité observée en l'absence de NaCl ; on peut dans ces conditions doser avec précision des concentrations d'élastase de l'ordre de 35 ng/ml. La force ionique du milieu réactionnel a également un effet important sur la solubilisation de l'élastine par l'élastase leucocytaire. En présence d'une concentration en NaCl inférieure à 0,2 M, l'élastase leucocytaire n'a pas d'action sur l'élastine. Par contre l'action est maximale en présence de NaCl 0,75 M, puis diminue avec des concentrations plus

* Boc-Ala-NP : : t-butoxycarbonyl-L-alanine-p-nitrophenyl ester

** Suc-(Ala)₃-NA : Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanyl-p-nitroanilide

élevées. Ceci distingue nettement l'élastase leucocytaire de l'élastase pancréatique dont l'activité sur l'élastine est progressivement inhibée lorsque la molarité en NaCl augmente de 0 à 1 M (29). L'élastase leucocytaire est également capable de dégrader les protéoglycannes de cartilage bovin et la fibrine.

III - 2 APPROCHE TECHNOLOGIQUE DES PHENOMENES D'INTERACTION. APPORT ET LIMITES DES DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES.

L'étude de la réaction d'un inhibiteur avec un enzyme peut être abordée d'une part en suivant la variation de l'activité enzymatique, d'autre part en suivant aussi bien le devenir des deux antagonistes que celui du complexe enzyme-inhibiteur qui a pu se former : il s'agit d'une interaction entre des macromolécules qui peuvent être visualisées par coloration après séparation par différentes techniques.

Nous allons faire un inventaire rapide des techniques utilisées en insistant sur les renseignements qu'elles permettent d'obtenir et sur leurs limites.

III - 2.1 Dosage spectrophotométrique de l'activité enzymatique.

On dose souvent l'activité estérasique des enzymes. Les protocoles utilisés sont indiqués dans la partie technique (p. T 16). Ce dosage a l'avantage d'être rapide et de nécessiter des concentrations protéiques 10 à 100 fois inférieures à celles qui doivent être utilisées en SDS-PAGE par exemple. Ce dosage est indispensable pour déterminer le rapport molaire inhibiteur/enzyme pour lequel l'inhibition totale de l'enzyme est obtenue, mais cette technique présente l'inconvénient de ne donner aucune information sur les transformations que peut avoir subies l'enzyme ou l'inhibiteur.

III - 2.2 Révélation de l'activité inhibitrice et révélation de l'activité estérasique après séparation électrophorétique.

La révélation de l'activité inhibitrice ou de l'activité estérasique après séparation électrophorétique des constituants permet de déterminer

à quel constituant peut être attribuée une activité décelée auparavant dans le mélange par le dosage spectrophotométrique. Le protocole de ces révélations spécifiques est indiqué page T 13. Ces techniques de révélation présentent toutefois un inconvénient : elles nécessitent un temps assez long pour leur mise en oeuvre et l'interprétation des résultats peut, de ce fait, être plus délicate.

III - 2.3 Méthodes faisant intervenir la précipitation antigène - anticorps.

Les techniques que nous avons utilisées sont essentiellement l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle et l'électroimmunodiffusion appliquées à l'étude de l'inhibiteur : nous avons utilisé deux immunsérums commerciaux spécifiques de l' α_1 Achy (Laboratoires BEHRING et DAKO). Ces techniques permettent de déterminer en particulier si les sites antigéniques de l' α_1 Achy sont encore accessibles aux anticorps pendant la réaction inhibiteur-enzyme. Comme l'a montré WEEKE (214), l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle peut être utilisée pour des mesures semi-quantitatives et permet donc de juger à la fois des modifications qualitatives et quantitatives. Sur un même échantillon, on peut effectuer en double l'électrophorèse de la première dimension. Sur une des deux bandes de gel, on révèle l'activité estérasique ou l'activité inhibitrice, ce qui permettra de repérer sur l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle effectuée avec la deuxième bande, le constituant qui présente l'activité décelée. Ceci n'est applicable néanmoins qu'à un échantillon contenant un nombre limité de constituants.

Un immunsérum spécifique de la cathepsine G leucocytaire humaine a été préparé au laboratoire : avant d'être injecté, l'enzyme est inactivé par le PMSF* pour éviter une réaction inflammatoire du Lapin. Mais l'emploi de cet immunsérum en immunoélectrophorèse bidimensionnelle ou en électroimmunodiffusion pose un certain nombre de problèmes liés en particulier à la précipitation de la cathepsine G dans le tampon généralement utilisé pour le gel d'agarose. Nous espérons pouvoir à l'avenir surmonter ces problèmes. En ce qui concerne la chymotrypsine, il n'existe pas à notre connaissance d'immunsérum commercialisé spécifique de cet enzyme.

III - 2.4 Modifications des propriétés physico-chimiques de l'inhibiteur et des enzymes.

Nous avons cherché à mettre en évidence les modifications de charge, de point isoélectrique, de masse moléculaire relative et les changements des

* Le PMSF est un inhibiteur irréversible des sérine protéases.

propriétés optiques des constituants au cours de leur interaction.

L'étude en électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide) à pH 8,3 ou en gel d'agarose à pH 8,6 permet de mettre en évidence un éventuel changement de charge des molécules se traduisant par une modification de la migration électrophorétique.

L'isoélectrofocalisation permet de déterminer très précisément les pI des constituants présents dans les mélanges. Une deuxième migration dans un gel contenant des anticorps peut permettre une identification des constituants. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et en gradient d'acrylamide (5 à 30 %) permet de déterminer les valeurs des M_r des constituants et de suivre les modifications de ces valeurs lors de la réaction inhibiteur-enzyme. La comparaison d'échantillons traités ou non par le β -mercaptoéthanol donnera des indications supplémentaires concernant l'existence éventuelle de ponts disulfure interchaînes. Sur ce type de gel et pour l'inhibiteur étudié, il n'est plus possible de mettre en évidence une activité inhibitrice, car elle est détruite en présence de SDS (voir p.79)

Les propriétés optiques des molécules sont étroitement reliées à leur structure. Les variations des spectres dichroïques reflètent des modifications dans l'environnement des groupes absorbants et en particulier dans l'environnement des acides aminés aromatiques qui peuvent intervenir lors des interactions inhibiteur-enzyme. L'étude en dichroïsme circulaire ne provoque aucune perturbation de l'échantillon lors de son analyse ce qui représente un avantage sur les analyses électrophorétiques au cours desquelles l'équilibre du mélange réactionnel risque d'être perturbé et où les liaisons faibles entre les constituants peuvent être détruites. Les analyses électrophorétiques constituent néanmoins des méthodes d'étude très largement utilisées.

III - 3 DEFINITION DES CONDITIONS OPERATOIRES CHOISIES POUR LES ETUDES DES INTERACTIONS DE L' α_1 ANTICHYMOTRYPSINE AVEC LES ENZYMES.

Les phénomènes d'interaction sont étudiés en mélangeant des solutions d' α_1 Achy et d'enzyme dans des proportions précises. Nous allons donc décrire les déterminations des concentrations des solutions ainsi que les conditions opératoires qui seront adoptées pour chaque système α_1 Achy-enzyme étudié.

III - 3.1 Tampon utilisé.

L' α_1 Achy est en solution dans le PBS : tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,3 M, NaN_3 0,02 % pH 7,4. Les enzymes sont mis en solution dans ce même tampon juste avant les expériences.

III - 3.2 Détermination des concentrations des solutions d'inhibiteur et d'enzyme.

Cette détermination est effectuée en employant au minimum deux techniques de dosage différentes.

III - 3.2.1 Détermination de la concentration de la solution d' α_1 -antichymotrypsine.

- Dosage par électro-immunodiffusion (p : T 12).

L' α_1 Achy purifiée est dosée en électro-immunodiffusion avec l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy (BEHRING) par rapport à une gamme préparée par des dilutions d'un plasma standard (BEHRING).

- Dosage de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY et coll (126).

La partie protéique représentant 75 % de la molécule, la valeur obtenue lors de ce dosage est multipliée par 1,33.

- Dosage spectrophotométrique.

Le spectre d'absorption de la solution d' α_1 Achy est tracé entre 360 nm et 230 nm. On soustrait la valeur de l'absorbance à 350 nm de celle qui est mesurée à 280 nm, afin d'éviter une erreur due à la turbidité éventuelle de la solution. La concentration de la solution d' α_1 Achy est alors mesurée en utilisant le coefficient d'extinction $E_{280 \text{ nm}}^{1\%}$ égal à 6,2 indiqué par TRAVIS et coll (202).

Les valeurs de concentration des solutions d' α_1 Achy obtenues par les trois méthodes présentent des écarts d'environ 15 %.

III - 3.2.2 Détermination de la concentration de la solution d'enzyme.

- Dosage de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY et coll (126).

La chymotrypsine et la trypsine bovines sont des holoprotéines, le chiffre obtenu n'est donc pas à corriger. Etant donné que le pourcentage de sucres présents dans nos préparations de cathepsine G et d'élastase leucocytaire est faible (respectivement 1 % et 5 %), nous n'avons pas jugé nécessaire de corriger les valeurs de concentrations obtenues.

- Dosage spectrophotométrique.

Les spectres d'absorption des solutions enzymatiques sont tracés. Le coefficient d'extinction de chacun des enzymes est connu : il est de 20,5 pour la chymotrypsine bovine (216), 15,8 pour la trypsine bovine (212) et 9,85 pour l'élastase leucocytaire (11). Pour le dosage de la cathepsine G, nous préférons utiliser le coefficient d'extinction indiqué par STARKEY et BARRETT (192) ($E_{280 \text{ nm}}^{1\%} = 10,0$) plutôt que celui publié par TRAVIS et coll (201) ; en effet, le premier donne des valeurs de concentration plus proches de celles obtenues par la méthode de LOWRY et coll (126).

III - 3.3 Mélange de contrôle : α_1 -antichymotrypsine - enzyme inactivé.

Lors de chaque série d'expériences, un mélange de contrôle est préparé de la façon suivante : une partie aliquote de la solution d'enzyme est inactivée en ajoutant dans un excès molaire de 100 fois un inhibiteur irréversible des sérine protéases, le PMSF, préalablement solubilisé dans l'isopropanol pour constituer une solution 100 mM ; après un minimum de 10 minutes d'action du PMSF à température ambiante, l'enzyme inactivé est ajouté à de l' α_1 Achy de façon à obtenir un rapport inhibiteur/enzyme égal à celui qui sera utilisé avec l'enzyme actif lors de l'étude. Ce mélange de contrôle permet de déterminer s'il y a entre l'inhibiteur et l'enzyme des interactions autres que celles qui sont dues à l'activité de l'enzyme. Les différences observées entre le mélange de contrôle et les mélanges préparés avec l'enzyme actif peuvent alors être attribuées à l'activité de l'enzyme.

III - 3.4 Arrêt de la réaction.

Dès les premiers essais d'interaction entre l' α_1 Achy et la chymotrypsine ou la cathepsine G, nous nous sommes rendue compte qu'il fallait inactiver l'excès d'enzyme ou l'enzyme qui aurait pu se dissocier du complexe sous forme active, pour ne pas risquer de dégradations ultérieures. Porter le mélange à ébullition pendant 3 minutes, placer le mélange dans un bain de glace sont deux procédés couramment utilisés pour arrêter une réaction enzymatique ; ils n'ont pas donné de résultats très reproductibles. Nous avons donc essayé puis adopté un traitement par le PMSF. Cet inhibiteur (100 mM dans l'isopropanol) est ajouté en excès molaire de 100 fois par rapport à la quantité initiale d'enzyme dans le mélange. Le volume d'isopropanol à ajouter dans les mélanges contenant généralement une molarité en enzyme de $2 \text{ à } 20 \times 10^{-6} \text{ M}$ n'excède pas 2 % du volume total et ne risque pas de provoquer de phénomène de précipitation.

Nous avons pu cependant constater, et cela avait d'ailleurs été signalé par JAMES (86), que le PMSF en solution aqueuse devient assez vite inactif. JAMES a montré qu'après dilution en tampon Hepes* de pH 7,5, la perte de l'activité du PMSF envers la chymotrypsine (rapport inhibiteur/enzyme = 5/1) est totale en l'espace de 2 h 30 ; elle serait due à l'action des ions hydroxyle de l'eau. L'addition de PMSF à une sérine-protéase déjà en solution dans un tel tampon permet l'inhibition de cet enzyme, mais si de l'enzyme continue à se libérer, progressivement dans le milieu à partir d'un complexe par exemple, le PMSF n'aura peu à peu plus d'action sur l'enzyme.

III - 3.5 Température choisie pour l'incubation.

Il nous avait d'abord semblé souhaitable de ralentir la vitesse de la réaction de l' α_1 Achy avec les enzymes en effectuant l'incubation des mélanges à 0°C. Par la suite, pour éviter que les mélanges ne subissent un écart de température trop important entre l'incubation et l'étude, nous avons effectué d'autres expériences à la température du laboratoire (25° C).

L'action des enzymes qui ne sont pas inhibés par l' α_1 Achy a de plus été testée à 37°, température du corps humain, qui est également couramment utilisée pour une hydrolyse enzymatique.

* Hepes : acide [(hydroxy-2-éthyl) - 4 - pipérazinyl - 1] - 2 - éthane sulfonique

III - 3.6 Dispositions générales.

Toutes les expériences ont été répétées plusieurs fois. Nous avons donc été amenée à utiliser différentes préparations d' α_1 Achy purifiée ayant donc des concentrations variables. Deux préparations différentes de cathepsine G purifiée ont été employées ; une importante variation de l'activité spécifique de l'enzyme entre ces deux préparations a été observée et nous y reviendrons. L'activité spécifique de la chymotrypsine ou de la cathepsine G est vérifiée un grand nombre de fois au cours des expériences pour déceler une éventuelle dégradation de l'enzyme avec le temps.

Lorsque des études analytiques en électrophorèse sont effectuées sur une série d'échantillons, le volume des dépôts utilisé est tel que nous avons dans chaque dépôt la même quantité initiale d' α_1 Achy.

L'activité enzymatique résiduelle d'un mélange inhibiteur-enzyme est exprimée en pourcentage de l'activité d'une solution du même enzyme pur à la même concentration.

III - 4 REACTION AVEC LA CHYMOTRYPSINE BOVINE.

Après avoir déterminé la proportion d'enzyme actif dans la préparation que nous utilisons, nous établissons la courbe d'inhibition de la chymotrypsine par l' α_1 Achy. La réaction inhibiteur-enzyme est ensuite abordée en étudiant des mélanges d'inhibiteur et d'enzyme en rapports molaires différents, puis en suivant dans le temps un mélange dans lequel l'inhibiteur est en excès.

Nous utilisons la chymotrypsine de type VII de SIGMA (49 unités/mg), traitée par la TLCK.

III - 4.1 Titration des sites actifs de la chymotrypsine.

Cette titration est effectuée en utilisant la méthode de KEZDY et KAISER (107) avec une solution de chymotrypsine à 10 mg/ml en tampon acétate de sodium 0,02 M de pH 4,2. Le substrat est le p-nitro phényl acétate (SIGMA), dissous dans l'acétonitrile. La réaction est effectuée en tampon phosphate de sodium 0,067 M de pH 7,8. Les résultats obtenus indiquent que la chymotrypsine contient 70 % d'enzyme actif, pourcentage généralement trouvé pour un enzyme commercial de ce type.



III - 4.2 Courbe d'inhibition de la chymotrypsine par l' α_1 -antichymotrypsine

Le but de cette expérience est de déterminer si la courbe d'inhibition est linéaire. Elle permet de définir le rapport molaire inhibiteur/enzyme pour lequel l'inhibition totale de la chymotrypsine est obtenue. Nous calculons donc ici les rapports molaires en prenant en compte uniquement la quantité de matériel actif : la solution de chymotrypsine contient en fait 70 % d'enzyme actif, la solution d' α_1 Achy contient environ 85 % d'inhibiteur actif, ce pourcentage est déterminé en mesurant le rapport de l'intensité des bandes d'inhibiteur actif et d'inhibiteur inactif séparés en électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 8,3.

Des quantités croissantes d' α_1 Achy sont ajoutées à une quantité constante de chymotrypsine ($7,4 \times 10^{-7}$ M en enzyme actif dans les mélanges). Une incubation préalable en PBS (pH 7,4) est effectuée à 25° C pendant 5 minutes. L'activité chymotrypsique résiduelle est mesurée par dosage spectrophotométrique (page T 16) après dilution au 1 : 100. L'activité résiduelle est exprimée en pourcentage de l'activité mesurée sur une solution témoin de chymotrypsine. La courbe obtenue est présentée figure 16. Elle est linéaire jusqu'à environ 25 % d'activité résiduelle. L'extrapolation de cette partie linéaire donne une activité nulle pour un rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 1,45/1. On peut observer de plus qu'il reste une faible activité enzymatique résiduelle même lorsque le rapport inhibiteur/enzyme est supérieur à 2. Puisque nous avons tenu compte des quantités de matériel actif, d'après les déterminations indiquées auparavant, nous aurions dû aboutir, pour une réaction stoechiométrique, à un rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 1/1. Il se peut que nous ayons sous-estimé la proportion d' α_1 Achy inactive, la différence de migration électrophorétique, à pH 8,3 entre la forme active et la forme inactive n'étant peut-être pas un critère absolu. En fait, nous verrons dans la suite de notre travail que ces résultats peuvent être expliqués par un autre phénomène.

III - 4.3 Etude de l'inhibition à 0° C de la chymotrypsine par l' α_1 -antichymotrypsine.

L'étude va être essentiellement suivie par électrophorèse. Puisque par cette technique nous visualisons tout le matériel protéique (actif ou inactif) présent dans les mélanges, nous exprimons dans cette série d'expériences comme dans celles qui suivront les rapports molaires en tenant compte du contenu protéique total.

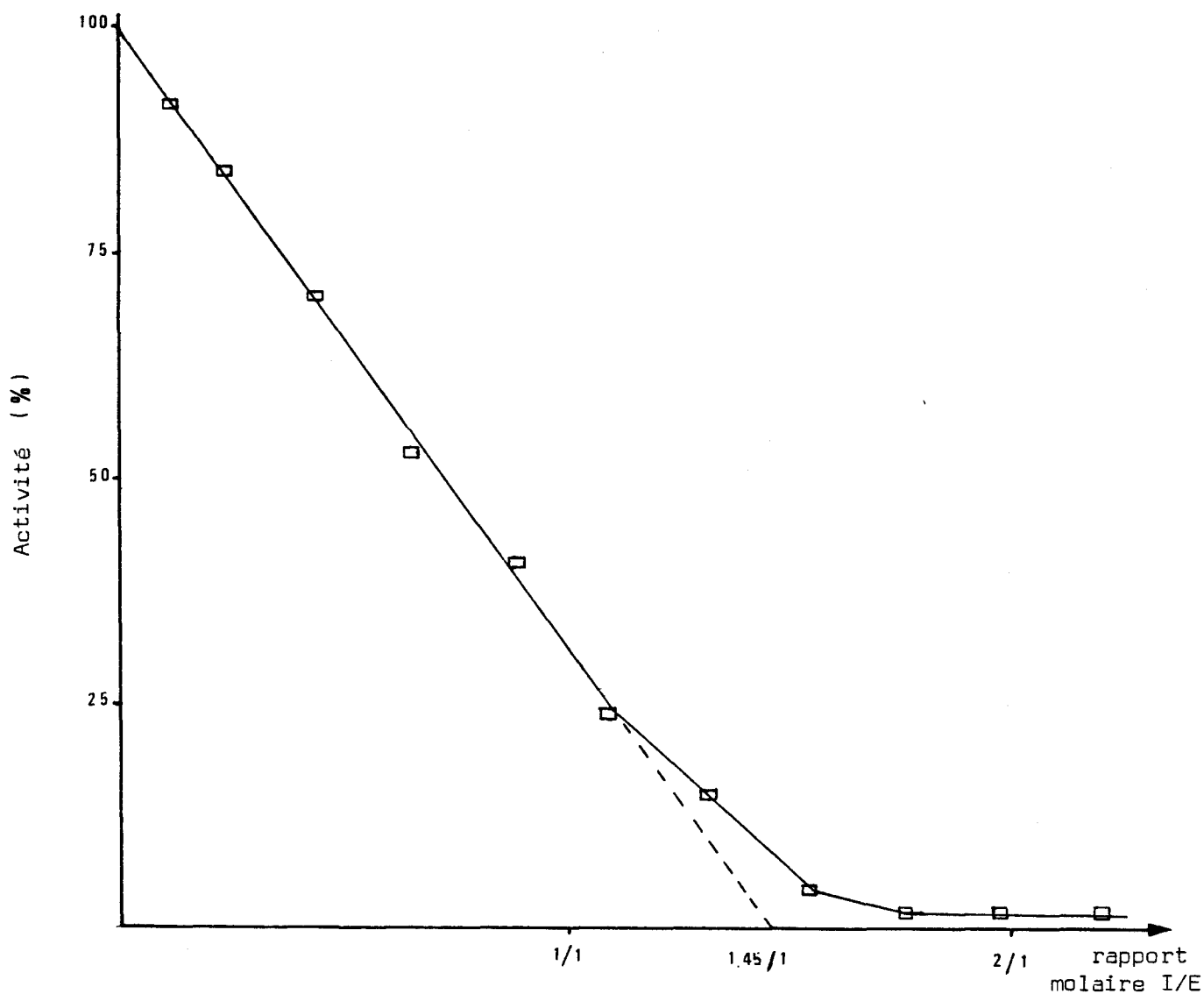


Figure 16 : Inhibition de la chymotrypsine par l' α_1 Achy.

L'incubation est effectuée pendant 5 minutes à 25° C, puis l'activité chymotrypsique résiduelle est dosée par la méthode spectrophotométrique. Le rapport molaire inhibiteur/enzyme(I/E) est exprimé en tenant compte de la quantité de matériel actif dans la solution d'inhibiteur et la solution d'enzyme. Avant le dosage, les échantillons sont dilués (1 : 100) dans le tampon Hepes.

III - 4.3.1 Préparation des mélanges.

Des mélanges d' α_1 Achy et de chymotrypsine bovine sont préparés dans 4 rapports molaires inhibiteur/enzyme différents : 0,35/1 ; 0,7/1 ; 1,4/1 ; 3,5/1. Un mélange de contrôle est effectué dans le rapport 1,4/1. Les mélanges sont gardés à 0° C. Après 10 minutes d'incubation, une partie aliquote de chaque mélange est prélevée pour le dosage de l'activité enzymatique résiduelle et au volume restant de chaque mélange, on ajoute alors du PMSF en excès molaire de 100 fois par rapport à la quantité initiale d'enzyme.

III - 4.3.2 Dosage de l'activité enzymatique résiduelle.

La partie aliquote prélevée dans chacun des mélanges est diluée 100 fois par du tampon Hepes. Sur cette dilution on mesure à 25° C l'activité enzymatique résiduelle par la méthode spectrophotométrique. Les résultats sont indiqués dans le tableau VII. Ces résultats ne sont pas à comparer avec ceux présentés dans le paragraphe précédent, ils permettent uniquement de déterminer le taux d'inhibition de la chymotrypsine dans les mélanges qui seront simultanément étudiés en électrophorèse.

III - 4.3.3 Etude en électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS.

La figure 17 montre les résultats obtenus en SDS-PAGE pour les 4 mélanges. Ils diffèrent suivant que les échantillons sont, préalablement à l'électrophorèse, soumis (partie A) ou non (partie B) à la réduction par le β -mercaptoéthanol. Dans chacun des 4 mélanges, il y a apparition d'un constituant possédant une M_r supérieure à celle de l'inhibiteur natif : elle est estimée à environ 67 000 dans les échantillons réduits, tandis qu'elle est proche de 76 000-77 000 dans les échantillons non réduits. Ce constituant dont l'importance dépend de la quantité d'enzyme présente lorsque l'inhibiteur est en excès, est le complexe α_1 Achy-chymotrypsine. Dans le mélange de contrôle (dépôt C) où l'enzyme a été au préalable inhibé par le PMSF, la formation de ce constituant n'est pas observée.

La réduction a pour effet de séparer les trois chaînes polypep-

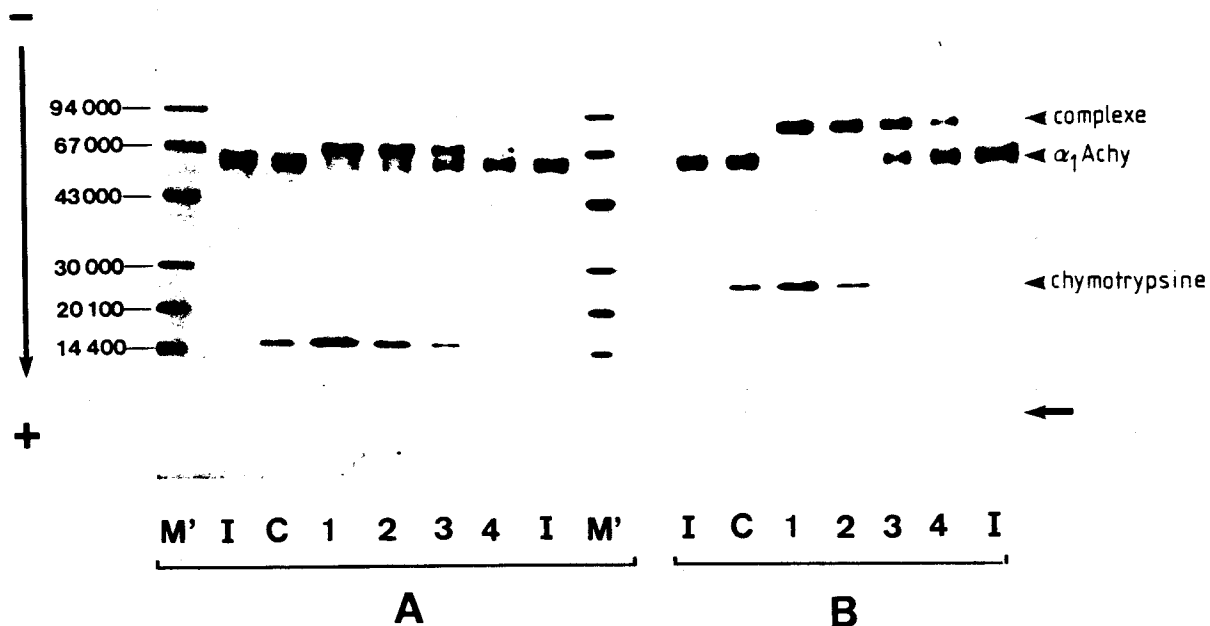


Figure 17 : Diagrammes électrophorétiques en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS de 4 mélanges d' α_1 Achy et de chymotrypsine en rapports molaires différents.

Après 10 minutes d'incubation à 0° C, du PMSF est ajouté à chaque mélange.

Partie A : échantillons réduits

Partie B : échantillons non réduits.

I : α_1 Achy native

C : mélange de contrôle (rapport molaire I/E = 1,4/1, voir p:96 et 101)

M' : témoins de M_r

1 à 4 : mélanges dont les rapports molaires I/E sont respectivement
1 : 0,35/1 ; 2 : 0,7/1 ; 3 : 1,4/1 ; 4 : 3,5/1

La bande diffuse migrant comme un constituant protéique de M_r proche de 6 000 est indiquée par la flèche.

(I/E signifie inhibiteur/enzyme).

TABLEAU VII

Activité chymotrypsique résiduelle des mélanges préparés
dans des rapports molaires inhibiteur/enzyme différents.

Cette activité est mesurée par la méthode spectrophotométrique après 10 minutes d'incubation à 0° C et exprimée en pourcentage de l'activité initiale de la solution de chymotrypsine.

Rapport molaire inhibiteur/enzyme	Activité résiduelle
0,35/1	85 %
0,70/1	60 %
1,40/1	5,5 %
3,50/1	2 %
Mélange de contrôle	0 %

tidiques de la chymotrypsine que celle-ci soit sous forme libre ou engagée dans le complexe. Dans les dépôts 3 et 4, partie B de la figure 17, il y a respectivement peu et pas d'enzyme en excès. Dans les mêmes échantillons réduits (partie A de la figure 17), on observe une bande correspondant à une M_r d'environ 15 000 qui est dissociée du complexe α_1 Achy-chymotrypsine par la réduction. Cette bande doit correspondre à la chaîne B de la chymotrypsine (voir figure 15 p.86), il est vraisemblable en effet que la chaîne C de la chymotrypsine (résidus 149 à 245) dans laquelle se trouve la sérine 195 du site actif reste liée à l' α_1 Achy.

Même dans les échantillons non réduits, la M_r estimée pour le complexe (76 000-77 000) est un peu inférieure à la valeur théorique de la M_r d'un complexe équimoléculaire (58 000 + 26 000 = 84 000). Dans tous les mélanges d' α_1 Achy et de chymotrypsine active, on peut noter la présence d'une bande diffuse (indiquée par une flèche) ayant la migration d'un constituant protéique de M_r proche de 5 à 6 000 : la perte de ce fragment rend vraisemblablement compte de la différence entre la M_r théorique et la M_r observée pour le complexe.

En présence d'un net excès de chymotrypsine, on peut observer un constituant qui migre juste un peu plus rapidement que la bande moyenne d' α_1 Achy native. L'étude qui suit caractérisera mieux ce constituant. Dans le dépôt n° 4, la bande migrant à ce niveau est nettement élargie du côté des M_r plus élevées, à cause de la présence d'inhibiteur natif en excès.

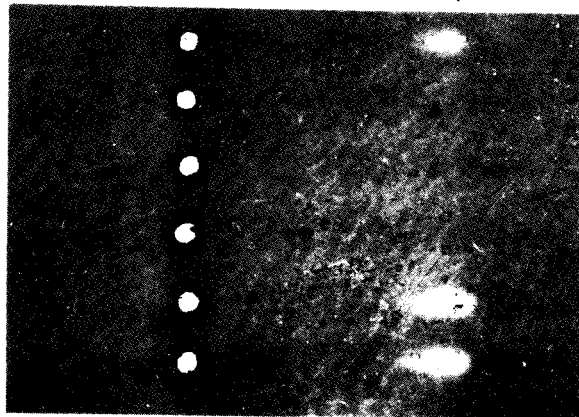
III - 4.3.4 Electrophorèse à pH alcalin en absence d'agent dénaturant.

Ces mêmes mélanges ont été étudiés en électrophorèse en plaque de gel d'agarose (pH 8,6) et en gel alcalin de polyacrylamide (pH 8,3). Trois séries identiques de dépôts ont été faites en plaque d'agarose. Après électrophorèse, une série est utilisée pour la révélation de l'activité inhibitrice (figure 18 A), une autre après fixation est colorée par le bleu Coomassie (figure 18 B) ; sur la troisième est effectuée la révélation de l'activité estérasique (figure 18 C). Une quatrième série identique de dépôts est étudiée en gel de polyacrylamide à pH 8,3 (figure 18 D).

Dans la figure 18 A, on ne peut mettre en évidence de l'inhibiteur actif que dans le mélange du dépôt n° 4, il y en a trop peu dans le dépôt n° 3 pour pouvoir être visualisé par cette méthode. Les résultats obtenus après

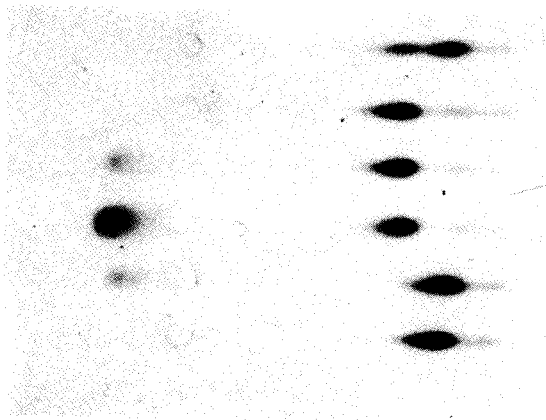
A

Activité inhibitrice



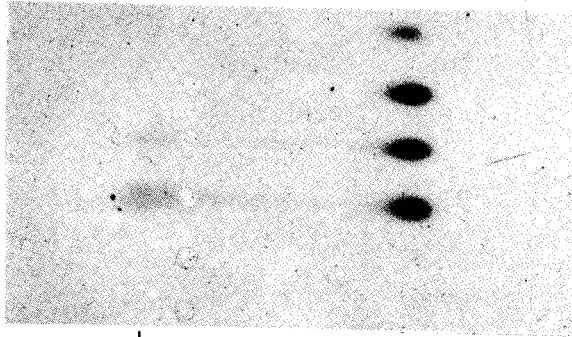
B

Coloration des protéines

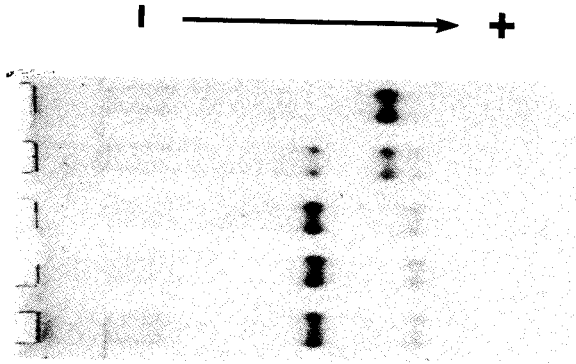


C

Activité estérasiq



D



1 2 3 4 I

I C 1 2 3 4

I C 1 2 3 4

I C 1 2 3 4

coloration des protéines en gel de polyacrylamide à pH 8,3 (figure 18 D) ou en plaque de gel d'agarose (figure 18 B) sont assez semblables, mis à part le fait que la chymotrypsine peut être visualisée en plaque d'agarose où elle a une migration légèrement cathodique, alors qu'elle sort du gel de polyacrylamide. Dans ce dernier système électrophorétique par contre, on peut très bien individualiser l' α_1 Achy active et l' α_1 Achy inactive (Publication n° 1).

Lorsque l' α_1 Achy est mélangée à de la chymotrypsine active, il y a apparition d'un constituant (noté "a" dans la figure 18) qui a une migration plus cathodique que l'inhibiteur natif et dont l'importance dépend de la quantité d'enzyme quand on est en présence d'un excès d'inhibiteur. Ce constituant n'existe pas dans le mélange de contrôle, il correspond donc au complexe α_1 Achy-chymotrypsine.

La révélation de l'activité estérasique effectuée après électrophorèse en plaque d'agarose a permis de mettre en évidence une activité estérasique au niveau de ce complexe (figure 18 C). Ces résultats permettent de démontrer que de l'enzyme se trouve effectivement dans le constituant "a". Cependant, il est difficile d'expliquer la présence d'enzyme ayant encore une activité estérasique dans des mélanges auxquels a été ajouté du PMSF. Nous reverrons ultérieurement le développement apporté à cette observation.

En gel de polyacrylamide (figure 18 D), il n'y a plus d' α_1 Achy sous forme active (bande b) dans les dépôts n° 1 et 2 (rapport I/E = 0,35/1 et 0,7/1) : toute l' α_1 Achy active qui était disponible dans ces mélanges a réagi avec la chymotrypsine et n'est plus retrouvée dans l'électrophorégramme. Par contre une très faible quantité d' α_1 Achy active existe encore dans le dépôt n° 3 (rapport 1,4/1), un très net excès existe dans le dépôt n° 4 (rapport 3,5/1).

Les résultats obtenus par électrophorèse en gel alcalin montrent que la bande obtenue au niveau de l' α_1 Achy native en SDS-PAGE (figure 17) pour des rapports inhibiteur/enzyme inférieurs à 1 (dépôts 1 et 2) ne peut pas être de l' α_1 Achy active, mais doit sans doute correspondre à la forme inactive d' α_1 Achy observée dans la figure 18 D.

L'ensemble de ces résultats nous a amenée à procéder à des études très précises de la stabilité du complexe dans le temps.

III - 4.4 Stabilité dans le temps du complexe α_1 Achy-chymotrypsine.

Nous nous sommes très vite rendue compte que le profil électrophorétique de mélanges d' α_1 Achy et de chymotrypsine varie avec le temps malgré l'addition de PMSF : on observe en effet la disparition progressive du complexe . Nous avons de plus observé que même en excès d' α_1 Achy une activité enzymatique résiduelle pouvait être mesurée. Les résultats obtenus en dichroïsme circulaire et présentés dans la publication n° 3 démontrent que le complexe formé entre l' α_1 Achy et la chymotrypsine n'est pas stable dans le temps et que l'instabilité observée parallèlement en SDS-PAGE n'est probablement pas artificielle. Il faut noter que l'évolution observée à l'aide des deux techniques ne permet jamais de revenir à la situation initiale.

Nous avons entrepris des études dans lesquelles nous avons suivi, en fonction du temps d'incubation du mélange, le devenir des deux antagonistes. Les premières études ont été effectuées sur des mélanges gardés à 0°C . Nous avons ensuite préféré éviter les écarts de température entre l'incubation et l'analyse et travailler, donc, à la température du laboratoire.

III - 4.4.1 Stabilité d'un mélange gardé à 0° C.

Un mélange d' α_1 Achy et de chymotrypsine bovine (rapport molaire 1,6/1) est préparé et gardé à 0° C.

III - 4.4.1.1 Mesure de l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps d'incubation.

L'activité chymotrypsique résiduelle est mesurée par dosage spectrophotométrique sur des parties aliquotes du mélange prélevées après 10 mn, 1 h, 27 h, 48 h, 6 jours et 11 jours. Elle est respectivement de 7 %, 2 %, 8 %, 10,5 %, 22,5 % et 24 %.

III - 4.4.1.2 Etude en électrophorèse en gel d'agarose à pH 8,6.

A des temps variables (10 mn , 1 h, 3 h, 5 h, 27 h, 48 h, 72 h, 6 jours et 11 jours), une partie aliquote du mélange est prélevée. Elle fait

alors immédiatement l'objet de deux dépôts identiques en plaque de gel d'agarose. Après électrophorèse, une bande de dépôt est utilisée pour la fixation et la coloration des protéines, sur l'autre bande on pratique une révélation de l'activité estérasique. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 19 ; les diagrammes d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle de l' α_1 Achy native et du mélange après 11 jours d'incubation à 0° C y figurent également.

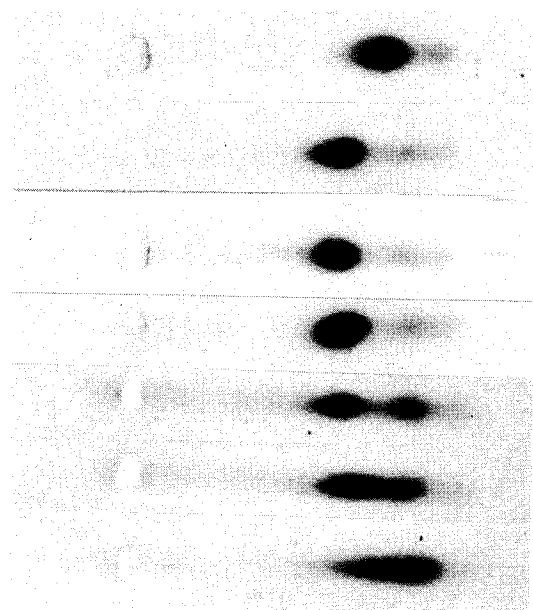
Dans la figure 19 A, il est possible dès le temps 10 minutes d'incubation, de mettre en évidence le constituant que nous avons identifié au complexe. Il disparaît ensuite progressivement au cours du temps tandis que s'accroît l'importance d'un constituant migrant légèrement plus rapidement que l' α_1 Achy native. Au bout de 11 jours d'incubation à 0° C (figure 19 B), il n'y a plus de complexe, le seul constituant visible migre plus rapidement que l' α_1 Achy native et réagit avec les anticorps spécifiques de l' α_1 Achy. Ces caractéristiques permettent de penser qu'il s'agit de la forme inactive d' α_1 Achy déjà observée en gel de polyacrylamide à pH alcalin (figure 18 D).

La révélation de l'activité estérasique (figure 19 C) montre que l'activité mise en évidence au niveau du complexe diminue dans le temps pour disparaître totalement après 6 jours d'incubation ; parallèlement, des quantités croissantes de chymotrypsine libre et active sont visualisées du côté cathodique de l'électrophorèse.

On peut conclure qu'avec le temps, le complexe formé entre l' α_1 Achy et la chymotrypsine se dissocie pour donner à la fois de l' α_1 Achy modifiée inactive et de l'enzyme libre ayant gardé son activité estérasique comme l'ont montré les dosages spectrophotométriques et la révélation selon la technique de URIEL et BERGES (206) ; la chymotrypsine dissociée du complexe est également capable de digérer de la fibrine incorporée dans un gel d'agarose (résultat non illustré) ce qui prouve qu'elle a conservé également son activité protéolytique.

Si à un mélange qui a été incubé au minimum 24 heures, on ajoute du PMSF avant la migration électrophorétique, on peut toujours mettre en évidence une activité estérasique au niveau du complexe, par contre on n'observe plus d'activité au niveau de la chymotrypsine libre : le PMSF a inhibé la chymotrypsine déjà libérée dans le mélange au moment de son addition, mais ne semble pas pouvoir inhiber l'activité que l'on visualise au niveau du complexe, ce phénomène avait déjà été observé figure 18 C.

Nous avons d'abord pensé que, comme dans le cas des complexes



α_1 Achy

10 mn

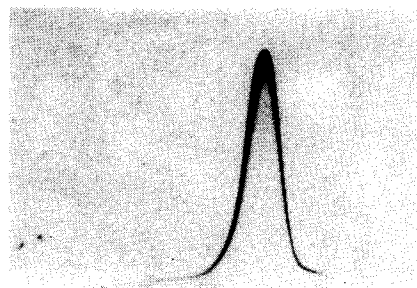
1 h

5 h

48 h

72 h

6 jours



11 jours

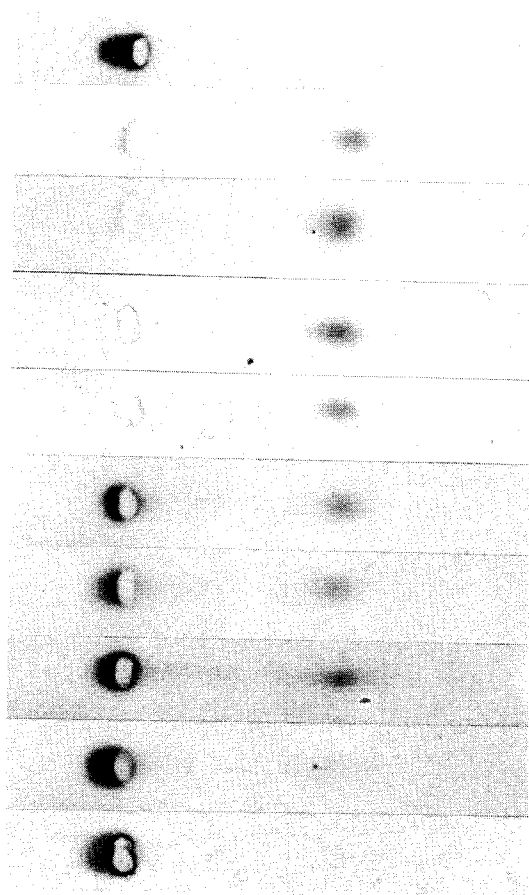
+



-

- —————> +

A



chy

10 mn

1 h

3 h

5 h

27 h

48 h

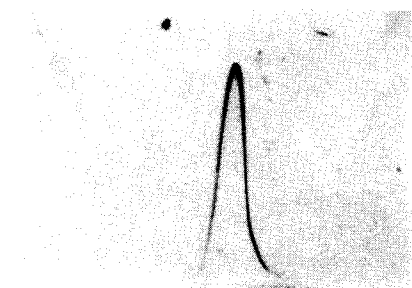
72 h

6 jours

11 jours

11 jours

I



I

+



-

- —————> +

B

- —————> +

C

α_2 M-sérine-protéase (194), l'enzyme engagé dans le complexe pouvait avoir conservé une certaine partie de son activité envers des substrats de petite taille moléculaire ; mais on peut aussi se demander si cette activité n'est pas plutôt due à de l'enzyme qui se serait dissocié du complexe pendant le temps nécessaire à la révélation de l'activité estérasique, ce phénomène pouvant être accéléré par l'augmentation de la température (de 0 à 25° C) requise pour la révélation. Cet écart de température pourrait en effet provoquer une perturbation de l'équilibre. Nous avons donc été amenée à travailler à température constante (25° C).

III - 4.4.2 Stabilité d'un mélange à 25° C.

Nous avons ainsi suivi l'évolution dans le temps d'un mélange α_1 Achy-chymotrypsine bovine conservé à 25° C, avec un rapport molaire inhibiteur/enzyme un peu supérieur (2/1) pour pouvoir saisir le déroulement des phénomènes aboutissant entre autres à l'épuisement de l'inhibiteur actif en excès au départ de la réaction.

III - 4.4.2.1 Mesure de l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps d'incubation.

L'activité enzymatique résiduelle est mesurée par dosage spectrophotométrique sur des parties aliquotes d'un même mélange prélevées à des temps différents. La courbe obtenue (figure 20) indique qu'après les deux premières minutes de contact, l'activité enzymatique résiduelle décroît de façon importante ; après 1 h d'incubation par contre, on peut observer qu'il y a régénération d'activité enzymatique qui, après 24 et 48 h, atteint environ 20 % de l'activité initiale de l'enzyme seul. Nous avons auparavant vérifié que l'enzyme conservait, à 25° C, la même activité pendant 24 heures au moins.

III - 4.4.2.2 Préparation des échantillons pour les études électrophorétiques.

La régénération de l'activité enzymatique intervenant très rapidement, nous avons choisi la stratégie suivante pour que l'étude simultanée de plusieurs temps d'incubation par des techniques d'électrophorèse en gel de polyacrylamide ou d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle puisse être effectuée avec le plus de précision possible : nous avons successivement préparé autant de mélanges iden-

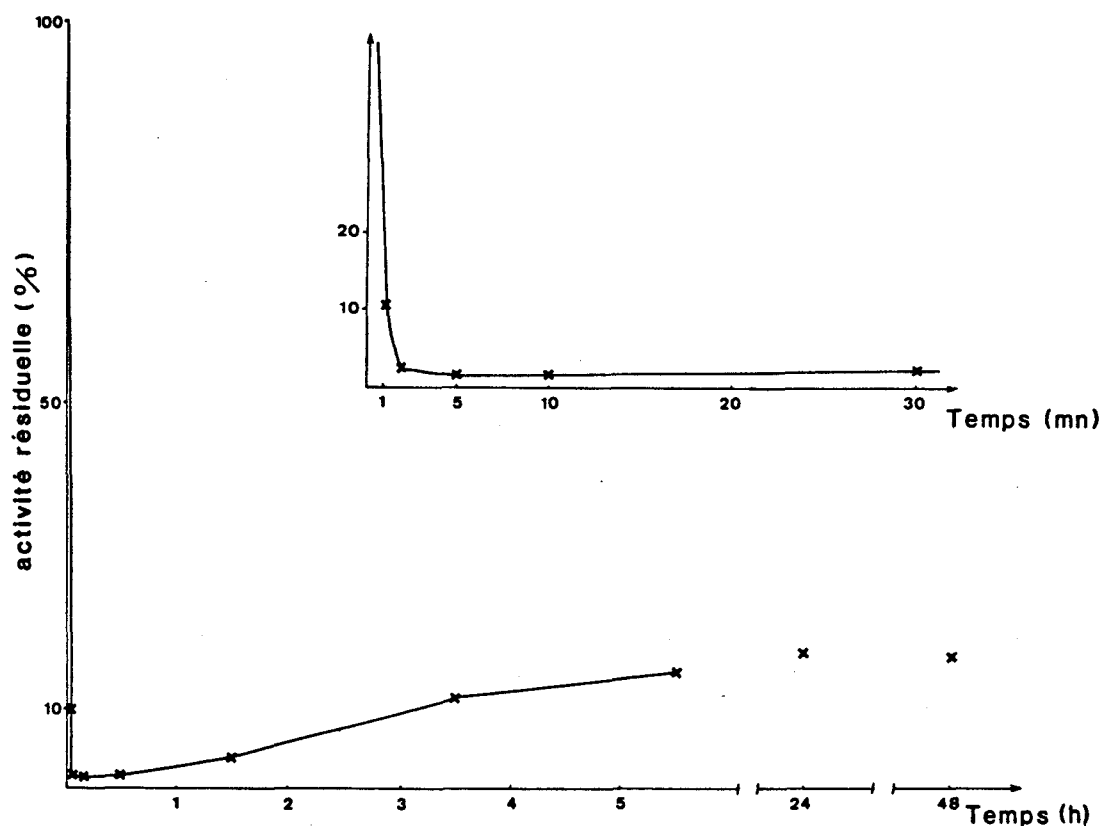


Figure 20 : Variation en fonction du temps de l'activité estérasique dosable dans un mélange α_1 Achy-chymotrypsine (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1) incubé à 25° C. Le dosage est effectué par la méthode spectrophotométrique. La concentration en enzyme dans le mélange est $3,45 \times 10^{-6}$ M (concentration finale pour le dosage $3,45 \times 10^{-8}$ M). L'activité résiduelle est exprimée en pourcentage de l'activité d'une solution de chymotrypsine de même concentration à laquelle on n'a pas ajouté d'inhibiteur.

Encart : le temps est exprimé en minutes.

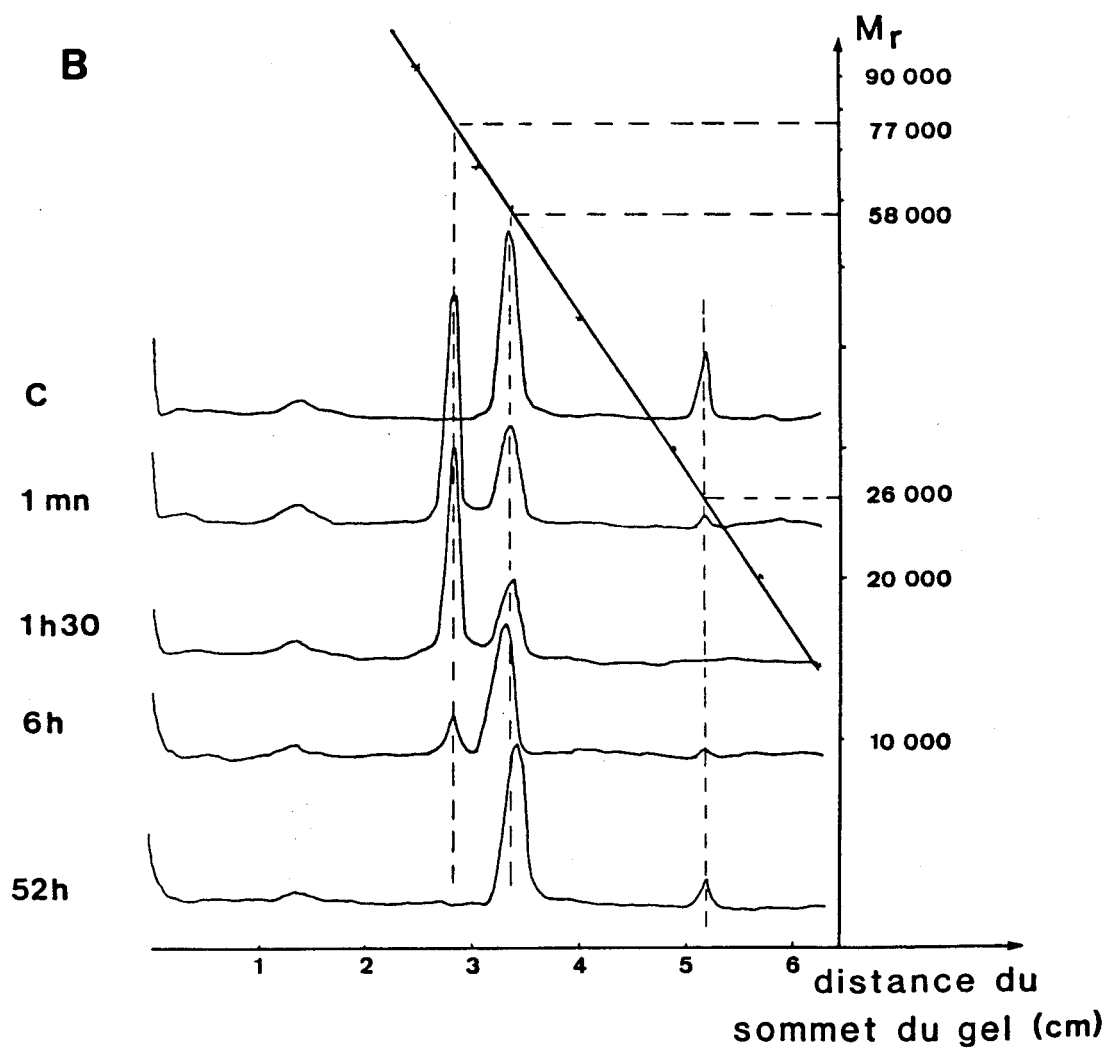
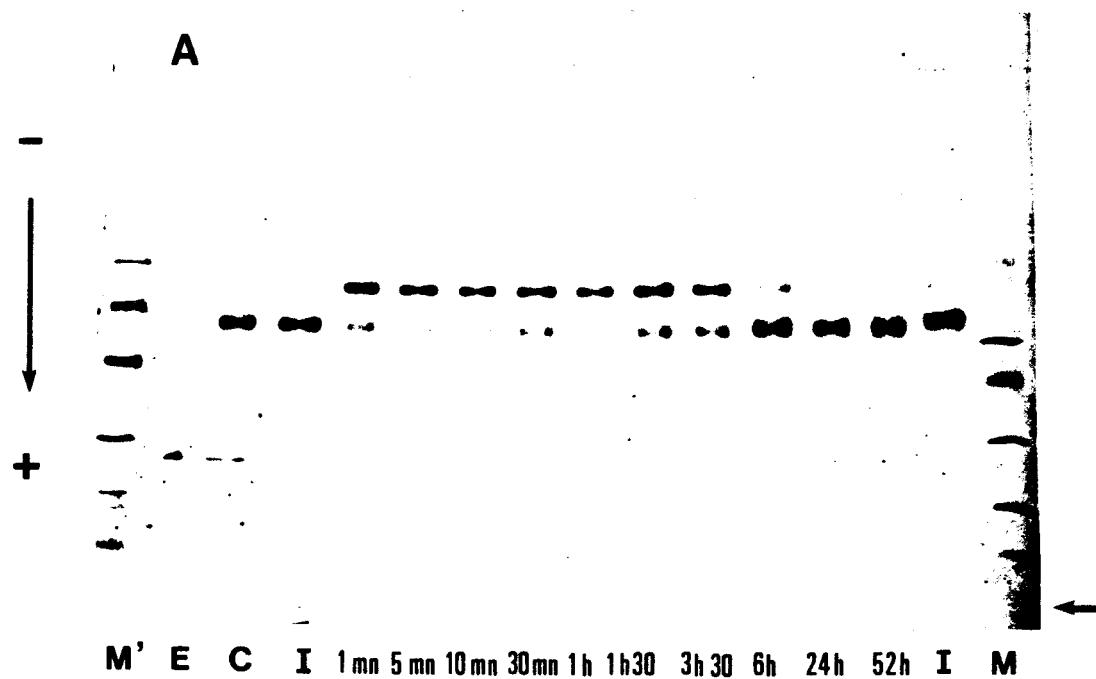
tiques (en rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1) que de temps d'incubation à étudier en procédant à un compte à rebours pour pouvoir ajouter le PMSF simultanément aux différents mélanges et ainsi arrêter l'action enzymatique dans tous les mélanges en même temps. Un mélange identique a été incubé pendant 10 jours, un autre, pendant 1 mois à 25° C, puis analysé de la même façon après addition de PMSF. Pour s'assurer de la reproductibilité des mélanges, nous avons vérifié sur une partie aliquote de chacun d'eux qu'après 10 minutes d'incubation, l'activité enzymatique résiduelle est bien identique dans tous les cas.

Les différents échantillons ont été étudiés simultanément en SDS-PAGE, en électrophorèse en gel de polyacrylamide sans agent dénaturant (à pH 8,3) et en immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy.

III - 4.4.2.3 Etude en électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Le diagramme électrophorétique obtenu en SDS-PAGE pour les 10 temps d'incubation les plus courts est présenté dans la partie A de la figure 21. Dans la partie B figurent les enregistrements densitométriques des dépôts correspondant au mélange de contrôle et aux temps d'incubation 1 mn, 1 h 30, 6 h et 52 h. Le diagramme obtenu pour ces 10 échantillons en électrophorèse en gel de polyacrylamide en absence d'agent dénaturant est présenté figure 22. Les résultats obtenus dans les deux systèmes d'électrophorèse après 10 jours d'incubation sont rassemblés dans la figure 23 ; des électrophorégrammes identiques sont obtenus après 1 mois d'incubation.

Nous pouvons constater sur la figure 21 qu'une faible quantité de chymotrypsine est visible dans le mélange après 1 minute d'incubation ; elle disparaît ensuite pour réapparaître de façon nette après 6 heures d'incubation. On peut observer dans les deux systèmes (figures 21 et 22) que l'intensité de la bande du complexe équimoléculaire ne diminue nettement qu'au delà de 3 h 30 d'incubation. Ce complexe a complètement disparu après 24 h. Par contre, à partir de 6 h d'incubation apparaissent, en gel de polyacrylamide à pH alcalin (figure 22), des bandes ayant une migration intermédiaire entre celle du complexe équimoléculaire et celle de l'inhibiteur. L'élargissement vers les M_r plus élevées de la bande d' α_1 Achy observée en présence de SDS après 6 heures d'incubation (figure 21) s'explique vraisemblablement par l'apparition de ces constituants intermédiaires.



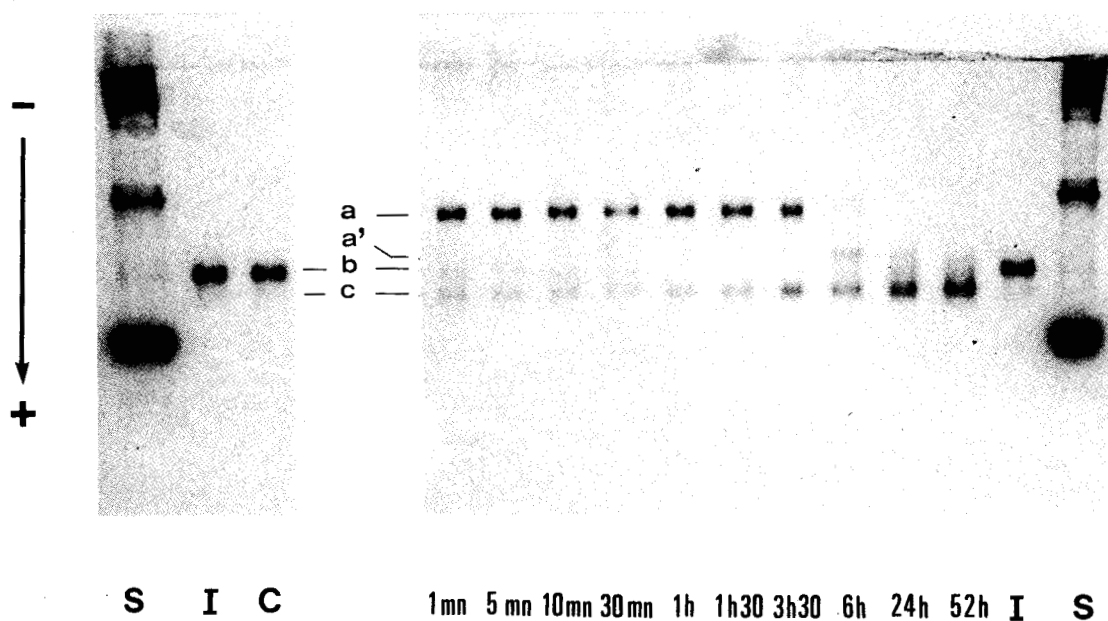


Figure 22 : Variation en fonction du temps du profil électrophorétique en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide) à pH 8,3 d'un mélange α_1 Achy-chymotrypsine (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1) incubé à 25° C.

Le PMSF est ajouté au mélange après le temps d'incubation indiqué pour chaque échantillon.

- S : sérum humain
- I : α_1 Achy native
- C : mélange de contrôle (voir page 96)
- a : complexe α_1 Achy-chymotrypsine
- a' : forme dégradée de complexe
- b : α_1 Achy active
- c : α_1 Achy inactive

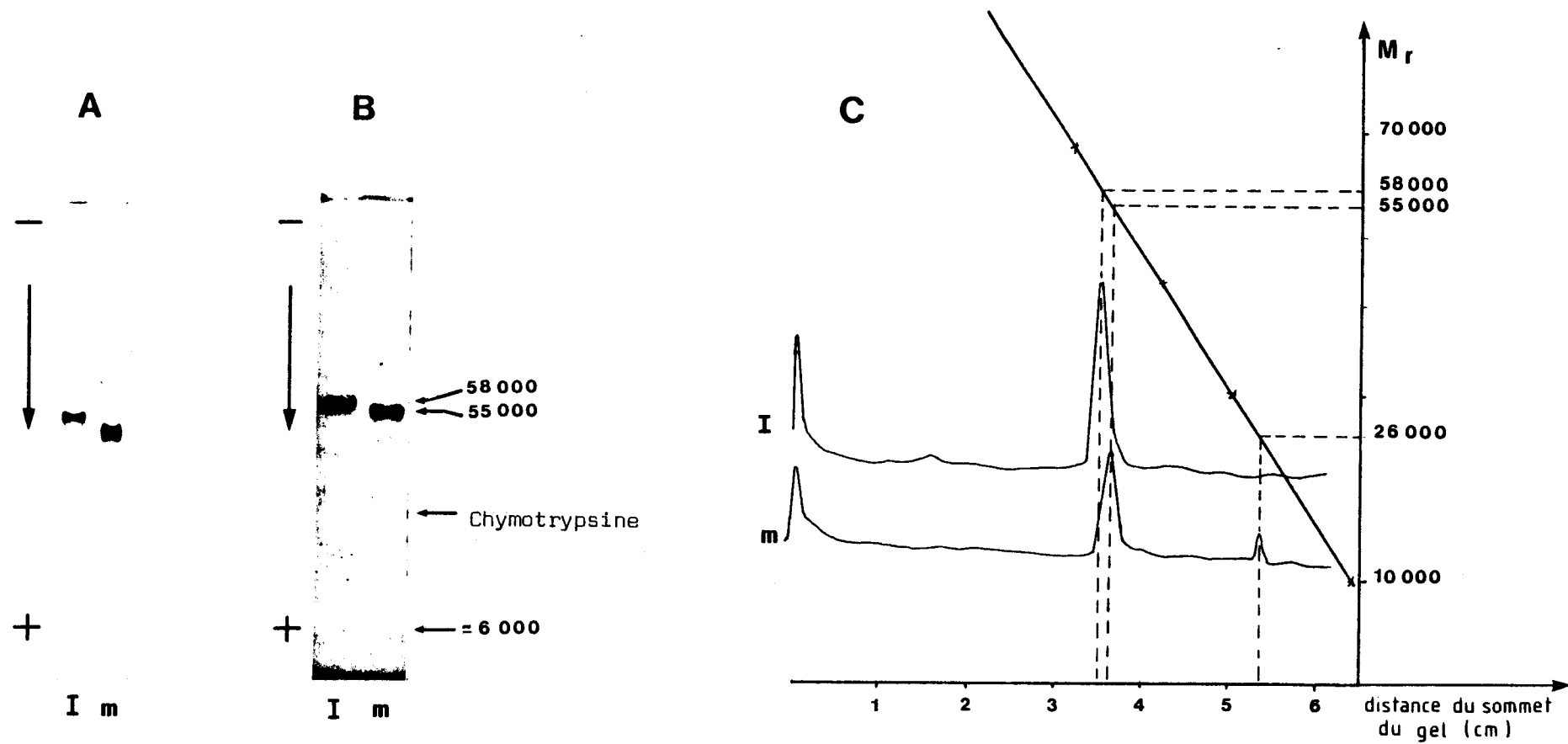


Figure 23 : Etudes électrophorétiques de l' α_1 Achy native (I) et d'un mélange α_1 Achy-chymotrypsine (rapport molaire 2/1) incubé pendant 10 jours à 25°C (m).

A : électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide) à pH 8,3.

B : électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS.

C : enregistrements densitométriques des 2 dépôts de la partie B.

La courbe d'étalonnage est établie à partir de témoins de M_r ayant migré dans le même gel.

Ces derniers doivent être des formes dégradées du complexe équimoléculaire dont la dégradation se poursuit ensuite au-delà de 6 heures d'incubation, nous y reviendrons un peu plus loin. La figure 22 montre qu'une bande d'inhibiteur actif est nettement visible au moins jusqu'à 30 minutes d'incubation ; après 1 h 30 d'incubation, elle n'est plus décelable, par contre la bande correspondant à l' α_1 Achy inactive s'intensifie. L'étude en gel de polyacrylamide à pH alcalin permet de faire la distinction entre les deux formes, active et inactive, de l' α_1 Achy ; de même les formes dégradées du complexe qui doivent avoir des charges différentes sont individualisées dans ce système. En SDS-PAGE, par contre, tous ces constituants présentant des M_r très voisines apparaissent sous la forme d'une seule bande dans la zone de migration de l' α_1 Achy. On constate uniquement sur les enregistrements densitométriques (figure 21) un déplacement vers les M_r plus faibles de cette bande entre 6 heures et 52 heures d'incubation, ce qui montre que la dégradation du complexe se poursuit.

Après 10 jours d'incubation, seule subsiste la forme d' α_1 Achy de migration rapide comme on peut l'observer sur le gel de polyacrylamide à pH alcalin (figure 23-A) et en SDS-PAGE (figure 23-B) où une seule bande homogène de M_r 55 000 est bien définie. Dans ce dernier système électrophorétique, on observe également une bande peu importante de chymotrypsine et la bande (faiblement visible) correspondant au fragment qui migre comme un constituant protéique de M_r proche de 5 à 6 000. Les mêmes résultats sont obtenus après 1 mois d'incubation. La forme d' α_1 Achy que l'on retrouve en fin de réaction présente un certain nombre de caractéristiques différentes de celles de l' α_1 Achy native : elle a une migration plus anodique à pH alcalin, elle a donc subi des modifications de charge, elle possède une M_r inférieure (55 000 au lieu de 58 000 estimée en SDS-PAGE), elle ne présente plus de propriétés inhibitrices envers des enzymes de type chymotrypsique ; nous l'appelons α_1 Achy modifiée.

Dans les conditions utilisées pour suivre l'évolution du complexe α_1 Achy-chymotrypsine dans le temps, nous n'avons jamais observé de modifications de l' α_1 Achy aboutissant à une forme de M_r inférieure à 55 000.

III - 4.4.2.4 Etude en immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

Les mêmes échantillons ont été étudiés en immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy (DAKO) dans la deuxième dimension. Nous présentons, figure 24, les résultats obtenus pour les mélanges incubés pendant 1 mn, 10 mn, 3 h 30, 6 h, 24 h et 52 h ; ils sont en effet représentatifs de l'évolution du phénomène. La présence d'une activité estérasique au

niveau du complexe (figures 18 et 19) permet de localiser ce dernier après l'électrophorèse en première dimension. Ce repérage n'est montré sur la figure 24 que pour le mélange incubé pendant 1 mn, mais il en est de même pour les mélanges incubés pendant 10 mn, 1 h, 3 h 30 et 6 h, c'est-à-dire tant qu'il existe du complexe. La surface des pics de précipitation est évaluée par pesée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la surface obtenue avec la même quantité d' α_1 Achy native prise comme référence (tableau VIII).

Dans l'échantillon analysé après 1 minute d'incubation il n'y a, au niveau du complexe repéré grâce à la révélation de l'activité estérasique, qu'un petit épaulement dans la courbe de précipitation. Il semble donc que les déterminants antigéniques de l' α_1 Achy soient en très grande partie masqués dans le complexe α_1 Achy-chymotrypsine. Le pic de précipitation obtenu correspond à l' α_1 Achy en excès et à la forme modifiée déjà observée dans ce mélange après une électrophorèse dans des conditions à peu près identiques, c'est-à-dire en gel de polyacrylamide à pH 8,3 (bandes b et c de la figure 22). La surface du pic de précipitation formé (tableau VIII) ne représente que 40 % de la surface obtenue pour une quantité équivalente d'inhibiteur natif. Des résultats analogues sont observés pour les temps d'incubation 10 mn et 1 h. Pour les échantillons ayant été incubés pendant 3 h 30 et plus on assiste à une augmentation progressive de la surface du pic qui atteint, après une incubation de 24 h et 52 h, des valeurs supérieures à celle de la référence. Ainsi donc à partir du moment où des formes dégradées du complexe apparaissent, après 3 h 30 d'incubation (voir figure 22), l'inhibiteur impliqué dans ces formes dégradées semble pouvoir à nouveau former un arc de précipitation avec ses anticorps lors de la deuxième dimension. La forme modifiée et inactive d' α_1 Achy obtenue après dissociation possède des déterminants antigéniques communs à ceux de la molécule native, mais l'arc de précipitation obtenu est plus dense, il a une "morphologie" différente. L'aspect du pic de précipitation obtenu en rocket ainsi que celui de l'anneau de précipitation observé en immunodiffusion radiale diffèrent suivant qu'ils sont produits par l' α_1 Achy native ou l' α_1 Achy modifiée obtenue après interaction avec la chymotrypsine ; cette dernière donne en effet un pic ou un anneau de précipitation plus dense (figure 25). La molécule a donc vraisemblablement subi un changement de conformation qui influence la réaction avec les anticorps. Dans les techniques faisant intervenir une électrophorèse à pH 8,6, la mobilité plus grande à ce pH de l' α_1 Achy modifiée peut expliquer en partie le fait que la surface du pic obtenu soit supérieure à celle de la référence. Nous reviendrons sur cette question dans la partie consacrée à l'étude de la réaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G.

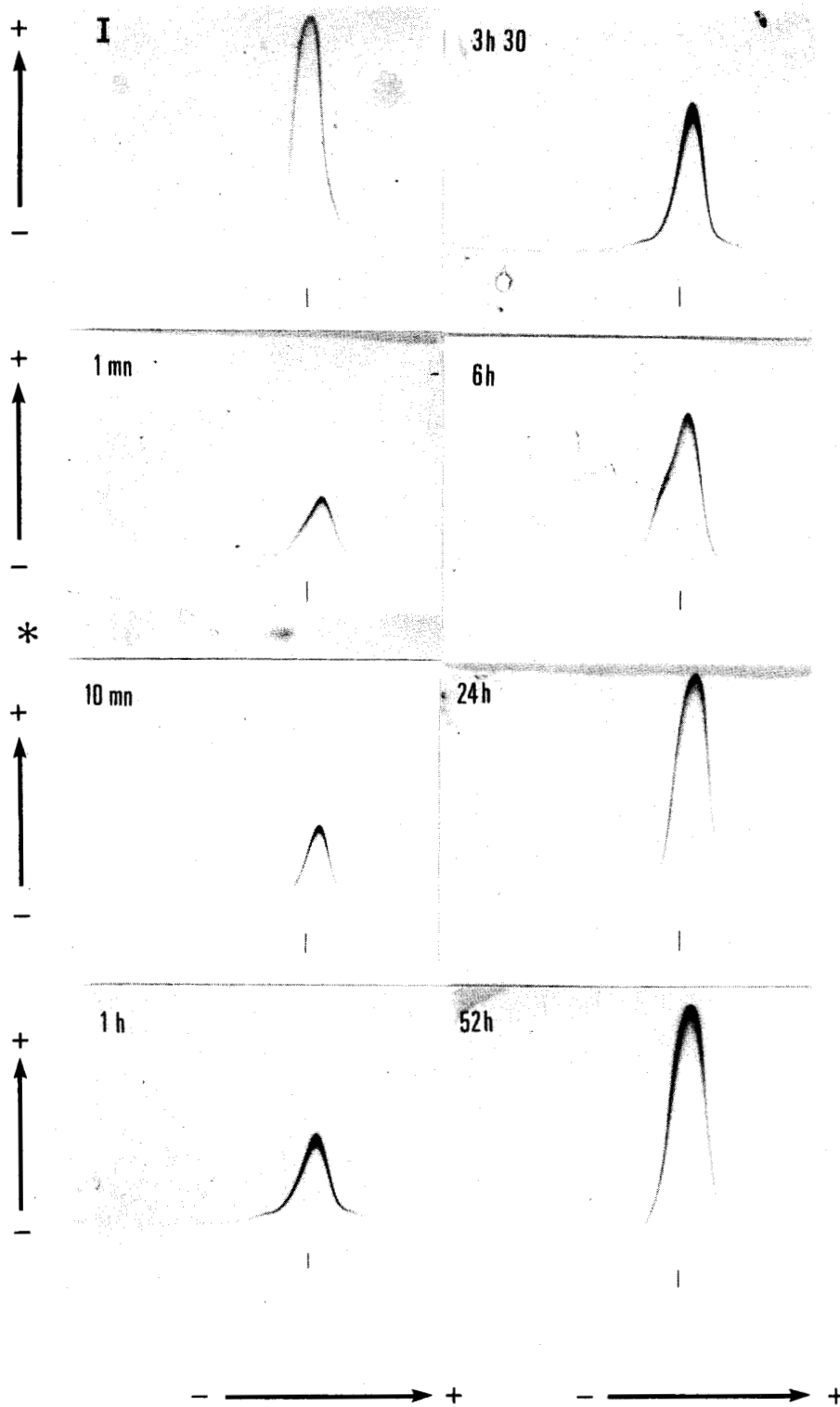


Figure 24 : Variation dans le temps du diagramme obtenu en immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec un mélange α_1 Achy-chymotrypsine (rapport molaire 2/1). L'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy est utilisé en deuxième dimension.

I : α_1 Achy native. Les temps indiqués sont les temps d'incubation du mélange.

* : visualisation de l'activité estérasique après l'électrophorèse en première dimension.

Le trait indique la position du sommet du pic de l' α_1 Achy native (I) qui sert de point de repère.

TABLEAU VIII

Comparaison des surfaces des pics de précipitation
des diagrammes immunoélectrophorétiques présentés
figure 24.

La surface du pic de l' α_1 Achy native est prise comme référence.

α_1 Achy native	100 %
Mélange incubé 1 minute	40 %
10 minutes	40 %
1 heure	45 %
3 heures 30	70 %
6 heures	80 %
24 heures	115 %
52 heures	125 %

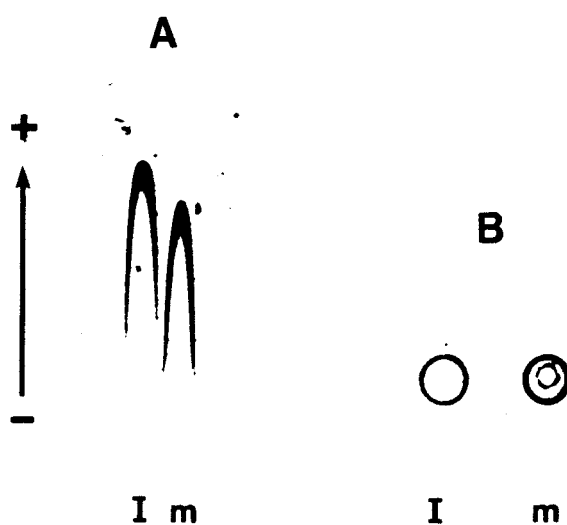


Figure 25 : Comparaison de l'immunoprécipitation d'un mélange α_1 Achy-chymotrypsine (m) et de l'inhibiteur natif (I) en :

A : électro-immunodiffusion

B : immunodiffusion radiale.

Les dépôts renferment la même quantité initiale d'inhibiteur natif (2 μ g).

Le mélange est préparé dans un rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 2/1, il est déposé après 5 jours d'incubation à 0° C.

III - 4.4.3 Essai de synthèse des résultats concernant l'évolution en fonction du temps d'un complexe α_1 Achy-chymotrypsine préparé en présence d'un excès d'inhibiteur.

Les résultats sont résumés sous forme de schéma permettant de suivre l'apparition et la disparition des différents constituants impliqués dans la réaction (figure 26). Le complexe équimoléculaire α_1 Achy-chymotrypsine qui peut être visualisé que ce soit en SDS-PAGE ou en électrophorèse à pH alcalin se dissocie quand le temps d'incubation augmente. Cette dissociation provoque la libération d'une part d'inhibiteur modifié inactif et d'autre part d'enzyme actif. L'enzyme actif libéré s'associe aux molécules d'inhibiteur actif encore disponibles pour former à nouveau du complexe dont la quantité reste approximativement constante jusqu'à environ 3 h 30 d'incubation. Pendant ce temps, la forme modifiée d' α_1 Achy devient peu à peu le constituant majeur. Quand l'intensité de la bande du complexe diminue, on observe l'apparition de formes dégradées de ce complexe. Deux observations suggèrent que c'est bien l'enzyme engagé dans le complexe qui subit une dégradation. On ne récupère qu'une proportion peu importante de l'enzyme (20 % en activité et une bande faible en SDS-PAGE), par ailleurs, nous n'obtenons à aucun moment de forme d' α_1 Achy plus dégradée que ne l'est l' α_1 Achy modifiée de $M_r = 55\ 000$. De plus, l'intensité de la bande obtenue permet de penser que la quasi-totalité de l'inhibiteur natif présent au début de la réaction s'est transformée en ce constituant.

Puisque de l'enzyme actif se trouve libéré après dissociation du complexe, nous pouvons considérer que l' α_1 Achy se comporte comme un inhibiteur temporaire de la chymotrypsine bovine, selon la définition de BIETH (21).

III - 4.5 Résultats publiés par d'autres auteurs.

BEATTY et coll (17) ont déterminé la constante d'association de l' α_1 Achy avec, entre autres, la chymotrypsine bovine ; cette constante est beaucoup plus faible que celle de l' α_1 Achy avec la cathepsine G (respectivement $6,0 \pm 1,0 \times 10^4$ et $5,1 \pm 0,7 \times 10^7$ déterminées à 25° C à pH 8,0). Ces auteurs n'ont pas déterminé de constante de dissociation et ont précisé que la détermination d'un K_i ne peut donc être effectuée. BEATTY et coll (17) ainsi que TRAVIS et coll (203) affirment que l' α_1 Achy agit en inhibiteur "pseudo-irréversible" sans plus de précisions.

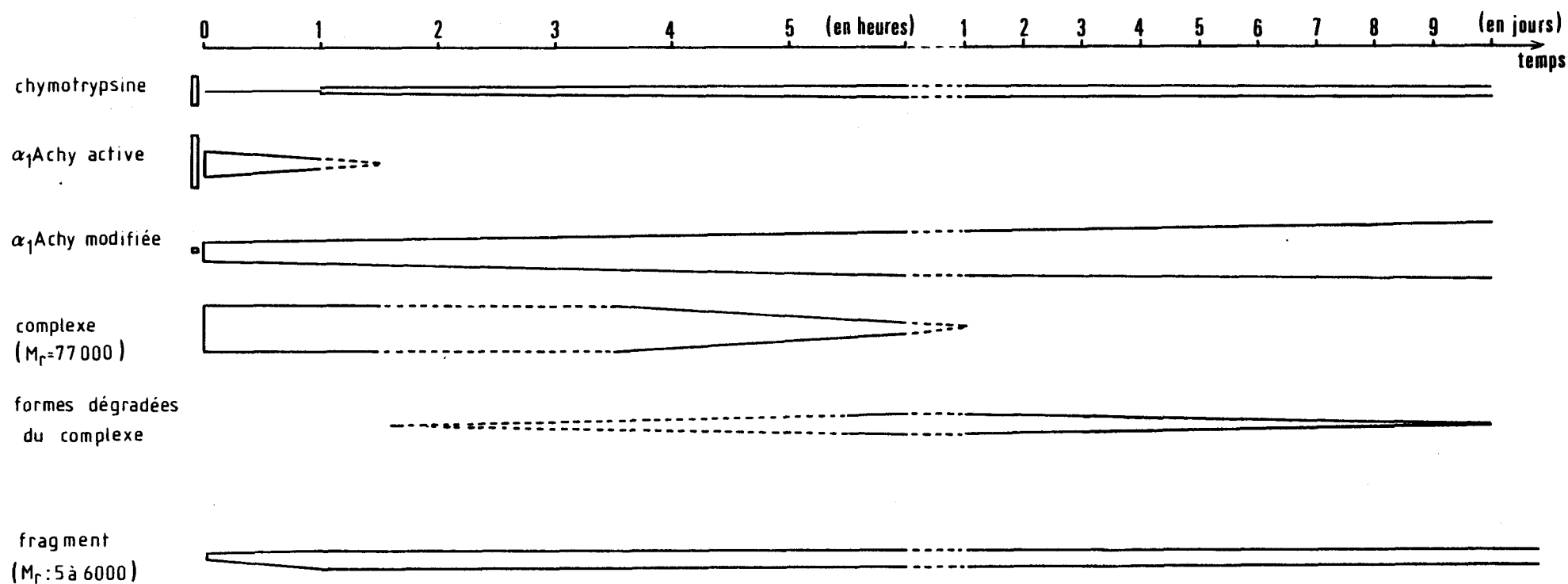


Figure 26 : Schéma illustrant l'apparition et la disparition au cours du temps des différents constituants d'un mélange d' α_1 Achy et de chymotrypsine bovine préparé en présence d'inhibiteur en excès (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1).
Les variations des constituants qui, à certains moments, sont difficilement observables, sont représentées par des traits discontinus.

GIANAZZA et ARNAUD (68) ont étudié le devenir de l' α_1 Achy dans un plasma humain incubé avec de la chymotrypsine bovine. L' α_1 Achy est détectée par immunofixation après l'isoélectrofocalisation en gel de polyacrylamide. Ces auteurs utilisent une chymotrypsine bovine marquée à l'iode 125 qu'ils mettent en évidence par autoradiographie. Ils démontrent ainsi que l'interaction de l' α_1 Achy avec la chymotrypsine conduit à la formation de complexes possédant, comme l' α_1 Achy native, une certaine microhétérogénéité. Pour un rapport protéase/antiprotéase faible, ils observent la formation d'un complexe qui présente un diagramme décalé de 0,25 unité de pH vers la cathode. La présence de chymotrypsine est démontrée dans chaque bande. En présence d'excès de protéase, par contre, le diagramme est décalé vers les pI plus bas.

Récemment, MATSUMOTO et coll (130) ont analysé en SDS-PAGE la réaction entre l' α_1 Achy et la chymotrypsine bovine après 30 minutes d'incubation à 25° C. Avec un rapport inhibiteur/enzyme égal à 1, ils observent encore la présence d' α_1 Achy en plus de celle d'un complexe de $M_r = 82\ 000$ (pour ces auteurs, la M_r de la chymotrypsine est 22 000 et celle de l' α_1 Achy 64 000). Ces auteurs expliquent leurs résultats par une instabilité du complexe en présence de SDS. Ils notent également que lorsqu'ils effectuent un mélange équimoléculaire d' α_1 Achy et de chymotrypsine, aucune activité chymotrypsique n'est détectée sur un substrat synthétique, le N-benzoyl-L-tyrosine éthyl ester, par méthode spectrophotométrique ; il faut ajouter que le pourcentage d'enzyme actif n'est pas précisé par les auteurs.

III - 4.6 Considérations sur le caractère temporaire de l'inhibition par certains inhibiteurs sériques.

Le caractère temporaire de l'inhibition a été également décrit pour d'autres inhibiteurs sériques de sérine-protéase. Puisque de la thrombine active est libérée lors de la dissociation spontanée du complexe AT-thrombine, DANIELSSON et BJÖRK (48) considèrent que l'AT est un inhibiteur temporaire de la thrombine. WONG et coll (220) ont démontré que la trypsine bovine libérée sous forme active du complexe AT-trypsine est recyclée avec l'inhibiteur en excès pour former à nouveau du complexe. L' α_1 PI a également été décrite comme un inhibiteur temporaire de la trypsine porcine (18, 147) et de l'élastase porcine (172).

Les travaux récents de LÖBERMANN et coll (124) ont cependant fait naître un doute à propos du caractère temporaire de l'inhibition par l' α_1 PI. Ils ont montré tout d'abord que les complexes formés entre l' α_1 PI et la chymotrypsine ou le chymotrypsinogène A ne sont pas stables, puisqu'une incubation de plus de 30 minutes à 37° C provoque la dissociation du complexe. Ces faits suggèrent donc que l' α_1 PI est également un inhibiteur temporaire de la chymotrypsine et du chymotrypsinogène A. LÖBERMANN et coll (124) ont ensuite étudié l'action du diisopropylfluorophosphate (DFP) sur le système α_1 PI-chymotrypsine et démontré que l'instabilité du complexe était due à une protéase qui contamine la préparation d' α_1 PI : si l' α_1 PI est traitée par le DFP dont l'excès est éliminé avant que l'enzyme ne soit ajouté ou si le mélange α_1 PI-chymotrypsine est traité par le DFP, le complexe reste stable.

III - 4.7 Etude de la stabilité du complexe α_1 Achy-chymotrypsine en présence de PMSF.

Nous avons donc été amenée à vérifier si l'instabilité du complexe α_1 Achy-chymotrypsine que nous avons décrite pouvait être due à une protéase contaminante et nous avons étudié en fonction de la durée de l'incubation et de la présence de PMSF les constituants d'un mélange α_1 Achy-chymotrypsine. Au moment de son addition au mélange, le PMSF devrait inhiber non seulement la chymotrypsine déjà dissociée du complexe, mais aussi l'éventuelle sérine-protéase contaminante. Un mélange α_1 Achy-chymotrypsine dans le rapport 2/1 est préparé et incubé à 25°C pendant 10 minutes, il est alors divisé en 2 parties ; à l'une on ajoute du PMSF, en excès molaire de 100 fois par rapport à la quantité initiale d'enzyme ; on conserve alors les deux parties à 25° C pendant 48 ou 24 heures avant l'étude en électrophorèse en gel de polyacrylamide en absence d'agent dénaturant. Deux autres mélanges incubés respectivement pendant 1 minute et 10 minutes avant l'addition de PMSF sont alors immédiatement analysés comparativement aux quatre échantillons précédents. Sur une série de dépôts, on effectue la révélation de l'activité inhibitrice pour déterminer la consommation dans le temps de l'inhibiteur actif en excès, l'autre série est colorée par le bleu Coomassie (figure 27).

Quand l'analyse électrophorétique est effectuée immédiatement après l'addition de PMSF sur un échantillon incubé pendant un temps court, l'inhibiteur actif en excès est bien visualisé (partie A de la figure 27). Après 24 et 48 heures d'incubation, on observe la disparition de la bande correspondante,

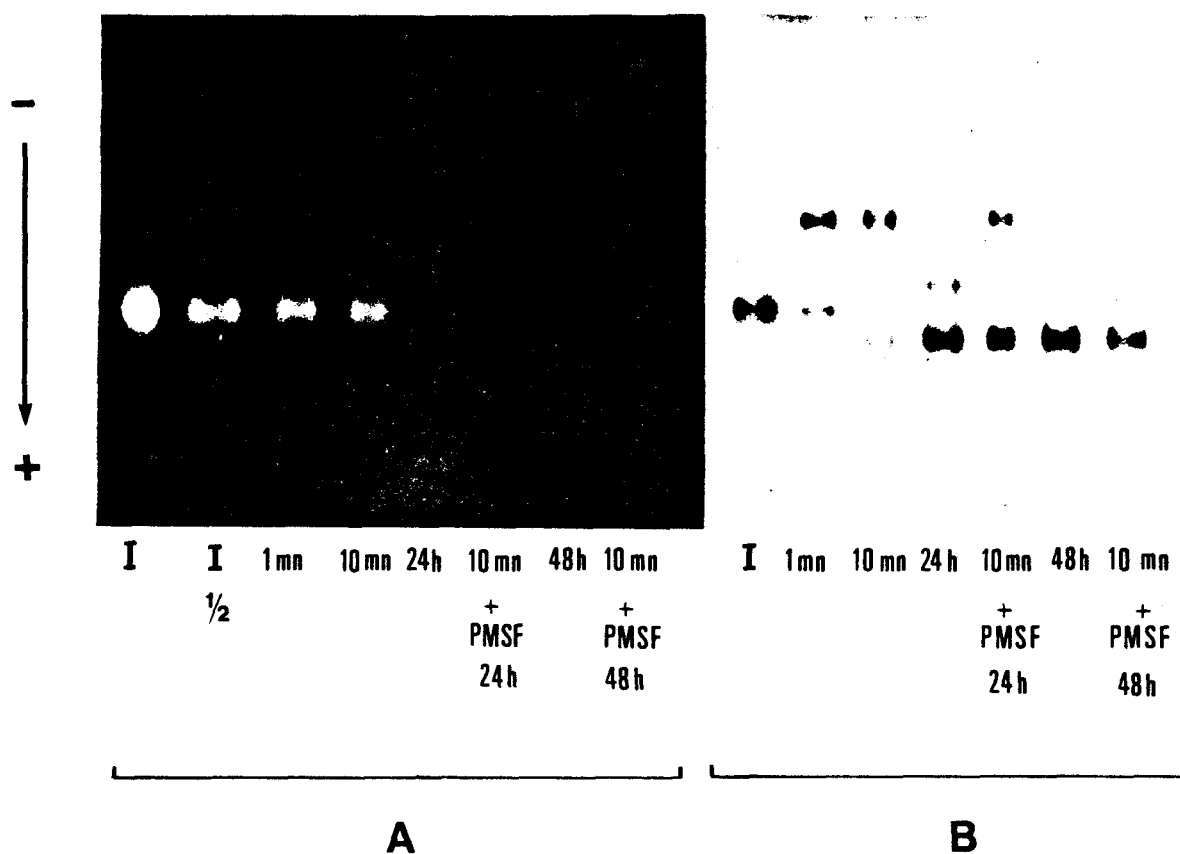


Figure 27 : Effet du PMSF sur l'évolution dans le temps d'un mélange α_1 Achy-chymotrypsine (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1).

Les mélanges identiques additionnés ou non de PMSF après 10 minutes d'incubation à 25° C sont conservés pendant des temps variables à la même température, puis étudiés en électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide) à pH 8,3.

A : révélation de l'activité inhibitrice.

B : coloration des protéines par le bleu Coomassie.

I : α_1 Achy native

I $\frac{1}{2}$: dilution au 1/2 de l' α_1 Achy native

que l'on ait ou non ajouté du PMSF. Il y a donc eu consommation de l'inhibiteur actif en excès. La révélation au bleu Coomassie (partie B de la figure 27) montre que 24 heures après l'addition de PMSF, on retrouve à la fois du complexe et de l'inhibiteur modifié. Dans l'échantillon gardé sans PMSF pendant 24 heures, le complexe équimoléculaire n'existe plus, on observe la forme modifiée d' α_1 Achy, ainsi qu'une forme dégradée de complexe. 48 heures après l'addition de PMSF, on obtient un électrophorégramme ressemblant beaucoup à ce que l'on a dans l'échantillon gardé sans PMSF pendant 24 heures, tandis que dans l'échantillon gardé sans PMSF pendant 48 heures, on peut constater que la dégradation du complexe s'est poursuivie. Le PMSF n'a donc pas stoppé définitivement le processus de consommation de l'inhibiteur actif en excès ni le processus de dissociation du complexe.

Ainsi donc l'hypothèse selon laquelle une sérine-protéase contaminante pourrait être la cause de la dissociation du complexe ne semble pas devoir être retenue pour le système étudié ; en effet dans ce cas, nous aurions dû constater un arrêt total des deux processus.

Selon JAMES (86), le PMSF en solution aqueuse perd progressivement son activité envers la chymotrypsine, en effet les ions hydroxyle produisent un phénomène d'hydrolyse. Quand le PMSF est devenu inactif, si le processus de dissociation se poursuit, l'enzyme alors libéré ne peut plus être inhibé. Le PMSF a donc pour résultat final apparent de ralentir le processus mais non de l'arrêter. L'hypothèse de LÖBERMANN et coll (124) ne semble donc pas confirmée pour le système que nous étudions. L' α_1 Achy est donc bien un inhibiteur temporaire de la chymotrypsine bovine dans toutes les conditions où nous avons effectué l'étude.

III - 5 REACTION AVEC LA CATHEPSINE G.

III - 5.1 Résumé des résultats présentés dans les publications n° 2 et 3.

Nous avons étudié l'interaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G leucocytaire en examinant des mélanges dans lesquels nous avons fait varier le rapport molaire inhibiteur/enzyme*. Nous avons observé qu'il y a simultanément formation d'un complexe équimoléculaire et production d' α_1 Achy modifiée inactive. Le rapport molaire inhibiteur/enzyme est calculé en tenant compte du contenu protéique total (matériel actif et inactif) pour l'inhibiteur comme pour l'enzyme.

* Le rapport molaire inhibiteur/enzyme est calculé en tenant compte du contenu protéique total (matériel actif et inactif) pour l'inhibiteur comme pour l'enzyme.

Il n'a pas été possible, par les techniques électrophorétiques utilisées, de différencier cette α_1 Achy inactive obtenue dès le début de la réaction de la forme d' α_1 Achy que l'on retrouve après dissociation complète du complexe. Lors de ce travail, en mesurant l'inhibition de la cathepsine G par l' α_1 Achy à l'aide de la méthode spectrophotométrique, nous avons établi que l'inhibition complète est atteinte pour un rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 1,1/1. Cependant, si la réaction est stoechiométrique, il est difficile de comprendre comment, après 10 minutes d'incubation à 0° C, on peut avoir dans un mélange presque équimolaire (rapport inhibiteur/enzyme = 0,92/1) coexistence à la fois du complexe stoechiométrique et d'inhibiteur sous forme inactive qui a donc déjà réagi avec la cathepsine G. Nous avons signalé dans la publication n° 2 qu'une certaine analogie se présente entre la réaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G et la réaction entre l'AT et la thrombine. Or, FISH et BJÖRK (61) suggèrent que l'obtention simultanée et rapide d'un complexe équimoléculaire et d'inhibiteur modifié sous forme libre est précédée par la formation d'un hypothétique complexe tétrahédrique non visualisé, puisque instable, qui subit très rapidement des réarrangements moléculaires.

Dans la publication n° 3, nous avons montré que le complexe α_1 -Achy-cathepsine G comme le complexe α_1 Achy-chymotrypsine se dissocie spontanément même si le mélange est conservé à 0° C. De plus, l'excès d'inhibiteur actif au départ est consommé dans le temps et ne figure plus parmi les constituants mis en évidence en fin de réaction.

L'étude en dichroïsme circulaire est une analyse directe du milieu réactionnel. Elle a permis de définir les spectres dichroïques de l' α_1 Achy et de la cathepsine G qui n'étaient pas encore décrits. Nous avons pu montrer que dès que l' α_1 Achy et la cathepsine G sont en contact, on enregistre entre 320 et 260 nm un spectre dichroïque différent du spectre théorique obtenu par addition des spectres dichroïques des deux constituants. Les variations du spectre dichroïque différentiel (spectre théorique-spectre expérimental) ont ensuite été suivies dans le temps. Quand le temps d'incubation augmente, on observe une évolution, mais le spectre dichroïque expérimental s'éloigne plutôt du spectre théorique, il n'y a donc pas retour aux constituants de départ.

III - 5.2 Questions posées par ces résultats et par l'utilisation d'une nouvelle préparation de cathepsine G.

L'hypothèse de la formation d'un complexe tétrahédrique comme

première étape de la réaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G en prenant pour exemple ce qui a été suggéré pour l'AT réagissant avec la thrombine (61) ne permet pas de répondre à toutes les questions. En effet, si l'inhibition totale est obtenue pour un rapport inhibiteur/enzyme égal à 1,1/1, qu'est devenue la cathepsine G qui a réagi avec les molécules d' α_1 Achy que l'on retrouve sous forme inactive ? Cette fraction d'enzyme ne peut exister sous forme active dans le mélange puisque le rapport inhibiteur/enzyme pour l'inhibition complète a été déterminé égal à 1,1/1. Une autre hypothèse qui ne semblait pas devoir être envisagée lorsque nous avons effectué ce travail est devenue ensuite, nous allons le voir, une évidence : une proportion relativement importante de l'enzyme se trouve sous forme inactive, le rapport molaire inhibiteur/enzyme exprimé en tenant compte du matériel actif est alors beaucoup plus élevé pour l'inhibition totale. Nous avons en effet, été amenée, il y a peu de temps, à utiliser une préparation de cathepsine G (préparation n° 2) différente de celle (préparation n° 1) utilisée pour les expériences présentées dans les deux publications et dans bon nombre d'essais qui figurent dans cette Thèse. Or l'activité spécifique déduite des constantes cinétiques de NAKAJIMA et coll (144) est beaucoup plus élevée ($\Delta = 0,0053/10^{-8}$ M/min) pour la préparation n° 2 que pour la préparation n° 1 ($\Delta = 0,0032/10^{-8}$ M/min). Sachant qu'on ne peut envisager qu'une préparation enzymatique soit "superactive", nous en déduisons que la préparation n° 1 était loin d'être complètement active. Nous ne disposons malheureusement pas du réactif spécifique (le p-nitrophényl carbazate d'acétylphénylalanine (164) non commercialisé) qui permettrait de titrer les sites actifs de la cathepsine G comme nous l'avons fait pour la chymotrypsine bovine (p : 98).

La figure 28 représente les courbes d'inhibition des préparations n° 1 et n° 2 de cathepsine G par l' α_1 Achy en fonction du rapport molaire inhibiteur/enzyme exprimé en tenant compte de la quantité totale de matériel dans les solutions (matériel actif et inactif). C'est la même préparation d' α_1 Achy qui est utilisée dans les deux cas, le pourcentage d'inhibiteur actif est donc identique dans les deux expériences. Une incubation préalable des mélanges est effectuée pendant 5 minutes à 25° C avant le dosage de l'activité enzymatique résiduelle par la méthode spectrophotométrique. On peut conclure des courbes figurant sur la figure 28 que si la préparation n° 2 est active à 95 % (d'après l'activité spécifique, en se référant aux données de NAKAJIMA et coll (144)), la préparation n° 1 de cathepsine G ne contient que 55 à 60 % d'enzyme actif.

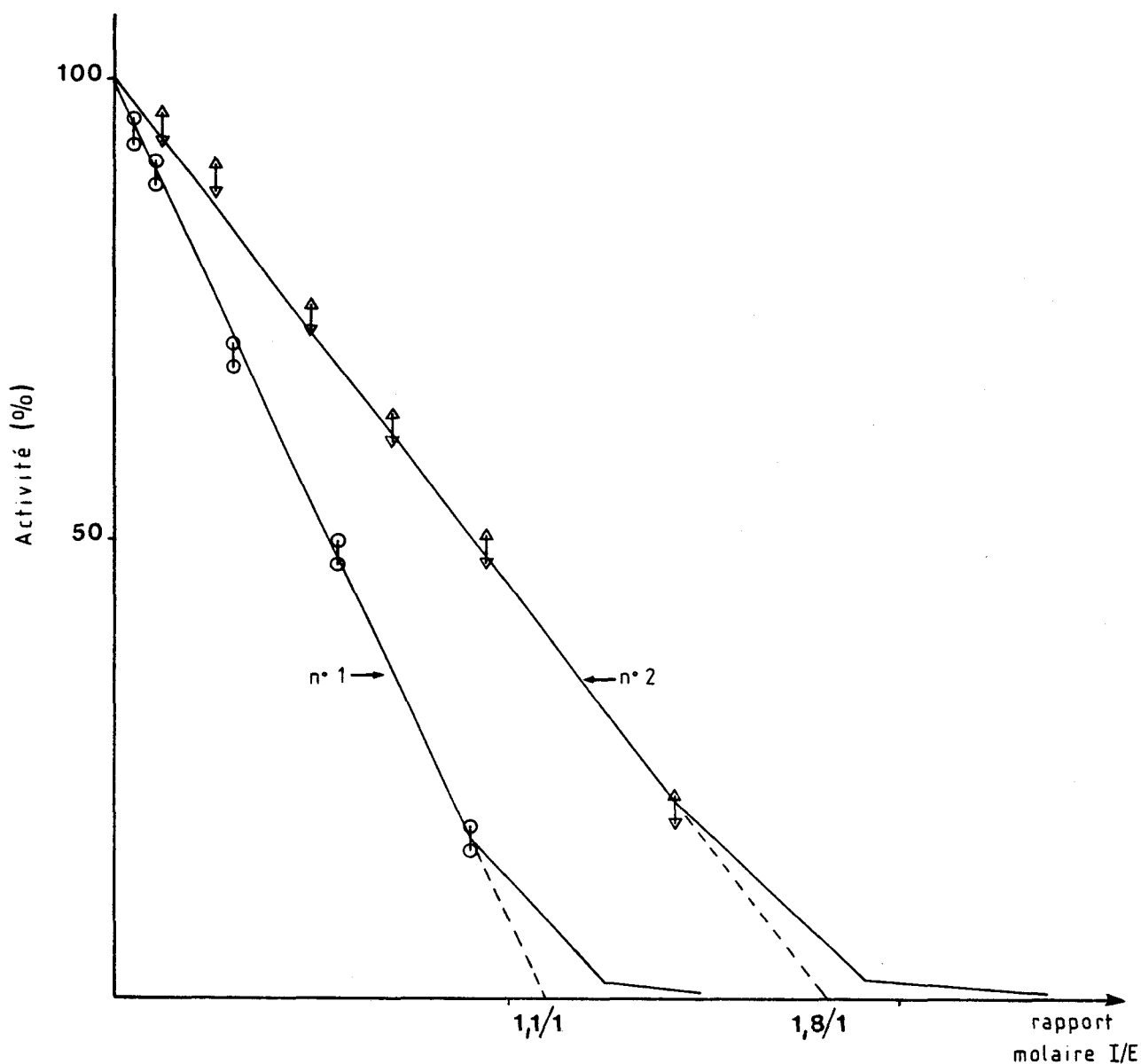


Figure 28 : Inhibition des préparations n° 1 et n° 2 de cathepsine G par l' α_1 Achy. A une quantité constante de cathepsine G, on ajoute des quantités croissantes d' α_1 Achy. Après 5 minutes d'incubation à 25° C, l'activité enzymatique résiduelle est mesurée par la méthode spectrophotométrique, les échantillons ayant été au préalable dilués (1 : 10) dans le tampon Hepes.

I/E : inhibiteur/enzyme.

Le rapport 1,1/1 établi dans la publication n° 2 pour l'inhibition complète de la cathepsine G par l' α_1 Achy devient égal à 1,75/1 ou 1,7/1 si l'on considère que l'enzyme est actif à 55 ou 60 % et que l'inhibiteur est actif à 90 %. Il y a donc comme pour la réaction de l' α_1 Achy avec la chymotrypsine bovine, consommation de plus de molécules d' α_1 Achy que prévu pour une réaction stoechiométrique. Nous avons donc suivi l'évolution dans le temps des produits de la réaction pour tenter d'avoir une explication de ce phénomène. Nous avons de plus essayé de déterminer si nous avions à faire à un processus identique à celui que nous avons été amenée à proposer pour la réaction de l' α_1 Achy avec la chymotrypsine bovine, c'est à dire un processus d'inhibition temporaire.

Dans les expériences qui vont suivre, le rapport molaire inhibiteur/enzyme est exprimé en tenant compte du contenu protéique total (matériel actif et inactif) pour l'inhibiteur comme pour l'enzyme. Le rapport molaire en matériel actif n'est précisé que dans quelques expériences de dosage.

III - 5.3 Stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G dans un mélange préparé en présence d'inhibiteur en excès.

Nous avons démontré dans la publication n° 3 que le complexe α_1 Achy-cathepsine G n'est pas stable, même à 0° C, quand nous prolongeons le temps d'incubation. De plus, si de l'inhibiteur actif est en excès au début de la réaction, il est consommé au cours du temps. Par ailleurs, nous n'avons pu mettre en évidence de réapparition d'activité enzymatique (mesurée à 25° C) lors de ces mêmes expériences. Nous avons donc étudié en fonction de la durée d'incubation les constituants d'un mélange α_1 Achy-cathepsine G, préparé en excès d'inhibiteur, à l'aide des méthodes suivantes : dosage de l'activité enzymatique, électrophorèse et immunoélectrophorèse.

III - 5.3.1 Dosage de l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps d'incubation.

Un mélange d' α_1 Achy et de cathepsine G (préparation n° 1) est préparé dans un rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 2/1 (c'est-à-dire 3/1 si l'on considère les proportions de matériel actif pour l'inhibiteur comme pour l'enzyme). Ce mélange est incubé à 25° C. Après des temps d'incubation variables, la mesure de l'activité enzymatique résiduelle est effectuée par la méthode spec-

trophotométrique sur des parties aliquotes du mélange. La diminution de l'activité est très rapide : l'activité résiduelle est de l'ordre de 1 % après 1 minute d'incubation, puis devient ensuite non significative. Même après 5, 24 ou 48 heures d'incubation, nous n'observons pas de réapparition d'activité enzymatique comme celle que nous avons observée dans un mélange α_1 Achy-chymotrypsine bovine préparé également en excès d'inhibiteur.

III - 5.3.2 Préparation des échantillons pour les études électrophorétiques.

Lors d'études préliminaires de la stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G, nous avons observé que le complexe se dissociait très rapidement. Nous avons donc préféré reprendre le même type de préparation des échantillons que celui adopté pour l'étude de la stabilité du complexe α_1 Achy-chymotrypsine (voir III - 4.4.2.2). Ainsi le PMSF est ajouté au même moment à tous les échantillons qui ont été auparavant incubés pendant des temps variables. Le mélange de contrôle est préparé en ajoutant à l' α_1 Achy de la cathepsine G préalablement inactivée par le PMSF pour obtenir également un rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 2/1. Des séries comportant des temps d'incubation différents ont été étudiées. D'une série à l'autre, on conserve quelques temps d'incubation identiques afin de contrôler la reproductibilité des expériences.

III - 5.3.3 Etude en SDS-PAGE.

Deux séries différentes sont étudiées : pour l'une les temps d'incubation sont de 1 mn, 5 mn, 10 mn, 30 mn, 1 h, 1 h 30, 2 h et 1 mois 1/2 ; pour l'autre, de 1 mn, 10 mn, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h et 8 jours. Les électrophorégrammes obtenus pour les échantillons des deux séries sont présentés figure 29. La formation du complexe équimoléculaire de $M_r = 78\ 000 - 79\ 000$ est observée dès le temps d'incubation 1 minute. A partir de 30 minutes d'incubation, il y a diminution progressive de la bande de ce complexe alors qu'est visualisé un constituant de M_r intermédiaire ($M_r = 67\ 000$). Le complexe de M_r proche de 78 000 disparaît progressivement quand le temps d'incubation se prolonge au delà de 30 minutes. Simultanément, la M_r apparente du constituant intermédiaire diminue progressivement pour atteindre après 24 ou 48 heures d'incubation une M_r

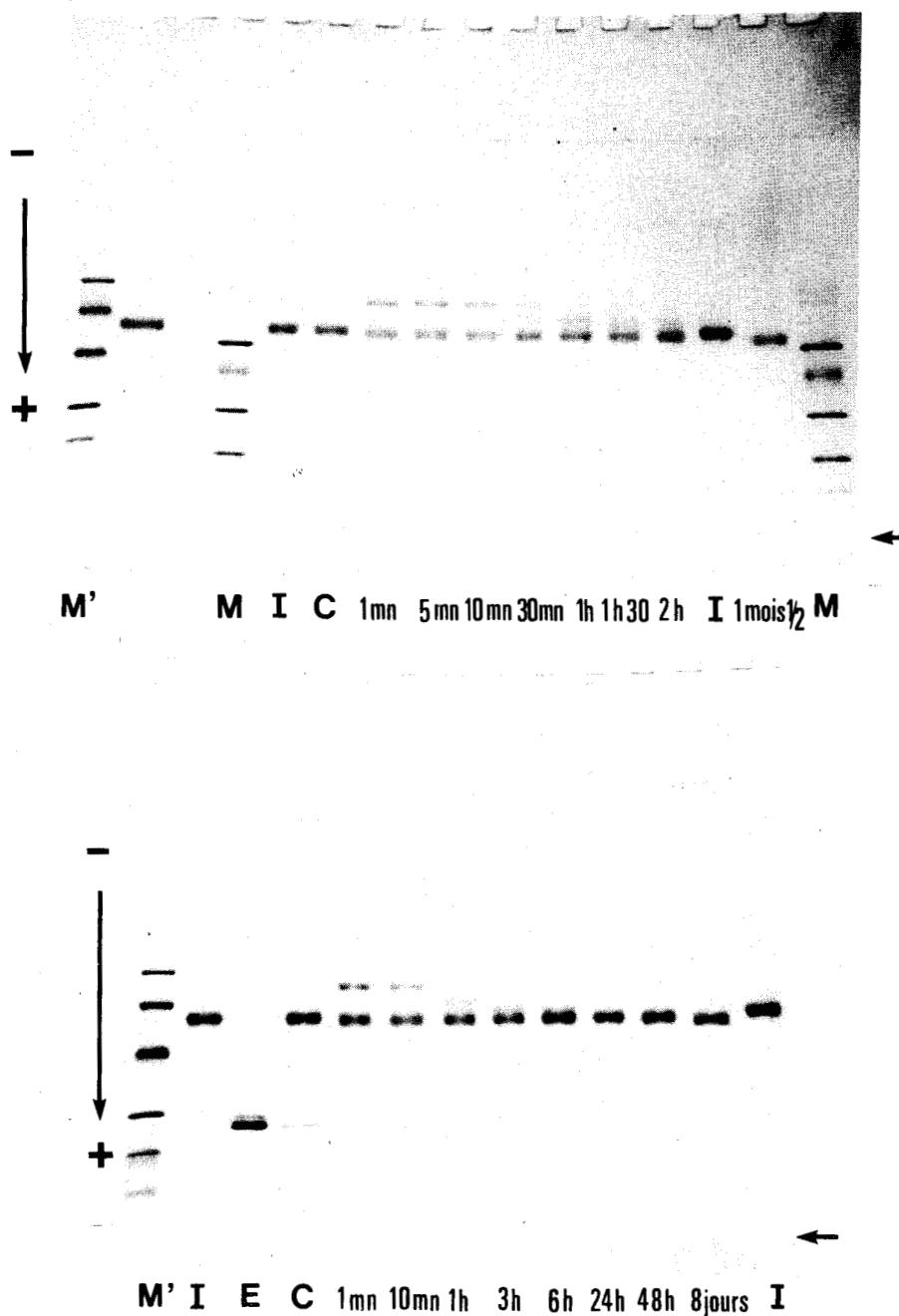


Figure 29 : Variation en fonction du temps du profil électrophorétique en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS d'un mélange α_1 Achy-cathepsine G (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1) incubé à 25° C.

Le PMSF est ajouté au mélange après le temps d'incubation indiqué pour chaque échantillon.

- M et M' : témoins de M_r
- I : α_1 Achy native
- C : mélange de contrôle (voir page 96)
- E : cathepsine G

Seul M' est réduit.

La bande migrant comme un constituant protéique de M_r proche de 6 000 est indiquée par la flèche.

proche de 56 500. Après 8 jours d'incubation, la bande observée correspond à un constituant de M_r 55 000 qui présente donc la même migration que l' α_1 Achy modifiée obtenue après action de la chymotrypsine. Le mélange analysé après 1 mois 1/2 d'incubation donne le même électrophorégramme que celui obtenu après 8 jours d'incubation.

Dans tous les mélanges α_1 Achy-cathepsine G active, on peut observer une bande diffuse (indiquée par une flèche, figure 29) ayant la même migration qu'un constituant protéique de M_r proche de 5 à 6 000.

III - 5.3.4 Etude électrophorétique en gel de polyacrylamide en absence d'agent dénaturant (à pH 8,3).

Sur une première série dont les temps d'incubation sont de 1 mn, 5 mn, 10 mn, 30 mn, 1 h, 1 h 30 et 2 h, on effectue, après l'électrophorèse, la révélation de l'activité inhibitrice. Seuls les échantillons ayant été incubés pendant 1 mn, 30 mn et 1 h sont également colorés par le bleu Coomassie (figure 30). On peut constater que l'inhibiteur actif, encore révélé dans les échantillons incubés pendant des temps courts, n'est plus décelable dans les mélanges qui ont été incubés pendant plus de 1 heure.

Deux autres séries sont étudiées en électrophorèse à pH alcalin puis colorées par le bleu Coomassie. Pour l'une, les temps d'incubation sont de 1 mn, 5 mn, 10 mn, 30 mn, 1 h, 2 h, 3 h 30, 5 h 30, 24 h et 50 h ; pour l'autre, de 1 mn, 10 mn, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h et 8 jours. Les électrophorégrammes sont présentés figure 31. Dans ce système électrophorétique, seul le matériel coloré qui reste à l'interface entre le gel de concentration et le gel de séparation peut rendre compte du complexe équimoléculaire. L'intensité de coloration de ce matériel diminue en effet lorsque le temps d'incubation augmente ; il a complètement disparu après 2 h d'incubation. Dans les dépôts correspondant aux temps les plus courts d'incubation, on peut déjà remarquer une nette augmentation de la bande d' α_1 Achy inactive (une faible bande est toujours observée à ce niveau dans la solution d' α_1 Achy native). Cette bande d' α_1 Achy inactive qui correspond à l' α_1 Achy modifiée est le seul constituant visible après 8 jours d'incubation.

Avant d'arriver à ce constituant final, on peut observer l'apparition, après 3 h 30 d'incubation, d'une bande (a') qui migre à peu près au niveau

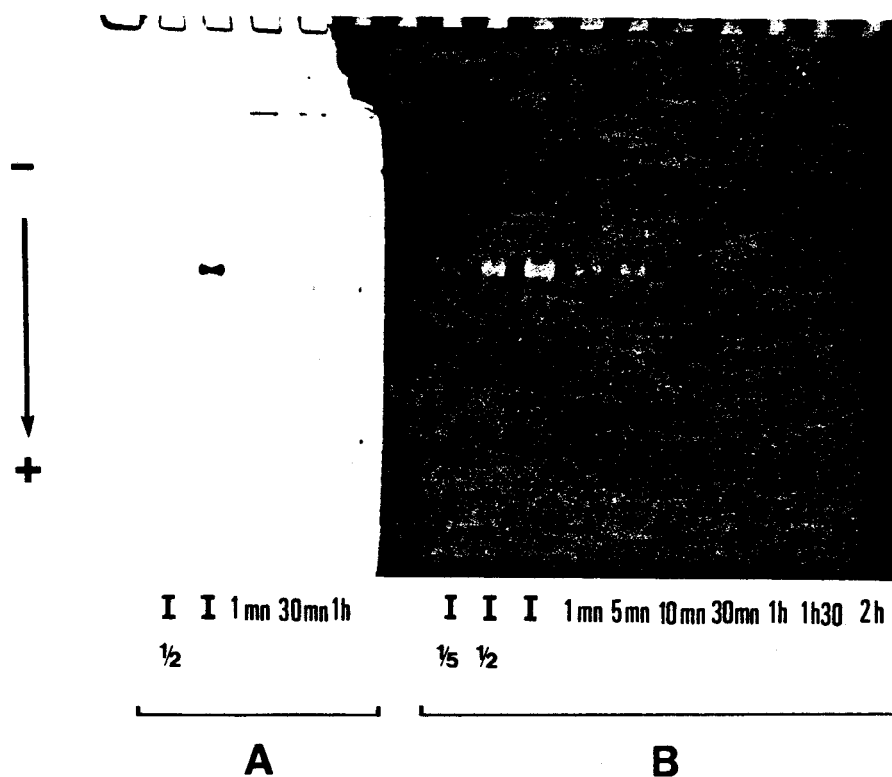


Figure 30 : Consommation au cours du temps de l'excès d' α_1 Achy active présente au début de la réaction dans un mélange d' α_1 Achy et de cathepsine G préparé dans un rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1 et incubé à 25° C.

L'étude est effectuée en électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide) à pH 8,3. Le PMSF est ajouté au mélange après le temps d'incubation indiqué pour chaque échantillon.

Partie A : coloration des protéines par le bleu Coomassie

Partie B : révélation de l'activité inhibitrice.

I : α_1 Achy native

$I_{1/2}$ et $I_{1/5}$: dilutions au 1/2 et au 1/5 de l' α_1 Achy native.

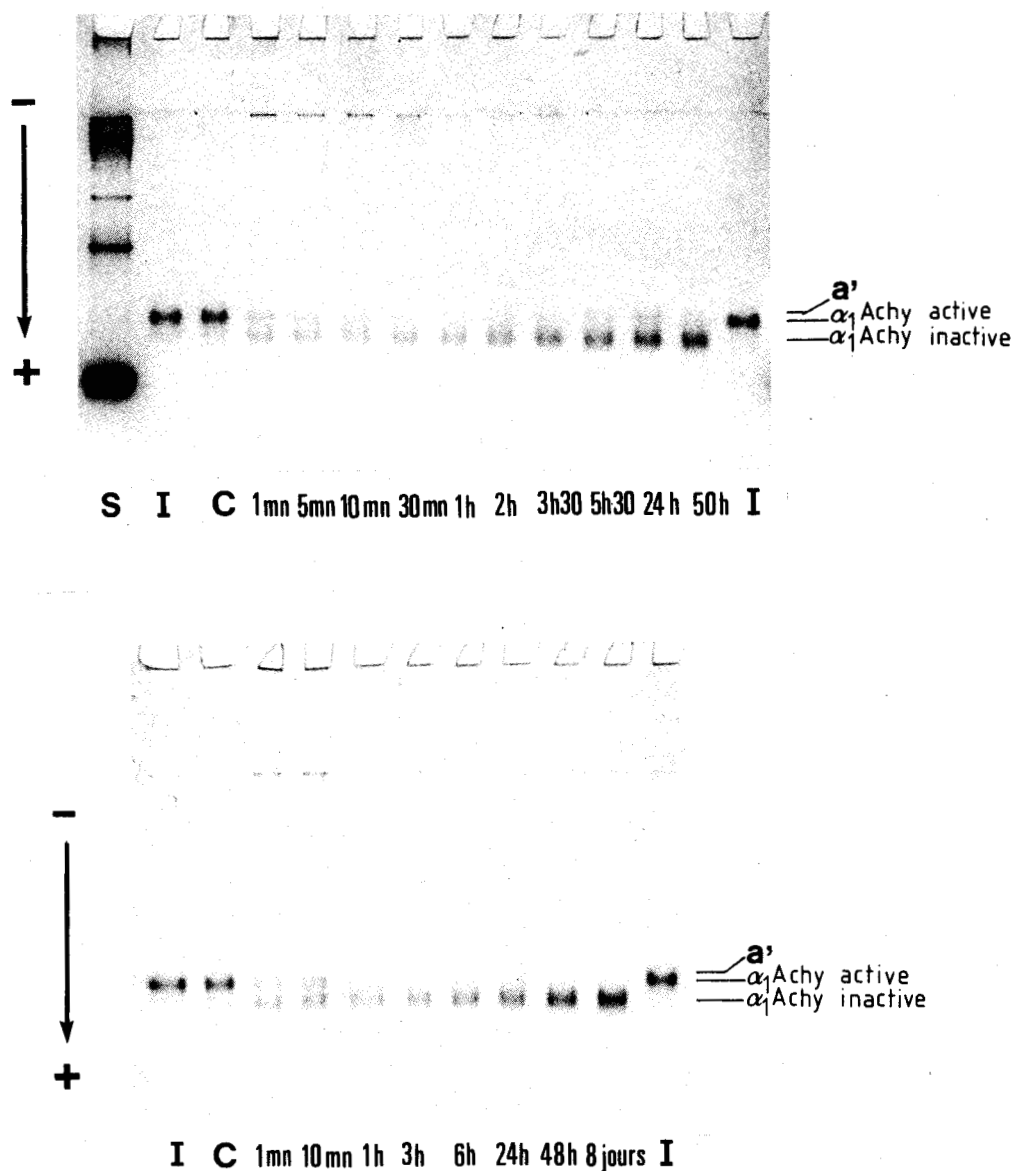


Figure 31 : Variation en fonction du temps du profil électrophorétique en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide) à pH 8,3 d'un mélange α_1 Achy-cathepsine G (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1) incubé à 25° C.

Le PMSF est ajouté au mélange après le temps d'incubation indiqué pour chaque échantillon.

S : sérum humain normal

I : α_1 Achy native

C : mélange de contrôle (voir page 96)

a' : forme dégradée de complexe.

de l' α_1 Achy active ; elle n'a pas d'activité envers la chymotrypsine utilisée pour la mise en évidence de l'activité inhibitrice. L'intensité de cette bande (a') paraît maximale après 24 h d'incubation. Rappelons qu'en SDS-PAGE, on observe une bande dont la M_r moyenne est estimée à 56 500 environ dans cet échantillon. Par analogie avec ce qui a été observé au cours de la réaction de l' α_1 Achy avec la chymotrypsine, la bande (a') correspondrait donc vraisemblablement à un complexe dont la partie enzyme serait très profondément dégradée. Après 8 jours d'incubation à 25° C, seule subsiste l' α_1 Achy modifiée.

III - 5.3.5 Etude en électrophorèse en gel d'agarose à pH 8,6.

Quelques-uns des échantillons précédents ont été analysés en électrophorèse en gel d'agarose à pH 8,6 : le complexe α_1 Achy-cathepsine G n'est pas nettement visualisé, seule une traînée du côté anodique du puits de dépôt peut rendre compte du complexe (résultats non illustrés). Il ne semble pas, en tout cas, que l'on puisse attribuer au complexe une migration cathodique dans ce système électrophorétique identique à celui utilisé dans la technique d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle (voir paragraphe suivant). La cathepsine G seule précipite dans ce milieu peu ionisé ; en effet, sa très faible migration cathodique ne correspond pas à celle que doit avoir un constituant aussi basique.

III - 5.3.6 Analyse immunologique.

Cette analyse a été effectuée essentiellement en immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy (DAKO). Les diagrammes obtenus pour des mélanges incubés pendant 1 mn, 10 mn, 1 h, 5 h 30, 24 h puis 50 h, ainsi que pour l'inhibiteur natif sont rassemblés figure 32. Les contours des pics de précipitation sont reproduits sur une feuille de papier, puis les surfaces ainsi délimitées sont découpées et pesées. La surface du pic de précipitation obtenu pour la même quantité initiale d'inhibiteur natif sert de référence et représente 100 %. On exprime la surface du pic obtenu pour chacun des mélanges en pourcentage de la surface de référence (tableau IX).

Les surfaces des pics obtenus pour les temps courts d'incubation, 1 mn et 10 mn, représentent respectivement 65 et 60 % de celle de la référence. Aucun pic de précipitation pouvant correspondre au complexe α_1 Achy-cathepsine G n'est mis en évidence. Lors de l'électrophorèse en première dimension déjà, il n'avait pas été possible de visualiser nettement ce complexe (voir III - 5.3.5) ; outre ce phénomène, il se peut que les sites antigéniques de l' α_1 Achy soient masqués dans le complexe, comme cela a pu être montré pour le complexe α_1 Achy-chymotrypsine.

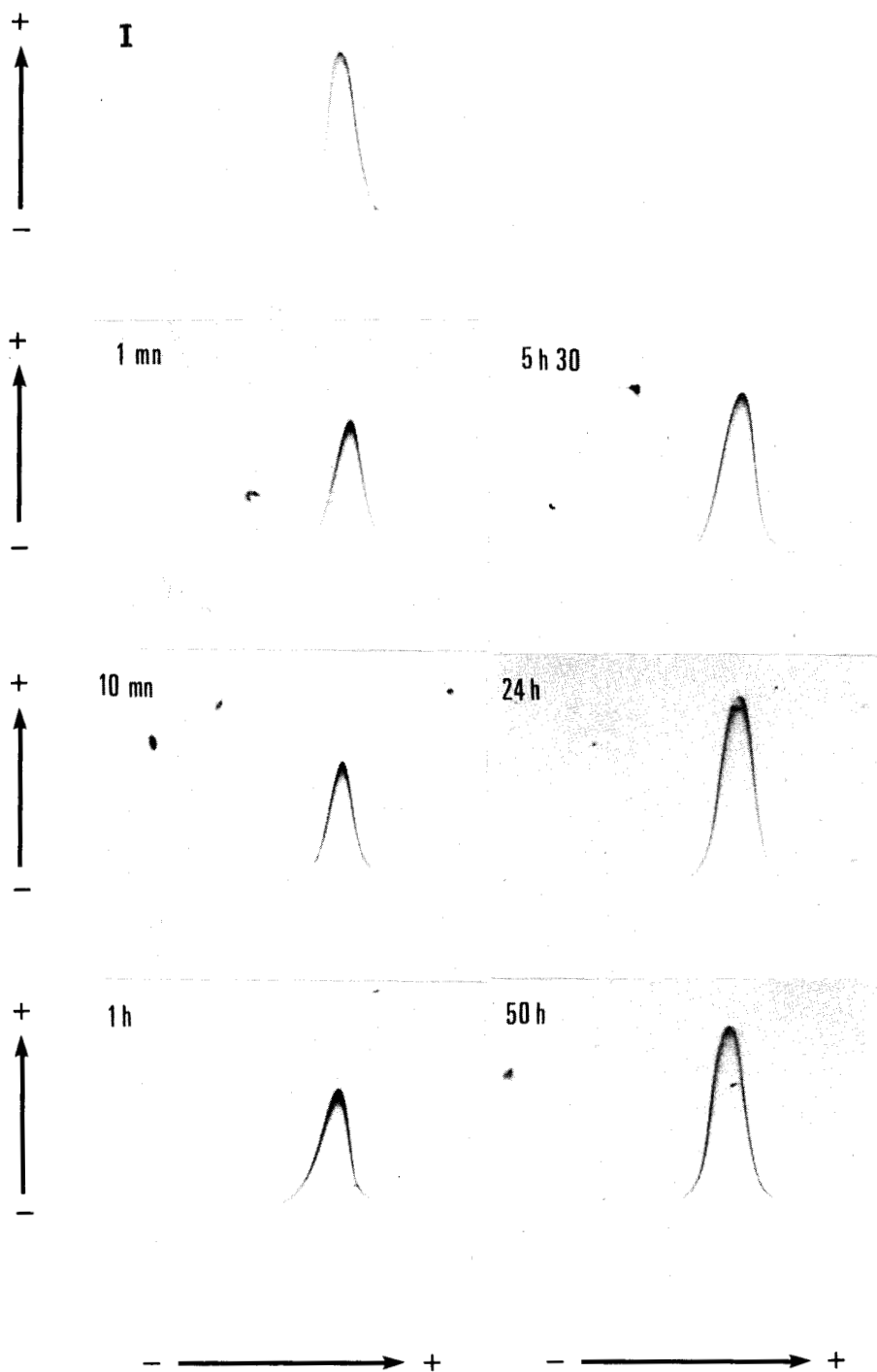


Figure 32 : Variation dans le temps du diagramme obtenu en immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec un mélange α_1 Achy-cathepsine G (préparation n° 1) en rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1. L'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy est utilisé en deuxième dimension.
I : α_1 Achy native.
Les temps indiqués sont les temps d'incubation du mélange.

TABLEAU IX

Comparaison des surfaces des pics de précipitation des diagrammes immunoélectrophorétiques présentés figure 32.

La surface du pic de l' α_1 Achy native est prise comme référence.

α_1 Achy native	100 %
Mélange incubé 1 minute	65 %
10 minutes	60 %
1 heure	75 %
5 heures 30	100 %
24 heures	115 %
50 heures	125 %

Le pic de précipitation observé est dû à la fois à l' α_1 Achy active qui existe encore et à l' α_1 Achy modifiée déjà présente. Remarquons que le pic de précipitation correspondant à l'échantillon incubé pendant 1 heure est nettement dissymétrique, présentant une pente plus faible du côté cathodique.

Pour les mélanges incubés plus longtemps, la surface du pic de précipitation augmente avec le temps d'incubation jusqu'à devenir supérieure à celle de la référence après 24 ou 50 heures. Nous avons observé ce même phénomène lors de l'étude des mélanges α_1 Achy-chymotrypsine (III - 4.4.2.4).

On remarque, comme lorsque l' α_1 Achy réagissait avec la chymotrypsine, que la ligne de précipitation obtenue après addition de l'enzyme est plus dense que celle qui est formée par l'inhibiteur natif. Ce phénomène est également observé si l'on étudie ces échantillons à l'aide d'autres techniques d'immunoprécipitation. Nous avons comparé en rocket et en immunodiffusion radiale (figure 33) une solution d' α_1 Achy native (I) et un mélange α_1 Achy-cathepsine G préparé en rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 2/1. Les dépôts sont effectués après 10 minutes d'incubation. La même quantité initiale d'inhibiteur est déposée pour les deux échantillons. On peut constater que dans ces deux techniques également l'addition de cathepsine G à l' α_1 Achy provoque la formation d'un arc ou d'un anneau de précipitation plus dense délimitant une surface inférieure à celle obtenue pour la même quantité d'inhibiteur natif. Par ailleurs, on constate que la gamme d'étalonnage préparée à partir de dilutions d'un plasma standard (BEHRING) présente, comme l'inhibiteur natif, un pic de précipitation moins bien défini que celui obtenu avec le mélange α_1 Achy-cathepsine G.

A la suite de tous ces résultats, il semble que l'immunsérum "reconnaisse" mieux la forme modifiée que la forme native de l'inhibiteur. Nous en déduisons ou bien que l'immunsérum a été préparé avec de l' α_1 Achy déjà sous forme modifiée, ou bien que l' α_1 Achy native injectée à l'animal a, "in vivo", subi la transformation en α_1 Achy modifiée envers laquelle l'animal a alors fabriqué les anticorps.

Les réactions d'immunoprécipitation obtenues laissent penser

1) que l' α_1 Achy engagée dans le complexe ne peut plus réagir avec les anticorps,

2) que certains déterminants antigéniques existant dans la forme modifiée d' α_1 Achy sont masqués ou absents dans la forme native de l' α_1 Achy. Ce deuxième point a déjà été démontré pour l'antithrombine III (46, 53, 115, 211).

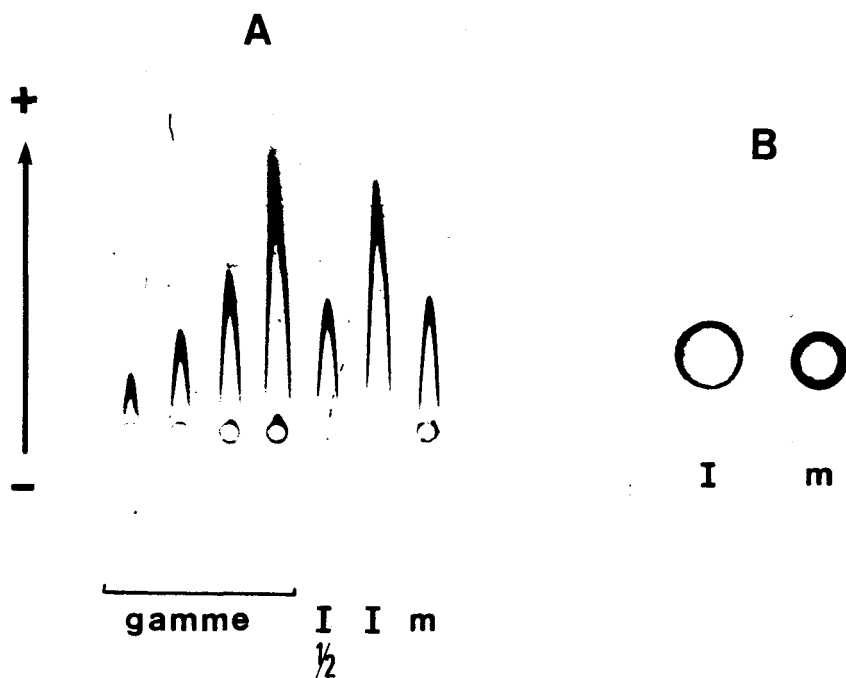


Figure 33 : Comparaison de l'immunoprécipitation d'un mélange α_1 Achy-cathepsine G (m) et de la même quantité initiale d'inhibiteur natif (I) en :

A : électro-immunodiffusion

B : immunodiffusion radiale.

Le mélange est préparé dans un rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 2/1 et déposé après 10 minutes d'incubation à 25° C.

La gamme est préparée à l'aide de dilutions d'un plasma standard BEHRING.

3) que la migration plus anodique de la forme modifiée d' α_1 Achy ainsi que sa M_r plus faible comparées à celles de l' α_1 Achy native peuvent, en partie au moins, expliquer l'obtention à la fin de la dissociation d'un pic de précipitation de surface supérieure à celle observée avec la même quantité d' α_1 -Achy native.

III - 5.3.7 Etude en isoélectrofocalisation.

Les études électrophorétiques à pH alcalin et en absence d'agent dénaturant ne nous ayant pas permis de suivre de façon précise l'évolution dans le temps des mélanges α_1 Achy-cathepsine G, nous avons effectué une étude en isoélectrofocalisation. A 35 ml d'Isogel à 1 % dans l'eau, nous ajoutons les quantités suivantes de Pharmalytes (PHARMACIA) pour chacune des gammes de pH indiquées :

0,5 ml	(pH 2,5 - 5)
0,66 ml	(pH 4 - 6,5)
0,66 ml	(pH 6,5 - 9)
0,5 ml	(pH 8 - 10,5)

Après avoir déposé les différents échantillons indiqués dans la figure 34, on effectue l'isoélectrofocalisation de la même façon que précédemment (p : 65). Après fixation et coloration (voir p. T 11), on trace la courbe du gradient de pH d'après la migration des marqueurs de pI (figure 34). On peut observer que l' α_1 Achy native migre sous la forme de 5 bandes, dont 3 majeures, entre les valeurs de pI égales à 3,9 et 4,35. Comme précédemment, la cathepsine G précipite dans ce milieu désionisé avant d'atteindre son pI (nettement supérieur à 8,65, dernière valeur inscrite). Dans le mélange déposé après 10 minutes d'incubation, on voit apparaître un constituant présentant un pI proche de 6,5 qui n'existait ni dans l' α_1 Achy, ni dans la cathepsine G. Puisque nous avons rencontré des problèmes pour la détermination du pI de la cathepsine G, nous ne pouvons être absolument certaine qu'un problème analogue ne se pose pas pour la détermination du pI du complexe qui renferme de la cathepsine G. Après 1 h 30 d'incubation, ce constituant a disparu, on observe par contre une zone colorée aux alentours du pI = 5,2 ; après 24 h d'incubation, cette zone colorée a disparu également. On peut remarquer que dès les temps d'incubation les plus courts, l'addition de cathepsine G provoque l'apparition de bandes plus acides que celles qui existent dans l' α_1 Achy native.

Les trois mélanges incubés pendant des temps différents ont été, après l'isoélectrofocalisation, soumis à une deuxième dimension dans de l'Isogel en tampon véronal lactate de pH 8,6 contenant l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy.

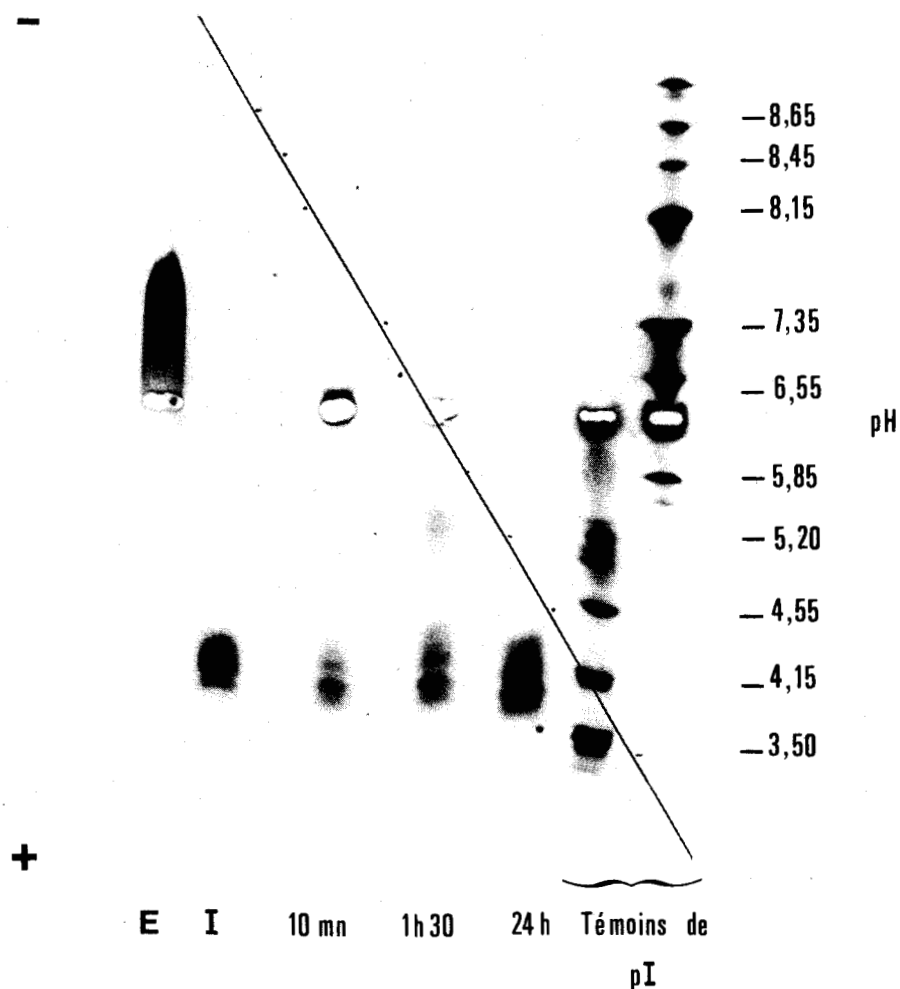


Figure 34 : Analyse en isoélectrofocalisation des constituants d'un mélange α_1 Achy-cathepsine G.

Le mélange préparé dans un rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 2/1 est déposé après 3 temps d'incubation différents à 25° C.

E : cathepsine G
I : α_1 Achy native

Pour éviter des phénomènes de précipitation non spécifique des anticorps au contact de la partie acide de la bande d'Isogel ayant subi l'isoélectrofocalisation, il est nécessaire de ménager une "barrière" de 1 cm environ constituée par de l'Isogel (en tampon véronal lactate de pH 8,6) sans immunsérum. Les diagrammes obtenus sont présentés figure 35. Rappelons que l'Isogel est un gel dépourvu d'électroendosmose ; par conséquent, les résultats obtenus dans ces expériences ne sont pas directement comparables à ceux obtenus en immunoélectrophorèse bidimensionnelle en agarose Indubiose présentés figure 32. Les constituants de pI proche de 6,5 et de 5,2 observés respectivement après 10 mn et 1 h 30 (figure 35) renferment du matériel immunologiquement rattaché à l' α_1 Achy puisqu'après la deuxième dimension, on peut mettre en évidence à ces niveaux un arc de précipitation avec les anticorps spécifiques de l' α_1 Achy ; cet arc présente une communauté antigénique avec l'arc observé dans la zone de pI proche de 4,0. Il ne nous a pas été possible, jusqu'à présent, de déterminer, par l'utilisation de l'immunsérum anti-cathepsine G par exemple, si la cathepsine G se trouve également au niveau de ces arcs. Nous pouvons donc nous demander si les arcs de précipitation observés figure 35 au niveau des pI 6,5 et 5,2 correspondent aux différentes formes de complexe (équimolaire et dégradé appelé a', après 10 mn et 1 h 30 respectivement, figure 31), ou s'ils sont produits seulement par les molécules d'inhibiteur modifié dissociées de la partie enzymatique du complexe et capables de migrer lors de la deuxième dimension. Cette deuxième hypothèse serait, d'après nous, la plus plausible ; nous pouvons en effet remarquer que dans le gel servant de première dimension, il reste du matériel coloré par le bleu Coomassie au niveau des pI 6,5 et 5,2, pouvant rendre compte des constituants qui n'ont pas migré au cours de la deuxième dimension. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait trouver un moyen de visualiser la cathepsine G.

III - 5.4 Stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G lorsqu'une activité enzymatique résiduelle existe dans le mélange au début de la réaction.

Il est intéressant de déterminer si l'instabilité du complexe est identique ou accrue lorsqu'une activité enzymatique résiduelle existe dans le mélange au début de la réaction. Une première série de mélanges avec des temps d'incubation relativement courts (10 s, 1 mn, 5 mn, 10 mn, 30 mn, 1 h, 1 h 30, 3 h) a été effectuée en utilisant la préparation n° 1 de cathepsine G. Le mélange en rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 0,8/1 (soit 1,1/1 si l'on tient compte seulement de la proportion de matériel actif) présente encore 40 % d'activité enzymatique résiduelle après 5 minutes d'incubation à 25° C.

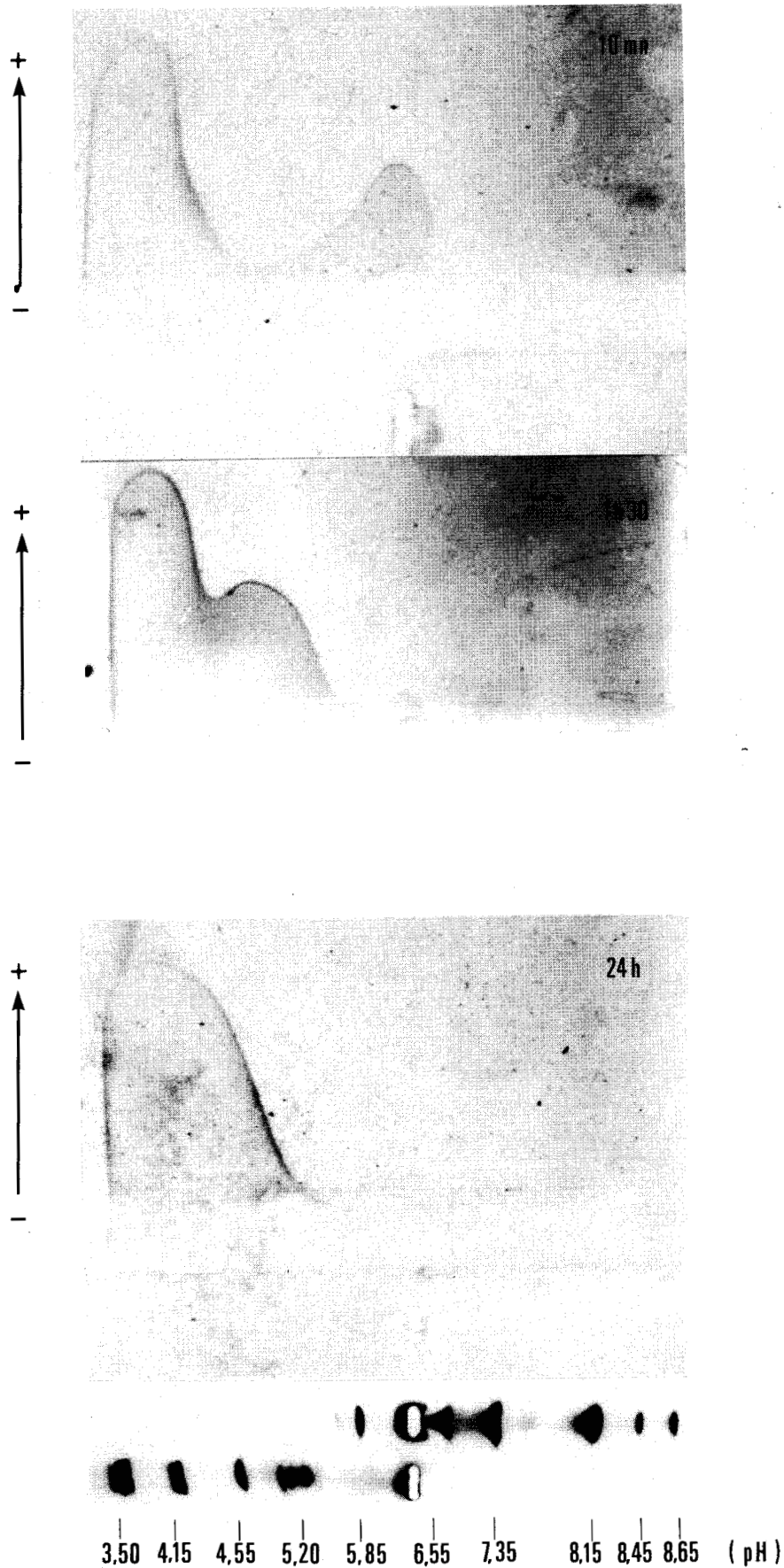


Figure 35 : Variation en fonction du temps du diagramme immunoélectrophorétique après isoélectrofocalisation d'un mélange α_1 Achy-cathepsine G (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1). Après une première dimension en isoélectrofocalisation, les échantillons sont soumis à une deuxième dimension dans un gel contenant l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy. Les temps indiqués sont les temps d'incubation du mélange à 25° C.

Des temps d'incubation plus longs, 1, 2 et 3 jours, ainsi qu'un temps d'incubation de 10 mn (pour vérifier si nous avons le même résultat que dans la série précédente) ont ensuite été appliqués en utilisant la préparation n° 2 de cathepsine G pour déterminer à quel produit de dégradation ultime peut aboutir la réaction dans ces conditions. On prépare les mélanges pour obtenir un rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 1,1/1 en ne tenant compte que de la proportion de matériel actif pour être dans les mêmes conditions que dans la première série. Ces mélanges renferment encore 40 % d'activité enzymatique résiduelle après 5 minutes d'incubation à 25° C. Comme précédemment les mélanges sont incubés à 25° C.

III - 5.4.1 Etude en SDS-PAGE.

La série complète des temps d'incubation des mélanges préparés avec la préparation n° 1 de cathepsine G est présentée (partie A de la figure 36). En ce qui concerne la deuxième série, nous ne faisons figurer que l'échantillon incubé pendant 3 jours. L'échantillon incubé pendant 10 min dans cette série donne le même résultat que celui qui a été incubé pendant le même temps dans la première série. Après 1,2 ou 3 jours, les résultats sont identiques, nous avons choisi de faire figurer le temps d'incubation le plus long (partie B).

On peut observer dans tous les mélanges contenant de la cathepsine G active, la bande diffuse ayant la même migration qu'un constituant protéique de M_r proche de 5 à 6 000 (indiquée par une flèche, elle n'est pas très visible sur les photographies). Dès les temps très courts d'incubation (10 s et 1 mn dans la partie A de la figure 36), on assiste à la formation simultanée du complexe équimoléculaire de M_r proche de 78 000 et du complexe intermédiaire de $M_r = 67 000$; à ces deux bandes s'ajoute une bande correspondant à une M_r un peu inférieure à celle de l' α_1 Achy native.

Les deux formes de complexe disparaissent assez rapidement et ne sont plus retrouvées au-delà de 30 minutes d'incubation. On n'observe plus alors que l'excès d'enzyme et une bande dont la M_r diminue progressivement quand le temps d'incubation augmente pour atteindre après 24 h d'incubation une M_r de 55 000 ; il n'y a ensuite plus de modifications. Même en présence d'excès de cathepsine G la dégradation de l' α_1 Achy ne se poursuit donc pas au-delà de la forme d' α_1 Achy de $M_r = 55 000$.

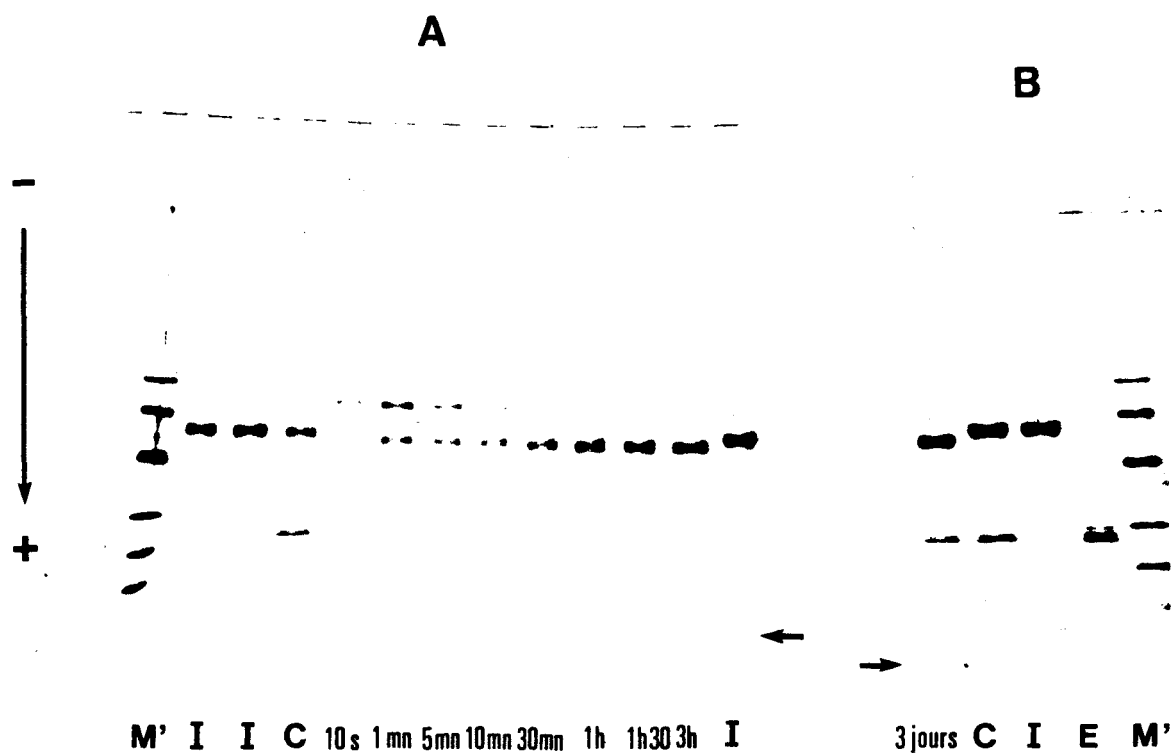


Figure 36 : Variation en fonction du temps du profil électrophorétique en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS d'un mélange α_1 Achy-cathepsine G préparé en présence d'activité enzymatique en excès et incubé à 25 ° C.

Le PMSF est ajouté au mélange après le temps d'incubation indiqué pour chaque échantillon.

M' : témoins de M_r

I : α_1 Achy native

C : mélange de contrôle (voir page 96)

E : cathepsine G

Seul M' est réduit.

Partie A : 1ère série de mélanges (avec la préparation n° 1 de cathepsine G).

Partie B : mélanges préparés avec la préparation n° 2 de cathepsine G

III - 5.4.2 Etude électrophorétique en gel de polyacrylamide en absence d'agent dénaturant.

Seuls les résultats obtenus avec la première série, dans laquelle est utilisée la préparation n° 1 de cathepsine G, sont ici illustrés (figure 37). Dans les échantillons incubés pendant un temps inférieur ou égal à 10 minutes, on n'observe qu'une bande migrant comme l' α_1 Achy modifiée inactive et un peu de matériel coloré par le bleu Coomassie qui reste à l'interface entre le gel de concentration et le gel de séparation et qui traduit la présence du complexe équimoléculaire. Après 30 minutes d'incubation apparaît la bande a' déjà mise en évidence auparavant (p : 132). Cette bande dont l'intensité augmente jusqu'à 3 heures d'incubation au moins correspond à une forme dégradée du complexe. Dans les mélanges de la deuxième série qui ont été incubés pendant des temps beaucoup plus longs (jusqu'à 3 jours), le seul constituant visualisé dans ce système électrophorétique est l' α_1 Achy modifiée.

Ainsi donc l'instabilité du complexe est plus grande lorsqu'une activité enzymatique résiduelle existe dans le mélange au début de la réaction.

III - 5.5 Etude de la stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G en présence de PMSF.

Lors de l'étude de la stabilité du complexe α_1 Achy-chymotrypsine, nous avons été amenée à vérifier si nous pouvions stabiliser le complexe en ajoutant un inhibiteur synthétique de sérine-protéase en l'occurrence le PMSF. En effet les travaux récents de LÖBERMANN et coll (124) montraient que l'instabilité du complexe α_1 PI-chymotrypsine qu'ils étudiaient était due à une sérine-protéase contaminant la préparation d' α_1 PI. Nous avons pu montrer que dans le système α_1 -Achy-chymotrypsine, le phénomène de dissociation du complexe ne pouvait être dû à la présence d'une sérine-protéase contaminante (voir III-4.7, p : 124)

Dans le cas du complexe α_1 Achy-cathepsine G, il est également nécessaire de procéder à cette vérification. L'une des conséquences directes de la dissociation du complexe dans un mélange préparé en excès d'inhibiteur est la consommation de l'inhibiteur actif en excès lorsque le temps d'incubation se prolonge. Notre but est donc de déterminer si l'addition de PMSF à un tel mélange permet d'arrêter la consommation de l'excès d'inhibiteur actif que nous avons observée précédemment (voir III - 5.3.4, p : 133).

Un mélange d' α_1 Achy et de cathepsine G en rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 2/1 est préparé puis séparé en deux parties ; à l'une on ajoute

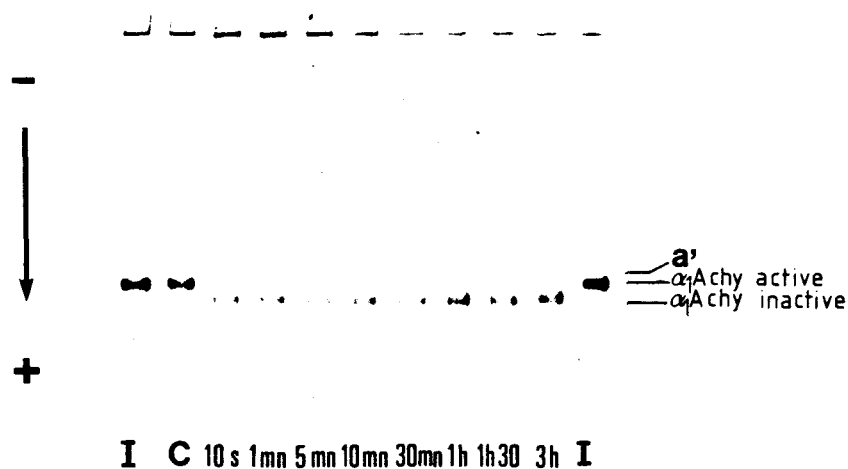


Figure 37 : Variation en fonction du temps du profil électrophorétique en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide) à pH 8,3 d'un mélange α_1 Achy-cathepsine G préparé en présence d'activité enzymatique en excès et incubé à 25° C.

Le PMSF est ajouté au mélange après le temps d'incubation indiqué pour chaque échantillon.

I. : α_1 Achy native

C : mélange de contrôle (voir page 96)

a' : forme dégradée du complexe

du PMSF après 1 minute d'incubation. Les deux parties du mélange sont alors conservées à 25° C. Trois temps d'incubation différents après l'addition de PMSF sont étudiés : 48 heures, 24 heures et 30 minutes. Ces six échantillons sont alors analysés en électrophorèse en gel de polyacrylamide sans agent dénaturant. Après l'électrophorèse, on applique la révélation de l'activité inhibitrice sur la moitié du gel, sur l'autre moitié on effectue la fixation et la coloration des protéines. Les résultats sont présentés figure 38. Après 24 ou 48 heures, les mélanges auxquels on n'a pas ajouté de PMSF ne présentent plus de bande d'inhibiteur actif. On observe que la consommation de l'inhibiteur actif en excès au début de la réaction est peu importante en présence de PMSF, mais néanmoins visible : dans le mélange conservé pendant 24 ou 48 heures après l'addition de PMSF la bande correspondant à l'inhibiteur actif est plus faible que celle obtenue dans le mélange conservé pendant 30 minutes après l'addition de PMSF. Ainsi donc la présence de PMSF semble diminuer la consommation de l'excès d'inhibiteur actif de façon plus efficace que pour le mélange α_1 Achy-chymotrypsine, mais il ne l'enraye pas complètement non plus.

Il aurait été également intéressant de savoir si le PMSF permettait de stabiliser le complexe, mais les difficultés que nous avons rencontrées pour mettre en évidence ce complexe rendent cette étude plus délicate. Actuellement en effet le seul système électrophorétique dans lequel nous avons pu visualiser le complexe est le système SDS-PAGE. Rappelons que pour éviter une dégradation enzymatique pendant le traitement que doit subir l'échantillon avant d'être déposé (être porté à ébullition), tout échantillon susceptible de contenir une activité enzymatique doit être au préalable inactivé par addition de PMSF. Pour les mélanges que l'on étudierait par cette technique après des temps d'incubation variables intervenant après l'addition de PMSF, il faudrait donc procéder à une deuxième addition de PMSF juste avant le traitement par ébullition ; on peut craindre que l'isopropanol dans lequel le PMSF est dissous finisse par avoir une action sur les constituants des mélanges. Il faudra donc envisager d'autres études pour connaître l'action du PMSF dans la stabilisation du complexe α_1 Achy-cathepsine G.

En fait on ne sait pas pendant combien de temps le PMSF en solution aqueuse reste actif envers la cathepsine G. L'étude de JAMES (86) n'a porté que sur la chymotrypsine bovine. Nous avons donc effectué l'expérience suivante : nous avons ajouté du PMSF à du tampon PBS et après des temps variables, ce mélange a servi à diluer une solution de cathepsine G. L'activité enzymatique est alors mesurée sur ces dilutions à l'aide de la méthode spectrophotométrique.

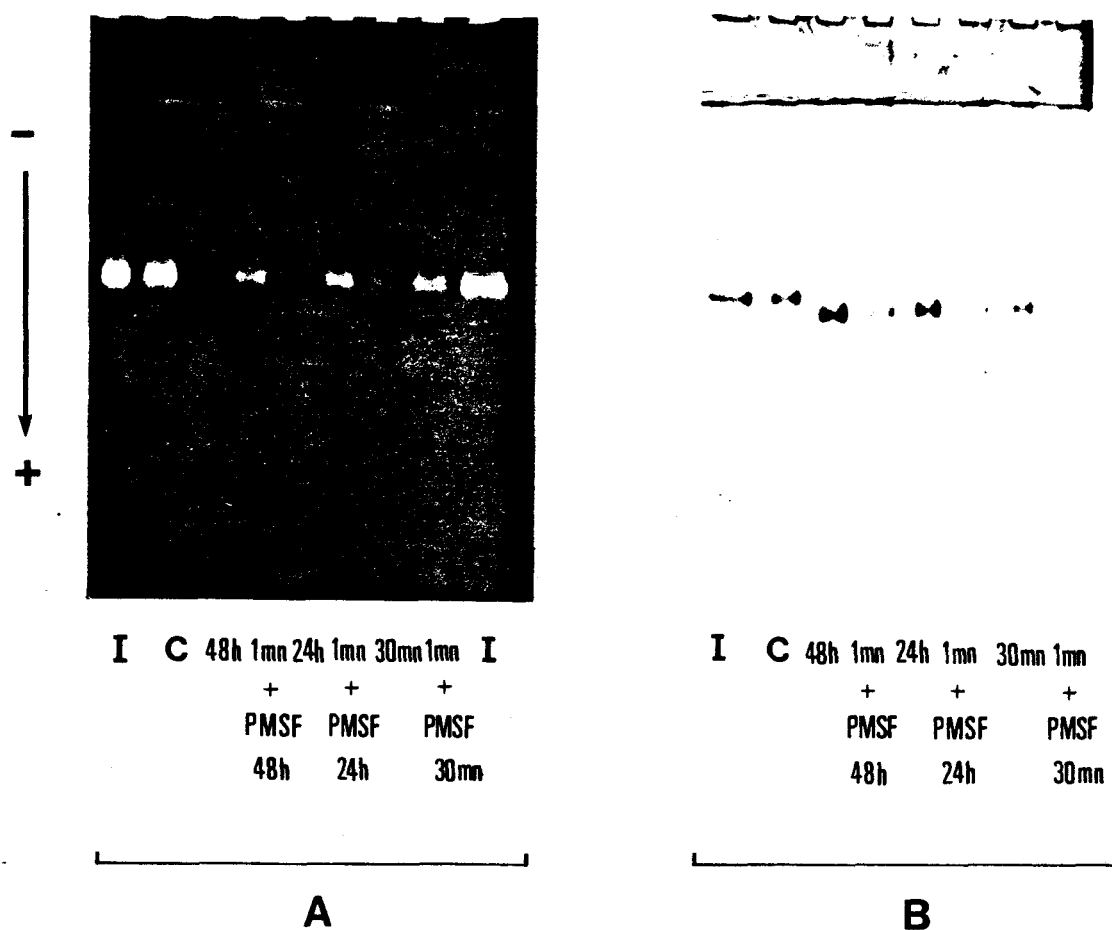


Figure 38 : Effet du PMSF sur l'évolution dans le temps d'un mélange α_1 Achy-cathepsine G (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1). Les mélanges identiques additionnés ou non de PMSF après 1 minute d'incubation à 25° C sont conservés pendant des temps variables à la même température, puis étudiés en électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide) à pH 8,3.

A : révélation de l'activité inhibitrice

B : coloration des protéines par le bleu Coomassie.

I : α_1 Achy native

C : mélange de contrôle (voir p : 96)

Malheureusement, nous avons constaté que le PMSF présent dans le tampon ne permettait pas d'obtenir une bonne reproductibilité des dosages et nous n'avons pu poursuivre dans cette voie.

Néanmoins, si l'on admet que le PMSF en solution aqueuse conserve son activité envers la cathepsine G pendant une durée analogue à celle qui a été rapportée pour la chymotrypsine (86), on peut avoir une explication des phénomènes observés. En effet, la dissociation du complexe α_1 Achy-cathepsine G et donc la libération éventuelle d'enzyme actif est plus rapide que la dissociation du complexe α_1 Achy-chymotrypsine ; pendant le temps d'efficacité du PMSF, il y a par conséquent une plus grande quantité de cathepsine G qui se dissocie et qui peut donc être inactivée ; elle n'est plus alors capable de "se recycler" et de consommer l'inhibiteur actif en excès. C'est actuellement la seule explication que nous puissions donner des phénomènes observés.

III - 5.6 Essai de synthèse des résultats obtenus dans l'étude de la réaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G.

L' α_1 Achy inhibe la cathepsine G mais le rapport molaire inhibiteur/enzyme égal à 1,76/1 nécessaire pour obtenir l'inhibition complète ne correspond pas à la valeur 1/1 attendue pour une réaction stoechiométrique. Or nous avons pu démontrer qu'il y a formation d'un complexe équimoléculaire qui peut être visualisé en SDS-PAGE. Dans les différents systèmes électrophorétiques sans agent dénaturant que nous avons utilisés, il ne nous a pas été possible par contre de visualiser de façon précise le complexe. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : ce complexe possède un pI qui ne lui permet pas de migrer aux pH utilisés (8,3 et 8,6) en l'absence de SDS, ou il précipite en milieu relativement peu ionisé, ou bien ce complexe a la particularité de former des agrégats qui ne pénètrent pas facilement dans les pores des gels utilisés. Il est vraisemblable même que ces trois effets se conjuguent. Dès que de la cathepsine G active réagit avec l' α_1 Achy, il y a, en plus de la formation du complexe équimoléculaire, apparition en SDS-PAGE d'un fragment migrant comme un constituant protéique de M_r proche de 5 à 6 000. Simultanément, on met en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH alcalin, une forme d' α_1 Achy inactivée.

Nous avons montré que le complexe équimoléculaire n'est pas stable quand le temps d'incubation augmente, que les mélanges soient préparés en présence

d'excès d'inhibiteur ou en présence d'activité enzymatique résiduelle. Les schémas de la figure 39 permettent de suivre dans les deux cas l'apparition et la disparition des différents constituants impliqués dans la réaction. La succession des phénomènes est pratiquement identique dans les deux cas, mais le processus est beaucoup plus rapide quand les mélanges contiennent une activité enzymatique résiduelle au début de la réaction.

Dans les mélanges préparés en présence d'un excès d'inhibiteur, l'activité estérasique de la cathepsine G est effectivement inhibée au début de la réaction. Ensuite, contrairement à ce que nous avons observé lors de la dissociation du complexe α_1 Achy-chymotrypsine, il n'y a pas de réapparition d'activité enzymatique décelable par la méthode de dosage spectrophotométrique lors de la dissociation du complexe α_1 Achy-cathepsine G. On ne peut donc parler dans ce cas d'inhibition temporaire (21). Cependant, le fait que l'on assiste à la consommation de l'inhibiteur actif en excès au début de la réaction amène à penser que de l'enzyme doit se dissocier du complexe sous forme active et être capable de former à nouveau du complexe en s'associant à l'inhibiteur actif en excès ; l'intensité de la bande du complexe équimoléculaire est en effet à peu près constante tant que l'inhibiteur en excès n'est pas épuisé. Lorsque cet excès est consommé, la cathepsine G qui continue à se dissocier du complexe exerce alors son activité protéolytique sur le complexe équimoléculaire ; notons en effet que la forme dégradée de complexe de $M_r = 67\ 000$ n'apparaît que lorsque l'intensité de la bande de complexe équimoléculaire commence à décroître. Par contre, on peut observer que dans les mélanges qui contiennent au début de la réaction une activité enzymatique résiduelle, cette forme dégradée de complexe est visible dès le temps d'incubation le plus court ; cette forme coexiste avec le complexe équimoléculaire. Ceci tend à prouver que l'enzyme libre et actif dans les mélanges doit jouer un rôle dans la production de cette forme dégradée de complexe. Puisque la quantité d'enzyme n'augmente pas en fin de réaction et que l' α_1 Achy ne subit qu'une protéolyse très limitée, il faut admettre que c'est la cathepsine G présente dans le complexe qui est dégradée, la conformation qu'elle posséderait dans le complexe la rendrait relativement sensible à l'attaque protéolytique par l'enzyme libre.

Mise à part la présence d'enzyme dans les mélanges représentés dans la partie B du schéma (figure 39), l'aboutissement des phénomènes est identique dans les deux types de mélanges : la forme d' α_1 Achy obtenue à la fin de nos études est l' α_1 Achy modifiée inactive qui présente en SDS-PAGE une M_r égale à 55 000. Même en présence d'activité enzymatique résiduelle, on n'observe pas de forme d' α_1 Achy plus profondément dégradée. D'autre part, le fragment (M_r proche de 5 à 6 000) est présent également dans les deux types de mélanges.

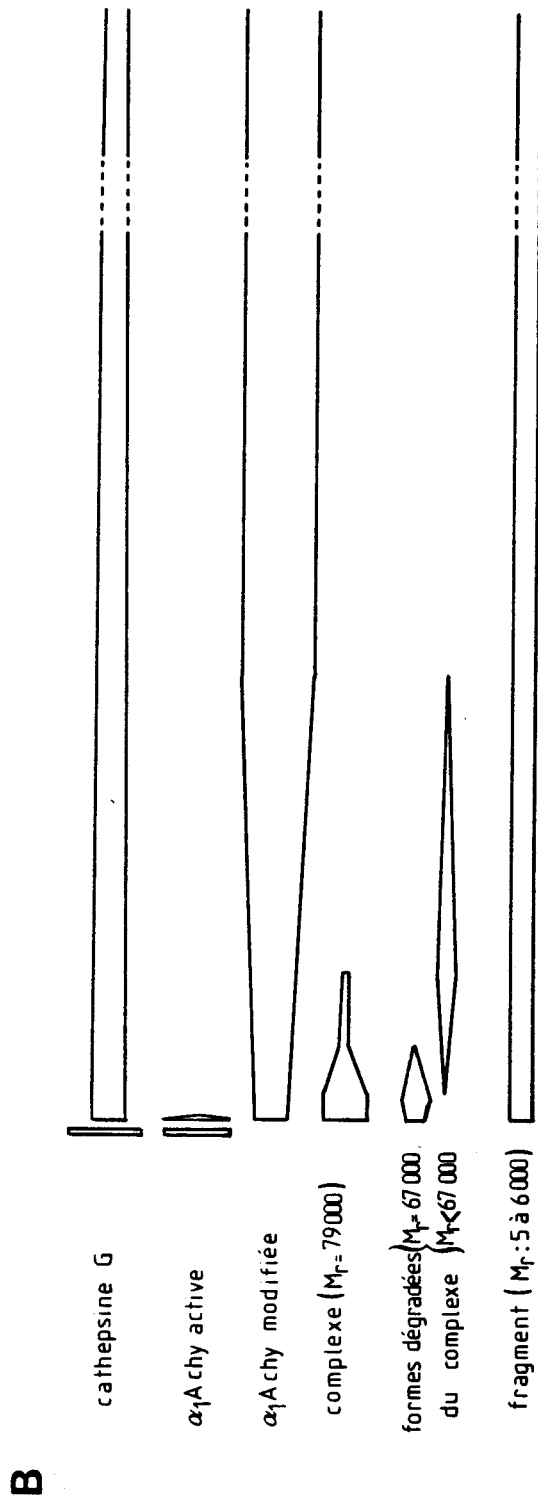
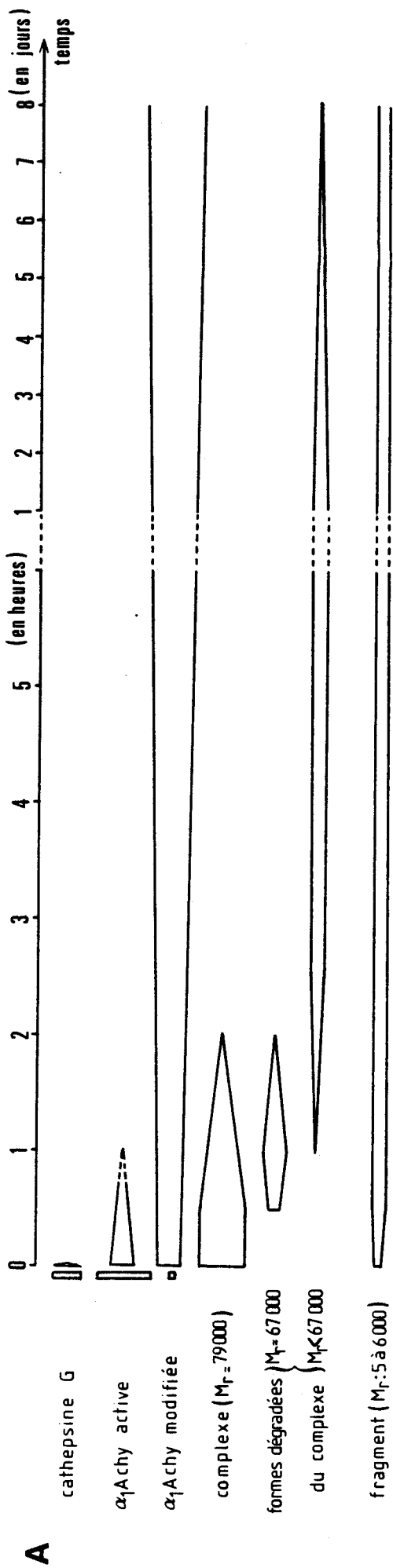


Figure 39 : Schéma illustrant l'apparition et la disparition au cours du temps des différents constituants d'un mélange d' α_1 Achy et de cathepsine G leucocytaire humaine dans lequel, au début de la réaction :

A : l'inhibiteur est en excès (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 2/1)

B : une activité enzymatique résiduelle existe (rapport molaire inhibiteur/enzyme = 0,8/1).

III - 5.7 Résultats publiés par d'autres auteurs.

Seuls TRAVIS et coll (202,203) ont publié des résultats concernant l'interaction de l' α_1 ACHY avec la cathepsine G. Ces auteurs ont incubé l' α_1 -Achy avec des quantités croissantes de cathepsine G pendant 5 minutes à pH 8,0 et observé en SDS-PAGE la formation d'un complexe de M_r proche de 88 000; pour ces auteurs en effet l' α_1 Achy possède une M_r de 68 000 et la cathepsine G une M_r comprise entre 24 000 et 26 000. Puisqu'en excès d'enzyme, ils observent encore une bande d' α_1 Achy ils en déduisent que ce qu'ils obtiennent en SDS-PAGE représente en fait un équilibre entre les formes du complexe stable et instable en SDS ; en effet, en électrophorèse en gel alcalin, les mêmes mélanges se présenteraient (ces observations ne sont pas illustrées) sous la forme d'un constituant de migration plus cathodique que l' α_1 Achy native, toute l' α_1 Achy étant alors engagée dans le complexe.

La dissociation du complexe α_1 Achy-cathepsine G est obtenue en faisant agir la benzamidine 1 M en tampon Tris 0,05 M, HCl pH 8,0 pendant 24 h à 40° C. En SDS-PAGE, l' α_1 Achy qui est présente dans ce mélange possède la même M_r que l'inhibiteur natif. Cette forme d' α_1 Achy isolée par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G 75 possède le même acide aminé en position N-terminale que l'inhibiteur natif (Arg). TRAVIS et coll (203) retrouvent cependant également de la sérine, mais n'ont pas poursuivi leurs investigations étant donné les problèmes rencontrés pour la quantification de ces acides aminés.

En fait, les derniers travaux de MORII et TRAVIS (138) ont montré que dans l'inhibiteur natif, l'acide aminé en position N-terminale n'est pas l'arginine mais l'acide aspartique ; une protéase contaminante aurait provoqué une coupure au niveau de l'arginine.

Lorsque TRAVIS et coll (203) font réagir simultanément l' α_1 Achy et l' α_1 PI avec la cathepsine G, ils démontrent que c'est l' α_1 Achy qui réagit le plus rapidement. Ils en déduisent que l'inhibiteur préférentiel de la cathepsine G doit donc être l' α_1 Achy, tandis que l' α_1 PI aurait pour cible privilégiée l'élastase leucocytaire que de toute façon l' α_1 Achy n'inhibe pas.

III - 6

REACTION AVEC LA TRYPSINE BOVINE ET L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE HUMAINE

Cette partie conduit à des développements moins importants que les précédentes ; en effet, depuis les travaux de HEIMBURGER et coll (75), il est connu que l' α_1 Achy n'exerce son action inhibitrice que sur des enzymes de type chymotrypsique. Plus récemment, TRAVIS et coll (202,203) ont montré que l' α_1 Achy n'est pas capable de former de complexe que ce soit avec la trypsine humaine ou l'élastase leucocytaire humaine. Mais il pouvait être intéressant de savoir si ces enzymes provoquaient la coupure de liaisons peptidiques dans la molécule d' α_1 Achy et de façon plus générale, de savoir comment l' α_1 Achy se comportait en présence d'enzymes qu'elle n'inhibe pas. Les deux enzymes que nous avons utilisés sont la trypsine bovine et l'élastase leucocytaire humaine.

III - 6.1 Réaction avec la trypsine bovine (SIGMA type I).

L' α_1 Achy n'est pas capable d'inhiber l'activité estérasique de la trypsine : lorsque l'on utilise la technique de révélation de l'activité inhibitrice après électrophorèse en plaque d'agarose ou en gel de polyacrylamide à pH 8,3 en effectuant cette fois l'incubation dans une solution de trypsine bovine (à 1 mg/100 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,4), aucune activité inhibitrice n'est décelée au niveau de l' α_1 Achy (résultats non illustrés). Nous avons préparé des mélanges d' α_1 Achy et de trypsine en rapports molaires α_1 Achy/trypsine différents = 1/0,02, 1/0,2 et 1/1. Ils sont incubés pendant 10 minutes ou 1 heure à 0° C ou à 37° C. Après avoir ajouté du PMSF, nous avons étudié ces mélanges en SDS-PAGE et en électrophorèse en gel de polyacrylamide sans agent dénaturant à pH alcalin. Les résultats qui sont présentés figure 40 montrent qu'il n'y a pas de formation de complexe entre l' α_1 Achy et la trypsine, mais qu'il se produit une transformation progressive de l' α_1 Achy de $M_r = 58\ 000$ en une forme de $M_r = 55\ 000$. On observe l'apparition d'une bande diffuse migrant comme un constituant protéique de M_r proche de 5 à 6 000. En gel alcalin (résultats non illustrés), il y a transformation progressive de l' α_1 Achy active en un constituant ayant perdu sa capacité d'inhiber la chymotrypsine bovine ou la cathepsine G et ayant une migration analogue à celle de l' α_1 Achy modifiée qui est obtenue lors de la réaction de l' α_1 Achy avec la chymotrypsine bovine ou la cathepsine G. Des temps d'incubation plus longs n'ont pas amené de dégradation ultérieure.

Après avoir fait agir la trypsine bovine sur le plasma humain, GIANAZZA et ARNAUD (68) trouvent après isoélectrofocalisation en gel de polyacryl-

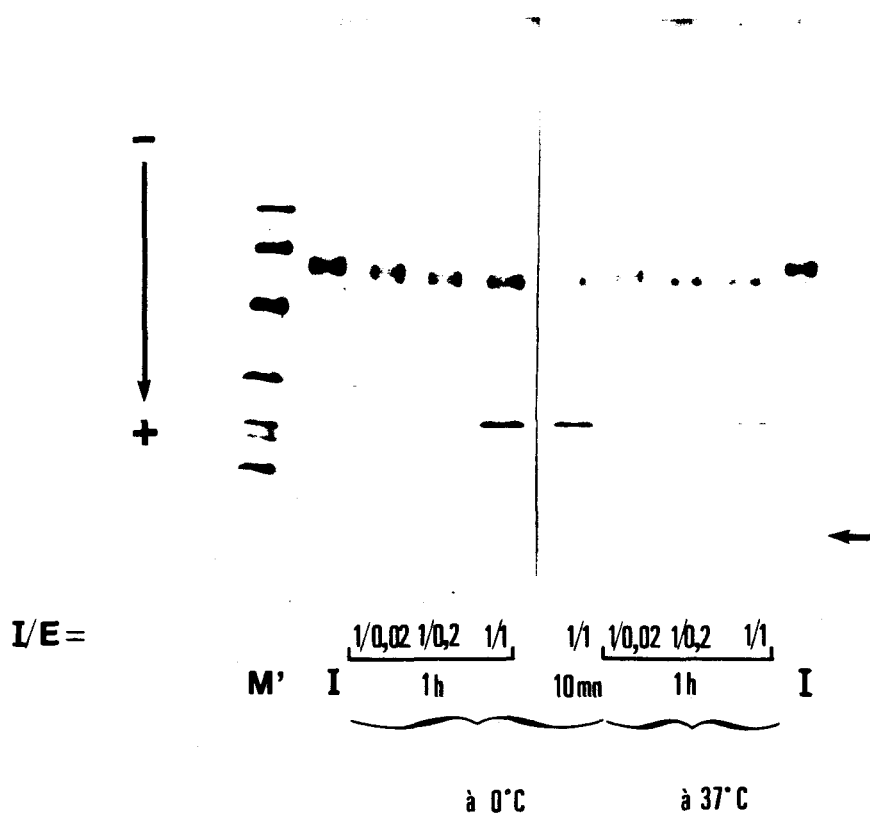


Figure 40 : Action de la trypsine bovine sur l' α_1 Achy étudiée en électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30% d'acrylamide) en présence de SDS.

3 rapports molaire α_1 Achy/trypsine sont étudiés à 0° C ou 37° C pendant des temps variables.

Seul M' est réduit.

M' : témoins de M_r

I : α_1 Achy native

La flèche indique la migration de la bande diffuse (voir texte).

I/E : rapport molaire inhibiteur/enzyme.

amide et immunofixation avec l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy, un diagramme décalé vers les pI inférieurs. Ils expliquent ce phénomène par une dégradation de la molécule d' α_1 Achy.

III - 6.2 Réaction avec l'élastase leucocytaire humaine.

Nous avons d'abord examiné si l'élastase leucocytaire conserve son activité, dosée par la méthode spectrophotométrique, lorsqu'on lui ajoute de l' α_1 Achy. L'activité de l'élastase n'est ni inhibée, ni modifiée dans des mélanges préparés en rapports molaires α_1 Achy/élastase égaux à 1/0,2, 1/0,5, 1/1 et incubés au préalable pendant 5 minutes.

Deux séries de mélanges ont ensuite été étudiées : pour l'une le rapport molaire α_1 Achy/élastase est égal à 1/0,02 soit 1p100 en poids, ce rapport substrat/enzyme est en effet couramment utilisé pour l'hydrolyse enzymatique d'une protéine. Dans l'autre série, le rapport α_1 Achy/élastase est égal à 2/1, nous voulons en effet déterminer jusqu'à quel stade il est possible de dégrader l' α_1 Achy. Les mélanges sont incubés à 25° C ou à 37° C pendant des temps variables : 10 minutes, 1 heure et 5 heures, pour les mélanges en rapport molaire 2/1 et 1 heure, 24 heures et 48 heures pour les autres mélanges. Après addition de PMSF, les mélanges sont analysés en SDS-PAGE et en gel de polyacrylamide à pH alcalin.

En SDS-PAGE (figure 41), nous n'observons pas de formation de complexe entre l' α_1 Achy et l'élastase, par contre il y a transformation progressive de l' α_1 Achy en un constituant de M_r proche de 55 000 et apparition d'une bande diffuse (indiquée par une flèche) de migration analogue à celle de la bande observée lorsque l' α_1 Achy réagit avec la chymotrypsine ou la cathepsine G.

En gel de polyacrylamide à pH alcalin (résultats non illustrés), on observe la transformation progressive de l' α_1 Achy en une forme inactive possédant une migration identique à celle de l' α_1 Achy modifiée déjà décrite.

La transformation nécessite bien sûr, plus de temps lorsque le rapport molaire n'est que de 1/0,02. D'autre part, même en rapport molaire 2/1 après 5 heures d'incubation à 25° C, la forme d' α_1 Achy retrouvée n'est pas une forme plus dégradée que l' α_1 Achy modifiée.

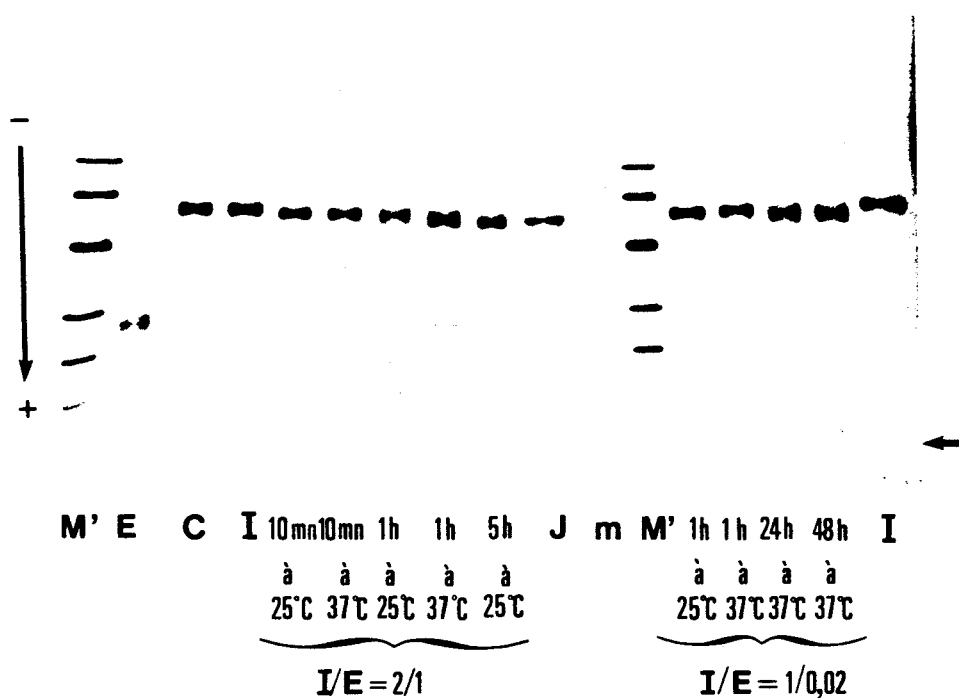


Figure 41 : Action de l'élastase leucocytaire humaine sur l' α_1 Achy étudiée en électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS.

Deux séries de mélanges dans des rapports molaires α_1 Achy/élastase (I/E) différents sont incubés à 25° C ou à 37° C pendant des temps variables puis additionnés de PMSF.

Un mélange α_1 PI-élastase (rapport molaire 2/1) incubé pendant 10 minutes est également analysé après addition de PMSF.

Tous les échantillons ont été réduits.

- M' : témoins de M_r
- E : élastase leucocytaire
- C : mélange de contrôle α_1 Achy-élastase inhibée
- I : α_1 Achy native
- J : mélange de contrôle α_1 PI-élastase inhibée
- m : mélange α_1 PI-élastase incubé pendant 10 minutes

La flèche indique la migration de la bande diffuse (voir texte).

III - 6.3 Synthèse et comparaison avec la réaction entre d'autres inhibiteurs et des enzymes qu'ils n'inhibent pas.

L' α_1 Achy est donc progressivement inactivée par la trypsine bovine ou l'élastase leucocytaire et se retrouve sous la forme d'un constituant ayant une migration électrophorétique très proche de celle de l' α_1 Achy modifiée obtenue au cours de la réaction ou après dissociation du complexe α_1 Achy-cathepsine G ou du complexe α_1 Achy-chymotrypsine. Le petit fragment observé rend sans doute compte de la coupure pratiquée par l'enzyme. De la même façon, cette forme d' α_1 Achy réagit avec l'immunsérum spécifique de l' α_1 Achy.

D'autres inhibiteurs sériques sont également inactivés par les enzymes qu'ils n'inhibent pas. Ainsi JOHNSON et TRAVIS (98) ont montré que les thiol-protéases comme la cathepsine B₁ ou la papaïne inactivent très rapidement l' α_1 PI en provoquant la coupure d'une liaison peptidique et la transformation de l' α_1 PI native de M_r 53 000 en α_1 PI modifiée de M_r 47 000. Les études de séquence en acides aminés révèlent que la coupure s'effectue sur la liaison peptidique qui est aussi rompue par la trypsine lorsque celle-ci réagit avec l' α_1 PI.

KRESS et CATANESE (108) ont démontré que l'AT est inactivée par les protéases de venin de serpent et transformée en un constituant ayant une M_r inférieure de 5 500 à celle de l'AT native. La liaison peptidique cible serait ici différente de celle qui est rompue lors de la réaction de l'AT avec la thrombine (109), mais n'en serait éloignée que de 9 résidus. L'élastase leucocytaire humaine inactive également l'AT (94) et provoque vraisemblablement des perturbations dans les sites nécessaires pour la liaison avec l'héparine. Dans ce cas également, la dégradation de la molécule d'inhibiteur est limitée puisque JOCHUM et coll (94) suggèrent que la (ou les) liaison(s) coupée(s) par l'élastase doit (ou doivent) être proche(s) de la liaison coupée par la thrombine.

Plus récemment, BROWER et HARPEL (32) ont examiné l'action de l'élastase sur l'AP et le C₁ inactivateur. L'enzyme inactive progressivement l'activité inhibitrice de l'AP et du C₁ inactivateur envers la plasmine. Cette perte d'activité est accompagnée d'une protéolyse limitée, mais il semble qu'il y ait plusieurs sites de coupure : 2 pour l'AP et 3 pour le C₁ inactivateur.

Le processus d'inactivation d'un inhibiteur par protéolyse limitée est donc largement répandu.

III - 7 DISCUSSION, HYPOTHESE D'UN MECANISME D'ACTION DE L' α_1 ANTICHY- MOTRYPSINE.

Lorsque l' α_1 Achy réagit avec la chymotrypsine bovine ou la cathepsine G leucocytaire humaine, il y a apparition d'un complexe qui peut être visualisé en électrophorèse en présence de SDS et qui présente une M_r un peu inférieure à la somme des M_r des deux constituants engagés dans le complexe. Cette observation est en faveur de la formation d'un complexe équimoléculaire covalent dans lequel un des constituants au moins a dû être amputé d'un fragment. L'apparition d'un fragment ayant, en présence de SDS, une migration analogue à celle d'un constituant protéique de M_r proche de 5 à 6 000 est observée lors de la réaction de l' α_1 Achy avec l'un ou l'autre enzyme et confirme qu'une protéolyse limitée s'est produite.

En fait, il y a simultanément formation d'un complexe équimoléculaire et apparition d'une forme modifiée d' α_1 Achy. Cette forme modifiée possède une M_r légèrement inférieure à celle de l' α_1 Achy active (55 000 au lieu de 58 000), une migration électrophorétique un peu plus élevée à pH 8,3 ou 8,6 en absence d'agent dénaturant ; elle réagit avec les anticorps spécifiques de l' α_1 -Achy, mais elle en a perdu les propriétés inhibitrices envers la cathepsine G ou la chymotrypsine bovine.

D'autre part, nous avons constaté que les rapports molaires inhibiteur/enzyme nécessaires pour l'inhibition des enzymes sont nettement supérieurs au rapport escompté pour une réaction stoechiométrique, alors que nous avons veillé à tenir compte uniquement du pourcentage de matériel actif. Une sous-estimation du pourcentage d' α_1 Achy inactive ne peut être catégoriquement exclue. On peut en effet envisager que parmi les molécules qui migrent, à pH alcalin, au niveau où l'activité inhibitrice est révélée, il puisse exister des molécules d' α_1 Achy qui aient perdu leur activité inhibitrice par un phénomène autre que la transformation en α_1 Achy modifiée. Il n'est cependant pas possible d'imaginer que, comme pour l' α_1 PI, l'inactivation soit due à un phénomène d'oxydation (100) puisqu'il a été montré que l'oxydation ne provoquait pas d'altération des propriétés inhibitrices de l' α_1 Achy (202). Il pourrait s'agir d'un autre phénomène encore indéterminé.

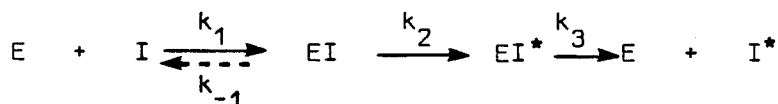
Ces molécules d' α_1 Achy inactives serviraient de substrat à l'enzyme dès le début de la réaction et seraient très rapidement transformées en molécules d' α_1 Achy modifiée présentant les caractéristiques déjà mentionnées.

Mais pourquoi ces molécules seraient-elles en proportions différentes suivant que l' α_1 Achy réagit avec la chymotrypsine ou la cathepsine G ? Les rapports molaires inhibiteur/enzyme (en matériel actif) pour l'inhibition sont en effet respectivement de 1,45/1 et 1,75/1. Il est peu vraisemblable que des problèmes de dosage des protéines interviennent et faussent à ce point les calculs des rapports molaires. En effet, les déterminations de concentration des solutions d'inhibiteur et d'enzymes sont toujours effectuées à l'aide d'au moins deux techniques dont les résultats concordent.

Par contre, les études que nous avons ensuite effectuées sur la stabilité des complexes dans le temps nous permettent de présenter une autre explication. En effet, que ce soit avec la chymotrypsine ou avec la cathepsine G, le complexe est instable. Comme cela a été montré par de nombreux auteurs pour d'autres inhibiteurs sériques réagissant avec des sérine-protéases tel l' α_1 PI (18, 147) ou l'AT (24, 48, 49, 220), nous avons pu observer une dissociation spontanée du complexe qui conduit à la libération d'inhibiteur modifié d'une part, et d'enzyme au moins partiellement actif d'autre part. Cet enzyme actif est capable de s'associer de nouveau avec de l'inhibiteur actif en excès s'il en existe, pour reformer du complexe, il y a alors recyclage de l'enzyme. Si, comme nous le pensons, ce processus de recyclage intervient dès le début de la réaction, nous pouvons alors expliquer l'obtention très rapide d'une quantité importante d'inhibiteur modifié et la nécessité d'un rapport inhibiteur/enzyme nettement supérieur à 1/1 pour l'inhibition des enzymes. De plus, puisque la constante d'association de l' α_1 Achy avec la cathepsine G leucocytaire est plus élevée que celle de l' α_1 Achy avec la chymotrypsine bovine (17), il s'ensuit une consommation plus rapide de l'inhibiteur actif en excès lors de la réaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G que lors de la réaction de l' α_1 Achy avec la chymotrypsine. Ceci expliquerait que le rapport molaire inhibiteur/enzyme en matériel actif soit plus élevé pour l'inhibition de la cathepsine G que pour l'inhibition de la chymotrypsine.

A partir de ces éléments et en nous inspirant des mécanismes qui ont été décrits dans le premier chapitre pour d'autres inhibiteurs de sérine-protéases du plasma humain, nous essayons de définir un mécanisme d'action de l' α_1 Achy sur les sérine-protéases qu'elle est capable d'inhiber et que nous avons utilisées dans nos travaux : la chymotrypsine bovine et la cathepsine G leucocytaire humaine.

L'équation suivante semble pouvoir résumer les événements qui se déroulent :



E est l'enzyme, I l'inhibiteur actif, I* l'inhibiteur modifié

Lorsque l' α_1 Achy réagit avec la chymotrypsine bovine ou la cathepsine G leucocytaire humaine, la première étape doit être la formation d'un complexe du type "enzyme-substrat" appelé EI dans l'équation indiquée ci-dessus. Puis l'enzyme pratique dans la molécule d'inhibiteur une coupure d'une liaison peptidique ; l'inhibiteur (I*) amputé d'un fragment forme alors avec l'enzyme le complexe équimoléculaire EI* covalent. La transformation de EI en EI* est très rapide et le complexe que nous pouvons observer en SDS-PAGE, par exemple, est très probablement le complexe EI*. Les constantes k_1 et k_2 seraient très élevées, tandis que la constante k_{-1} si elle existe, serait très faible. Par analogie avec ce qui est décrit pour les inhibiteurs de sérine-protéases du plasma humain comme l' α_1 PI, l'AT et l'AP, nous pouvons supposer d'une part, que la liaison hydrolysée par l'enzyme doit se situer au niveau du site actif de l'inhibiteur et d'autre part, que le radical carboxyle ainsi libéré dans l'inhibiteur doit pouvoir réagir avec la sérine du site actif de la protéase pour établir la liaison covalente du complexe EI*. L'inhibition de l'activité de l'enzyme serait donc due à la formation d'un "acyl-enzyme".

Comme NILSSON et WIMAN (146) et DANIELSSON et BJÖRK (48) l'ont déjà souligné, respectivement pour l'AP et l'AT, nous sommes certainement dans le cas de l' α_1 Achy aussi en présence d'un acyl-enzyme plus stable que celui qui est formé quand l'enzyme agit sur un substrat ordinaire. NILSSON et WIMAN (146) proposent deux explications de cette plus grande stabilité : ou bien la molécule d'eau nécessaire pour l'hydrolyse pourrait rencontrer des difficultés à pénétrer dans le complexe pour atteindre la liaison ester, ou bien un changement de conformation de la molécule d'inhibiteur se produisant après la protéolyse limitée pourrait perturber le système de délocalisation électronique intervenant normalement pour la réaction de désacylation. La désacylation finirait par se produire néanmoins conduisant à la dissociation du complexe en inhibiteur modifié d'une part et en enzyme encore actif d'autre part.

Dans les expériences effectuées avec la chymotrypsine, une réapparition d'activité chymotrypsique prouve sans conteste qu'une certaine quantité d'enzyme actif se dissocie du complexe. L' α_1 Achy agit donc en inhibiteur temporaire de la chymotrypsine bovine selon les définitions de BIETH (21). Par contre, nous n'avons pas décelé de cathepsine G active lors de la dissociation du complexe α_1 Achy-cathepsine G. Cependant, que ce soit dans les mélanges α_1 Achy-chymotrypsine ou dans les mélanges α_1 Achy-cathepsine G préparés en présence d'excès d'inhibiteur actif, les études faites en gel de polyacrylamide montrent la disparition progressive de l'excès d'inhibiteur actif tandis que dans le même temps, l'intensité de la bande correspondant au complexe équimoléculaire reste constante. Nous en avons déduit que, dans les deux cas, l'enzyme actif dissocié du complexe s'est recyclé. Le fait que nous n'observions pas de cathepsine G libérée active s'expliquerait par la plus grande rapidité de la réaction (17) et par la fragilité beaucoup plus importante de la molécule de cathepsine G. Nous essaierons à l'avenir de suivre plus précisément le devenir de la cathepsine G en utilisant, soit des anticorps spécifiques, soit un marquage radioactif de la molécule, dans la mesure où ce marquage n'altère pas les propriétés enzymatiques de la cathepsine G.

De son côté, l'inhibiteur modifié a vraisemblablement subi, en plus de la perte d'un fragment, des modifications de conformation qui provoqueraient entre autres soit le masquage de certains groupements basiques, soit le démasquage de groupements acides ; en effet, il possède une migration électrophorétique supérieure à celle de l'inhibiteur natif à pH alcalin. La différence de M_r entre l'inhibiteur natif et l'inhibiteur modifié est estimée à 3 000 en SDS-PAGE, tandis que le fragment libéré a une M_r apparente de 5 à 6 000. En fait, il est difficile d'obtenir en SDS-PAGE dans le même gradient d'acrylamide une estimation correcte de M_r pour des composés de taille aussi différente que celle de l'inhibiteur et celle d'un peptide d'environ 30 à 50 résidus. De plus, dans ce même système de gel, la détermination d'une M_r voisine de 55 000-58 000, lorsqu'il s'agit d'une glycoprotéine, ne peut être obtenue qu'avec une erreur d'au moins ± 1 000. Il faudra donc isoler et étudier le fragment pour déterminer plus précisément ses propriétés physico-chimiques. Jusqu'à présent, nous ne sommes pas parvenue à l'isoler par chromatographie de gel-filtration sans agent dénaturant, ce qui laisse penser qu'en milieu non dénaturant, il reste associé au gros fragment d'inhibiteur modifié ; nous n'avons pu l'individualiser qu'après migration électrophorétique en présence de SDS.

En ce qui concerne l'enzyme actif libéré du complexe, son devenir dépend de la présence ou de l'absence d'inhibiteur encore actif dans le milieu réactionnel. En présence d'inhibiteur actif libre, l'enzyme va réagir avec celui-ci et redonner la suite des réactions décrites ci-dessus. En effet, la constante d'association de l'inhibiteur avec l'enzyme est très élevée et la formation du complexe serait la réaction privilégiée. Par contre, lorsqu'il n'y a plus d'inhibiteur actif, l'enzyme exercerait alors son activité protéolytique sur le complexe provoquant ainsi sa dégradation. Nos résultats suggèrent que c'est la partie "enzyme" du complexe qui subit l'action protéolytique puisque la partie "inhibiteur modifié" ne subit pas de dégradation ultérieure, même en présence d'enzyme en excès ; dans ce cas, la dégradation du complexe est accélérée.

Comme pour d'autres inhibiteurs de sérine-protéases, tels l' α_1 -PI, l'AP et l'AT, l' α_1 Achy est inactivée par des enzymes qu'elle n'est pas capable d'inhiber ; elle est transformée en un constituant qui, par ses propriétés électrophorétiques et ses propriétés d'immunoprécipitation ressemble beaucoup à l' α_1 Achy modifiée obtenue après la réaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G ou la chymotrypsine. On peut envisager qu'il existe dans la molécule d' α_1 Achy une liaison ou une région cible sur laquelle agissent les sérine-protéases. La molécule d' α_1 Achy amputée d'un fragment devient alors plus résistante à l'action ultérieure d'une protéase.

Peut-on attribuer un rôle physiologique à cette molécule beaucoup plus stable qu'est l' α_1 Achy modifiée ? Certains auteurs (31, 104, 184) ont montré que l' α_1 Achy possède une affinité pour l'ADN. L' α_1 Achy modifiée conserve-t-elle cette affinité ? Peut-on envisager que cette propriété lui confère un rôle particulier ? L' α_1 Achy a-t-elle un rôle dans la régulation de phénomènes n'ayant plus trait à l'inhibition des sérine-protéases ? Ces questions restent sans réponse jusqu'à présent.

Il faut bien sûr ajouter que nos études ont été réalisées dans un milieu beaucoup moins complexe que les liquides biologiques et que les temps d'incubation sont peut-être très longs par rapport aux vitesses des réactions qui ont lieu en milieu physiologique. De plus, nous n'avons pas pris en compte l'intervention possible d'autres inhibiteurs sériques comme l' α_1 PI ou l' α_2 M qui sont capables de réagir également avec les enzymes utilisés.

L'étude quantitative des inhibiteurs de sérine-protéases dans les liquides biologiques est le plus souvent abordée par le biais des dosages immunologiques. Les valeurs obtenues sont ensuite comparées à l'activité inhibitrice de ces mêmes liquides biologiques. Ces paramètres sont en effet importants à connaître en pathologie pulmonaire par exemple où le déséquilibre de la balance entre protéases et antiprotéases créerait des conditions favorables au développement de l'emphysème et de la fibrose. Or nous avons pu montrer que le résultat du dosage immunologique de l' α_1 Achy à l'aide de techniques couramment utilisées (l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle, l'électro-immunodiffusion et l'immunodiffusion radiale) dépend de la forme moléculaire de l'inhibiteur : l' α_1 -Achy engagée dans un complexe équimoléculaire ne peut plus réagir avec ses anticorps vraisemblablement par suite du masquage des sites antigéniques de la molécule ; l' α_1 Achy modifiée est par contre surestimée d'au moins 25 % par rapport à une quantité équivalente d' α_1 Achy native.

Les résultats des dosages immunologiques doivent donc être utilisés très prudemment, avant d'affirmer par exemple la perte du pouvoir inhibiteur de ces composés dans les liquides biologiques analysés et d'en déduire un déséquilibre de la balance entre protéases et antiprotéases. Il est de toute façon indispensable d'utiliser une gamme de référence préparée avec des constituants présentant les mêmes caractéristiques que les échantillons à doser.

Le troisième chapitre est consacré aux réactions de l' α_1 -antichymotrypsine avec les sérine-protéases. Les études effectuées montrent que :

1) l'inhibition de l'enzyme se traduit par la formation d'un complexe équimoléculaire de type enzyme-substrat dans lequel l'inhibiteur a subi une protéolyse limitée. Il y a apparition simultanée d'un peptide de M_r inférieure à 6 000 et d'une forme libre d'inhibiteur "modifié" inactif possédant un pI plus bas et une M_r plus faible.

2) les complexes équimoléculaires se dissocient au cours du temps en inhibiteur "modifié" inactif et en enzyme actif.

3) si de l'inhibiteur actif reste disponible, l'enzyme actif ainsi libéré forme à nouveau du complexe. Ceci expliquerait que le rapport molaire (I/E) pour l'inhibition de la chymotrypsine bovine et de la cathepsine G leucocytaire humaine soit supérieur à 1.

4) lorsque l'inhibiteur actif est épuisé, l'enzyme libéré s'attaque à la partie enzyme du complexe restant.

5) l' α_1 -antichymotrypsine agit en inhibiteur temporaire de la chymotrypsine bovine ; par contre aucune régénération d'activité enzymatique n'est observée après la réaction de l' α_1 -antichymotrypsine avec la cathepsine G leucocytaire humaine.

6) les déterminants antigéniques de l' α_1 -antichymotrypsine sont masqués dans les complexes équimoléculaires. L'inhibiteur modifié qui est inactif présente une réactivité immunologique différente de celle de l'inhibiteur actif.

7) la trypsine bovine et l'élastase leucocytaire humaine ne sont pas inhibées par l' α_1 -antichymotrypsine, mais elles l'inactivent par une protéolyse limitée.

Le mécanisme d'action proposé à partir de tous ces éléments permet de ranger l' α_1 -antichymotrypsine dans le groupe d'inhibiteurs composé jusqu'à présent de l' α_1 -antiprotéase, l'antithrombine III et l' α_2 -antiplasmine.

CONCLUSIONS

Après avoir exposé les généralités sur les sérine-protéases et leurs inhibiteurs présents dans le sérum humain, nous avons, dans le premier chapitre, rassemblé les connaissances sur les propriétés et les mécanismes d'action des principaux inhibiteurs sériques (l' α_2 -macroglobuline, l' α_1 -antiprotéase, l'antithrombine III et l' α_2 -antiplasmine). Nous avons montré la diversité des méthodes d'investigation employées pour aborder l'étude des interactions de ces inhibiteurs avec les sérine-protéases et nous avons souligné la difficulté qui en résulte pour effectuer une synthèse des résultats publiés.

Dans le deuxième chapitre, nous avons décrit les différentes étapes que nous avons eues à franchir pour mettre au point un protocole de purification de l' α_1 Achy sérique. Nous disposons actuellement de deux protocoles fondés sur la chromatographie d'immunoaffinité qui permettent d'obtenir avec un bon rendement de l' α_1 Achy pure dont les propriétés inhibitrices ont été préservées au maximum. L'un des deux protocoles est un peu plus complexe puisqu'il fait appel à deux chromatographies covalentes supplémentaires ; au cours de l'une de ces étapes, on obtient une fraction à partir de laquelle il est facile de purifier l' α_1 -antiprotéase.

Nous avons ensuite précisé les propriétés physico-chimiques de l' α_1 Achy purifiée, en particulier la masse moléculaire relative, le point isoélectrique et la composition chimique de cette glycoprotéine. Nous avons d'autre part étudié la stabilité de l' α_1 Achy après divers traitements physiques ou chimiques pour déterminer les conditions optimales nécessaires pour la conservation ou les études fonctionnelles de cet inhibiteur.

Le troisième chapitre débute par une brève revue des caractéristiques des sérine-protéases que nous avons choisies pour les études d'interactions. Après avoir défini la stoechiométrie de la réaction aussi bien avec la chymotrypsine bovine qu'avec la cathepsine G leucocytaire humaine, nous avons abordé l'étude de la formation des complexes. Lorsque l' α_1 Achy réagit avec l'un ou l'autre enzyme, il y a formation d'un complexe équimoléculaire de type enzyme-substrat dans lequel l'inhibiteur a subi une protéolyse limitée et se trouve sous la forme d'inhibiteur qui a perdu son activité et qui est appelé inhibiteur modifié. La formation de ce complexe est accompagnée de l'obtention d'une forme d' α_1 Achy modifiée libre.

Nous avons suivi dans le temps la réaction de l' α_1 Achy avec la chymotrypsine bovine et avec la cathepsine G leucocytaire et nous avons pu montrer en particulier que les complexes équimoléculaires entre l' α_1 Achy et ces enzymes ne sont pas stables. La dissociation des complexes produit de l'inhibiteur modifié et de l'enzyme actif capable de se recycler avec de l'inhibiteur actif en excès s'il en existe dans le milieu réactionnel. La réapparition d'enzyme actif a pu être démontrée pour la chymotrypsine, l' α_1 Achy se comporte donc en inhibiteur temporaire de la chymotrypsine bovine. Ce comportement n'est par contre pas retrouvé pour l' α_1 Achy réagissant avec la cathepsine G qui doit être vraisemblablement détruite beaucoup plus rapidement.

Les résultats obtenus nous ont permis de proposer un mécanisme d'action de l' α_1 Achy sur ces protéases ; il met en jeu un processus d'acylation et de désacylation comme celui qui a été suggéré par d'autres auteurs pour l' α_1 -antiprotéase, l'antithrombine III et l' α_2 -antiplasmine et qui permet de donner une explication de la dissociation des complexes équimoléculaires que forment ces inhibiteurs avec les sérine-protéases. Après épuisement de l'inhibiteur actif présent dans le milieu réactionnel, cette dissociation est suivie d'une dégradation du complexe dont le produit final est l' α_1 Achy modifiée.

Nous avons pu montrer d'autre part que l'inactivation produite par la trypsine bovine et l'élastase leucocytaire humaine était due également à une protéolyse limitée laissant penser qu'il existe une liaison cible ou au moins une région cible dans la molécule d' α_1 Achy comme cela a été démontré pour d'autres inhibiteurs sériques.

Dans les milieux biologiques pouvant contenir de telles activités enzymatiques, par exemple les sécrétions bronchiques recueillies après expectoration ou par lavage broncho-alvéolaire, une proportion importante de l' α_1 Achy peut se trouver sous cette forme modifiée inactive qui présente une réactivité immunologique différente de celle de la forme active. Ce point doit être pris en considération dans l'exploitation des résultats des dosages immunologiques et dans leur comparaison avec les résultats de la mesure de l'activité inhibitrice ou de l'activité enzymatique effectuées dans ces sécrétions. Autrement, les dosages immunologiques risquent d'aboutir à des conclusions erronées.

PERSPECTIVES

Nous nous proposons d'effectuer la séparation (avec ou sans agent dissociant) des différents constituants présents dans les mélanges α_1 Achy-cathepsine G et α_1 Achy-chymotrypsine après des temps d'incubation variables. La détermination des séquences N- et C- terminales de ces constituants devrait permettre de définir le site de la coupure protéolytique provoquant la formation de l' α_1 Achy modifiée. Nous tenterons également de mieux suivre le devenir de la "partie enzyme" du complexe à l'aide de ses propriétés immunologiques ou par marquage de l'enzyme à l'iode 125.

Nous envisageons également d'isoler l' α_1 Achy obtenue après action de la trypsine bovine ou de l'élastase leucocytaire humaine ainsi que les fragments produits lors de ces réactions : nous déterminerons si la liaison coupée par ces enzymes est la même que celle qui est hydrolysée par la cathepsine G ou la chymotrypsine.

Nous nous proposons de plus de poursuivre les études concernant les modifications des déterminants antigéniques de la molécule d' α_1 Achy au cours des interactions avec les enzymes ; cet aspect pourrait avoir en effet une répercussion importante sur tous les dosages immunologiques effectués dans des liquides biologiques dans lesquels l' α_1 Achy a pu réagir ou bien réagit encore avec la cathepsine G par exemple.

Enfin, l' α_1 Achy n'agit pas seule et il serait intéressant de voir comment coopèrent les différents inhibiteurs dans la défense du tissu pulmonaire, entre autres, face à des enzymes qui eux aussi agissent simultanément. On entrevoit ici la complexité des phénomènes dont la compréhension nécessite encore de nombreux travaux.

PARTIE TECHNIQUE

PARTIE TECHNIQUE

- T - 1 CHROMATOGRAPHIE D'IMMUNOAFFINITE
- T - 2 ELECTROPHORESES ANALYTIQUES
- T - 3 ISOELECTROFOCALISATION EN PLAQUE D'ISOGEL
- T - 4 TECHNIQUES D'ELECTRO-IMMUNODIFFUSION
- T - 5 METHODES PERMETTANT LA REVELATION D'UNE ACTIVITE ESTERASIQUE OU D'UNE ACTIVITE INHIBITRICE ENVERS DES ENZYMES POSSEDANT UNE ACTIVITE ESTERASIQUE
- T - 6 REDUCTION ET ALKYLATION DES GROUPEMENTS SULFHYDRYLE
- T - 7 DOSAGE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE DE LA CHYMOTRYPSINE, DE LA CATHEPSINE G ET DE L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE PAR METHODE SPECTRO-PHOTOMETRIQUE

T - 1 CHROMATOGRAPHIE D'IMMUNOAFFINITE.

T - 1.1 Préparation des immunoglobulines G d'un immunosérum.

Au cours de notre travail, nous avons été amenée à purifier les immunoglobulines G d'un immunosérum pour répondre à deux nécessités :

- pouvoir préparer une colonne d'immunoaffinité,
- éviter, lors de l'emploi des techniques d'électro-immunodiffusion les réactions "parasites" entre les autres protéines de l'immunosérum et l'échantillon à analyser : ainsi, par exemple, lorsque l'on étudie un mélange contenant un enzyme actif, nous avons pu observer la formation de réactions entre l'enzyme et ses inhibiteurs présents dans l'immunosérum, ce qui complique l'interprétation des résultats.

Pour purifier les immunoglobulines G d'un immunosérum, nous avons appliqué la technique de WIDE (215) reprise par RUOSLAHTI (169). Le protocole est le suivant : à 1 ml d'immunosérum, on ajoute 180 mg de Na_2SO_4 (anhydre). Après dissolution complète, le mélange est maintenu sous agitation très douce pendant 1 heure à 25° C. Les immunoglobulines G qui ont précipité sont obtenues par centrifugation à 4 000 g pendant 20 minutes. Le culot est lavé par du PBS* contenant la même concentration de Na_2SO_4 , une nouvelle centrifugation est effectuée. Les immunoglobulines sont alors dissoutes dans l'eau déminéralisée, dialysées 4 jours contre de l'eau déminéralisée (avec 2 changements par jour), puis lyophilisées.

T - 1.2 Préparation du gel de Sepharose 4 B activé par le bromure de cyanogène et couplage de protéines sur ce gel activé.

Ce protocole peut être appliqué pour coupler toute protéine à du gel de Sepharose. Nous l'avons utilisé pour la préparation de supports pour la chromatographie d'immunoaffinité, le matériel à coupler était donc constitué par des immunoglobulines G préparées à partir d'un immunosérum spécifique.

*PBS : Tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,3 M de pH 7,4 contenant 0,02 % de NaN_3 .

T - 1.2.1 Activation du gel de Sepharose 4 B (selon MARCH et coll (127)).

30 ml de gel de Sepharose 4 B sont lavés sur un verre fritté n° 4 par 1,5 litre d'eau déminéralisée à 0°C. Le gel débarrassé de l'excès d'eau est remis en suspension dans 25 ml de K_2CO_3 2M. Cette suspension est gardée à 0°C sous agitation douce. On ajoute 3,5 ml d'une solution de BrCN dans l'acétonitrile (2 g de BrCN par ml d'acétonitrile). Après un contact de 2 minutes exactement, le gel est replacé sur le verre fritté puis très rapidement lavé par 3 litres d'eau déminéralisée froide.

T - 1.2.2 Couplage des protéines sur le gel activé.

Immédiatement après le lavage par l'eau, le gel de Sepharose activé est placé dans une éprouvette de 100 ml. On y ajoute les immunoglobulines (100 à 150 mg) dissoutes dans 25 ml de $NaHCO_3$ 0,5 M. L'éprouvette est fermée de façon étanche à l'aide de "Parafilm" et elle est soumise à une agitation rotative douce pendant 24 heures à 4°C. Le contenu de l'éprouvette est alors placé sur verre fritté. Afin de contrôler l'efficacité du couplage, le premier filtrat est conservé, dialysé et lyophilisé. Le gel est lavé sur verre fritté par 500 ml de $NaHCO_3$ 0,5 M.

T - 1.2.3 Saturation des sites activés restés éventuellement libres.

Le gel débarrassé de l'excès de tampon par filtration sur verre fritté est transvasé dans un bécher; on y ajoute 2 volumes d'une solution de glycolle 1 M : cette opération permet de saturer les sites activés qui n'auraient pas été occupés par les immunoglobulines G lors du couplage. Le mélange est maintenu sous agitation magnétique douce pendant 3 heures à température du laboratoire. L'excès de glycolle est éliminé par lavage sur verre fritté, d'abord par 500 ml de $NaHCO_3$ 0,5 M, puis par 500 ml de tampon PBS qui sera ultérieurement utilisé pour la chromatographie d'immunoaffinité. Le gel est alors placé dans une colonne de 2 cm de diamètre.

T - 1.3 Chromatographie d'immunoaffinité.

La chromatographie d'immunoaffinité est effectuée à température

ambiante. Par contre, lorsque la colonne n'est pas utilisée, elle est placée à 4° C pour éviter une perte de l'affinité des anticorps. Avant la première utilisation de la colonne, un "cycle à blanc" est effectué : après un lavage abondant par le PBS, la colonne est éluée par le tampon glyccolle 0,2 M, NaCl 0,5 M de pH 2,8. Puis la colonne est de nouveau équilibrée en PBS.

La solution qui doit être soumise à la chromatographie est centrifugée (à 4 000 g pendant 10 minutes) pour éliminer les particules insolubles. Après le dépôt, la colonne est lavée par le tampon PBS. Des fractions de 3 ml sont recueillies. Le lavage est effectué jusqu'à ce que la densité optique à 280 nm de l'éluat revienne à la ligne de base et s'y maintienne pendant le passage d'une quantité de tampon au moins égale au volume mort de la colonne. Puis le matériel retenu est élué par le tampon glyccolle 0,2 M, NaCl 0,5 M de pH 2,8. Après retour de la densité optique à 280 nm de l'éluat à la ligne de base, la colonne est de nouveau équilibrée en tampon PBS. Le pH des fractions éluées par le tampon de pH 2,8 est immédiatement ajusté à 7,5 par l'addition de NaOH 0,1 M. Toutes les fractions recueillies au cours de la chromatographie sont analysées par électro-immunodiffusion avec prédiffusion de l'antigène (voir page T 12) en utilisant, d'une part l'immunsérum anti-protéines sériques totales et, d'autre part, l'immunsérum de même spécificité que les immunoglobulines G fixées sur la colonne. Les résultats obtenus avec l'immunsérum anti-protéines totales indiquent le degré de contamination des fractions retenues sur la colonne et éluées à pH 2,8. Une saturation de la colonne sera visualisée par une réaction avec l'immunsérum spécifique des fractions éluées pendant le premier lavage en PBS. Lorsque les quantités optimales à déposer et le nombre de fractions à recueillir sont bien déterminés, il n'est plus nécessaire d'effectuer les vérifications en électro-immunodiffusion à chaque chromatographie. Le système étant parfaitement reproductible, une analyse est effectuée toutes les dix chromatographies.

Les colonnes d'immunoaffinité peuvent être utilisées plus de 100 fois en donnant de très bons résultats.

T - 2 ELECTROPHORESES ANALYTIQUES.

La technique d'électrophorèse a été effectuée sur des supports différents : gel d'acrylamide ou gel d'agarose.

T - 2.1 Electrophorèse en plaque de gel de polyacrylamide.

Deux systèmes différents d'électrophorèse en gel de polyacrylamide ont été utilisés :

- l'électrophorèse à pH 8,3 sans agent dénaturant en gel à 10 % d'acrylamide,
- l'électrophorèse en présence de SDS en gradient d'acrylamide de 5 à 30 % (SDS-PAGE).

L'équipement, la plupart des solutions stock et un certain nombre de détails techniques sont communs aux deux systèmes.

T - 2.1.1 Equipement, solutions stock, détails techniques communs.

Nous effectuons la séparation électrophorétique sur plaque de gel de 1 mm d'épaisseur, en système vertical avec un appareillage semblable à celui mis au point par KERCKAERT (105). Les dimensions des plaques sont : 10 × 15 cm ; le gel de séparation a une hauteur de 8 cm. Avant de laisser polymériser le gel de séparation, on dépose au-dessus de la solution d'acrylamide, un peu d'eau déminéralisée à l'aide d'une seringue pour obtenir une surface bien plane. Après polymérisation, cette eau est absorbée à l'aide d'un papier filtre.

Le gel supérieur ou gel de concentration est constitué par un gel à 5 % d'acrylamide dans lequel 17 puits de dépôts (de 4 mm de largeur) sont ménagés à l'aide d'un peigne placé avant la polymérisation et qui sera ensuite délicatement enlevé.

L'électrophorèse est effectuée à l'aide d'un redresseur de courant LKB 2103 qui permet de maintenir l'ampérage constant.

Les solutions stock pour la préparation des deux types de gel sont les suivantes (pour 100 ml de solution) :

- 1 A	Tampon de pH 8,9		
	Tris	36,3 g	} pH 8,9
	HCl 1 N	48 ml	
	Temed*	0,46 ml	

*Temed : N,N,N',N' - Tetraméthyléthylènediamine.

Solutions	Gel de séparation	Gel de concentration
1 A	5 ml	1,5 ml
2 A ₂	4 ml	1 ml
H ₂ O	9,9 ml	6,5 ml
Temed	10 µl	5 µl
3 A'	0,7 ml	0,8 ml
Riboflavine	0,2 ml	0,3 ml
	15 ml environ de ce mélange sont utilisés.	4 ml environ sont utilisés.

Tampon d'électrophorèse.

Tris	2,7 g
Glycocolle	16,5 g
H ₂ O	qsp 1,5 litre

Les échantillons que nous étudions sont généralement déjà en solution. Avant d'être déposés, ils sont traités de la façon suivante : à 30 µl d'échantillon, nous ajoutons 10 µl de la "solution échantillon" composée de :

Glycérol	2 ml
Solution 1 B	1 ml
bleu de bromophénol	2,4 mg.

Le volume des dépôts est de l'ordre de 2 à 10 µl (environ 1 à 2 µg d' α_1 Achy purifiée par exemple).

L'électrophorèse est effectuée sous un ampérage constant de 35 mA. Nous mesurons le temps "t" nécessaire pour que le témoin coloré atteigne le bas du gel et l'électrophorèse est poursuivie encore pendant un temps égal à $\frac{t}{2}$.

Après l'électrophorèse, ce gel peut, ou bien être fixé et coloré par le bleu Coomassie comme indiqué précédemment, ou bien utilisé pour la révélation de l'activité estérasique ou de l'activité inhibitrice (voir page T13)

T - 2.1.4 Electrophorèse en gradient d'acrylamide (5 à 30 %) en présence de SDS (système de LAEMMLI (113) légèrement modifié).

Préparation des 2 solutions d'acrylamide pour le gradient :

Solutions	Solution à 5 %	Solution à 30 %
1 A	2,5 ml	2,5 ml
2 A ₂	1 ml	6 ml
H ₂ O	6,3 ml	
Glycérol		1,5 ml
Temed	5 µl	5 µl
3 A'	0,2 ml	0,1 ml
SDS 10 %	0,1 ml	0,1 ml
Riboflavine	0,2 ml	0,1 ml

Le gradient est fait avec un appareil à 2 réservoirs: 8 ml de la solution à 5 % d'acrylamide sont placés dans le compartiment sans agitation, 7 ml de la solution à 30 % d'acrylamide sont placés dans le compartiment où s'effectue le mélange. Avant d'ouvrir la communication entre les deux réservoirs, on laisse s'écouler environ 1 ml de solution à 30 % d'acrylamide.

Le gel de concentration est préparé avec le tampon de pH 6,8 de la façon suivante :

Solutions	
1 B	1,25 ml
2 A ₂	1 ml
H ₂ O	6,9 ml
Temed	5 µl
3 A'	0,2 ml
SDS 10 %	0,1 ml
Riboflavine	0,3 ml

Tampon d'électrophorèse pH 8,3

Tris	2,7 g
Glycocolle	16,5 g
SDS	1,5 g
H ₂ O	qsp 1,5 litre.

Les échantillons à déposer sont préparés de la façon suivante :
à 20 μ l de solution protéique sont ajoutés 20 μ l de "solution échantillon".

Deux "solutions échantillons" différentes peuvent être utilisées
selon que l'on désire ou non réduire l'échantillon.

Préparation des "solutions échantillons" :

	"Solution échantillon" SDS	"Solution échantillon" SDS + β -mercaptoéthanol
Tris	0,65 g	0,65 g
SDS	2 g	2 g
Glycérol	9,34 ml	9,34 ml
Bleu de bromophénol	25 mg	25 mg
Ajuster à pH 6,8 avec HCl		
β -mercaptoéthanol	/	4 ml
H ₂ O	qsp 50 ml	qsp 50 ml

Le mélange de la solution protéique à analyser avec l'une ou l'autre "solution échantillon" est placé dans un bain-marie bouillant pendant 3 minutes, puis après refroidissement est déposé dans un puits du gel. Le volume des dépôts est de l'ordre de 2 à 10 μ l.

Pour la détermination de la M_r , nous utilisons une courbe d'étalonnage qui est établie d'après la migration dans la même expérience de témoins de M_r connues ("low molecular weight calibration kit" de PHARMACIA) qui sont obligatoirement traités par le β -mercaptoéthanol : 2 mg sont dissous dans 20 μ l d'eau et additionnés de 20 μ l de "solution échantillon" SDS + β -mercaptoéthanol. 2 μ l de ce mélange sont déposés.

L'électrophorèse est effectuée sous un ampérage constant de 35 mA jusqu'à ce que le témoin coloré de migration atteigne l'extrémité du gel, ce qui nécessite environ 3 heures.

T - 2.2 Electrophorèse en plaque d'agarose.

Cette électrophorèse est effectuée en plaque d'agarose (de l'Industrie Biologique Française, Indubiose A 45) à 1 % en tampon Véronal de pH 8,6. La préparation du gel, l'appareillage employé, le voltage utilisé (10 volts/cm) correspondent en fait aux conditions utilisées pour la séparation électrophorétique de la première dimension de l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle (voir p. T 12). Cette standardisation permet d'effectuer soit une simple étude électrophorétique après laquelle on peut réaliser différentes révélations ou colorations, soit une étude immunoélectrophorétique.

L'intérêt de ce type d'électrophorèse réside dans le fait qu'en choisissant bien la place où est ménagé le puits de dépôt, il est possible de visualiser un constituant très basique comme la chymotrypsine ou la cathepsine G qui, au cours de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 8,3, sort du gel vers le compartiment de la cathode.

Cette technique facile à mettre en oeuvre est de plus adaptée à des études successives très rapprochées dans le temps.

Le support que nous utilisons est le Gel Bond (F M C corporation, Marine Colloids Division) que l'on peut facilement découper et sur lequel l'agarose adhère bien même lors des passages successifs dans les bains de révélation.

Après électrophorèse, les protéines sont fixées en plaçant la plaque dans un bain de fixation : Acide acétique RP / Eau / Ethanol à 95° (100/450/450 ; v/v) pendant au moins 4 heures. Après séchage, la plaque est colorée par le bleu Coomassie (Brilliant Blue R 250) (5 g/l dans le même mélange que le bain de fixation). La décoloration est effectuée par bains successifs dans le solvant du colorant.

T - 3 ISOELECTROFOCALISATION EN PLAQUE D'ISOGEL.

Cette technique permet la détermination du pI d'une protéine.

T - 3.1 Préparation de la plaque.

Nous utilisons de l'Isogel (agarose dépourvue d'électroendosmose, F M C corporation, Marine Colloids Division) en solution à 1 % dans l'eau déminéralisée, auquel sont ajoutés des ampholytes choisis pour former le gradient de pH désiré. Le volume des ampholytes ajoutés ne doit pas dépasser 10 % du volume d'Isogel. Cette préparation est coulée sur un Gel Bond (110 x 125 mm) pour obtenir une épaisseur de 1,5 mm. En théorie, il n'y a pas d'endroit précis où doit être ménagé le puits de dépôt ; en pratique, on peut être amené à renouveler l'expérience car il est préférable que le puits ne soit pas placé justement à l'endroit où focalisera l'échantillon. L'échantillon est de préférence dissous dans de l'eau déminéralisée.

T - 3.2 Conditions d'électrophorèse.

On utilise un appareil LKB 2117 Multiphor dans lequel la plaque est refroidie pendant la migration. Le contact avec les électrodes est effectué à l'aide de "mèches" épaisses imprégnées d'électrolytes choisis en fonction des ampholytes ajoutés à l'Isogel.

L'électrofocalisation est effectuée sous une puissance constante de 10 watts jusqu'à ce que l'ampérage reste constant pendant 15 minutes au moins, après une chute progressive au cours du temps.

T - 3.3 Détermination du gradient de pH.

Après la migration, la détermination du gradient de pH est effectuée par mesure du pH, tous les centimètres, au moyen d'une électrode de surface. Des marqueurs de pI (PHARMACIA) peuvent également être utilisés.

T - 3.4 Fixation et coloration.

La plaque d'Isogel est ensuite placée pendant au moins 2 heures dans la solution de fixation suivante :

Méthanol / ATCA à 12,5 % / acide sulfo-5-salicylique à 20 % / eau (240/330/140/290 ; v/v).

L'acide sulfo-5-salicylique permet d'éliminer les ampholytes du gel. Pour être séchée, la plaque est recouverte d'une épaisseur de papier "Arches", puis d'une épaisseur de 1 cm de papier de cellulose (papier Lotus).

Après séchage, la plaque est colorée par le colorant utilisé après électrophorèse en plaque d'agarose (T - 2.2).

T - 4 TECHNIQUES D'ELECTRO-IMMUNODIFFUSION.

Les différentes techniques qui se rattachent à l'électro-immunodiffusion et que nous avons utilisées sont :

- l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle selon le principe présenté par LAURELL (117) et adapté par CLARKE et FREEMAN (41),
- la technique dite des "rockets" qui est une technique de dosage immunologique, selon la méthode de LAURELL (118),
- la technique d'électro-immunodiffusion avec prédiffusion de l'antigène selon SVENDSEN et ROSE (198),
- la technique d'immuno-affinoélectrophorèse selon la technique de BØG-HANSEN et coll (27),

Une description complète des trois premières techniques a été donnée dans notre précédent travail (114). Nous précisons seulement ici que nous utilisons de l'Indubiose A 45 à 1 % en tampon Véronal de pH 8,6 :

Véronal sodé	20,6	g	
Véronal acide	4	g	
H ₂ O	qsp	5	litres.

Pour l'immuno-affinoélectrophorèse, nous utilisons un tampon différent, de pH 8,7; la concanavoline A nécessite en effet la présence d'ions Ca⁺⁺. La composition de ce tampon est la suivante :

Tris	44,8	g	(73 mM)
Véronal sodé	4	g	} (24,5 mM)
Véronal acide	19	g	
			.../...

Lactate de calcium	0,55 g	(0,36 mM)
Azide de sodium	0,06 g	(0,2 mM)
H ₂ O	qsp 5	litres.

15 ml d'agarose (Indubiose A 45) à 1 % dans ce tampon de pH 8,7 sont coulés sur une plaque de 10 x 10 cm. Après gélification, une bande de gel est remplacée par de l'agarose (1,1 ml) contenant 100 µl de la solution de concanavaline A (à 10 mg/ml dans le tampon de pH 8,7) (figure T1). En fait, la quantité de concanavaline A à inclure dans le gel a été déterminée expérimentalement en utilisant des quantités croissantes comme cela a été décrit par KERCKAERT et coll (106). Le puits de dépôt est ménagé dans l'agarose contenant la concanavaline A (figure T1). La durée de l'affinoélectrophorèse doit être un peu supérieure à celle de la première dimension de l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle (1 h 20 au lieu de 1 h avec un voltage de 10 volts/cm aux bords de la plaque).

Après cette migration, le gel recouvrant la partie doublement hachurée sur la figure T1 est éliminé et on coule à la place de l'agarose contenant l'immunsérum spécifique. La deuxième dimension et la suite des opérations sont effectuées comme pour une immunoélectrophorèse bidimensionnelle ordinaire.

T - 5 METHODES PERMETTANT LA REVELATION D'UNE ACTIVITE ESTERASIQUE OU D'UNE ACTIVITE INHIBITRICE ENVERS DES ENZYMES POSSEDANT UNE ACTIVITE ESTERASIQUE.

Ces méthodes peuvent être appliquées directement soit après électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 8,3 sans agent dénaturant, soit après électrophorèse en plaque de gel d'agarose à pH 8,6 après un lavage pendant 5 minutes dans le tampon utilisé ensuite au cours de la révélation : tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,4 . Ces méthodes de révélation sont des adaptations de la technique de URIEL et BERGES (206) qui permet de révéler les inhibiteurs de trypsine et de chymotrypsine. Ce type de révélation est également applicable à des gels de polyacrylamide en milieu SDS après en avoir éliminé le SDS selon la méthode de FILHO et De AZEVEDO MOREIRA(59) ou celle de GRANELLI-PIPERNO et REICH (70). Il faut de toute façon vérifier au préalable que l'échantillon analysé conserve ses propriétés estérasiques ou inhibitrices en milieu SDS, ce qui n'est pas le cas de l' α_1 Achy.

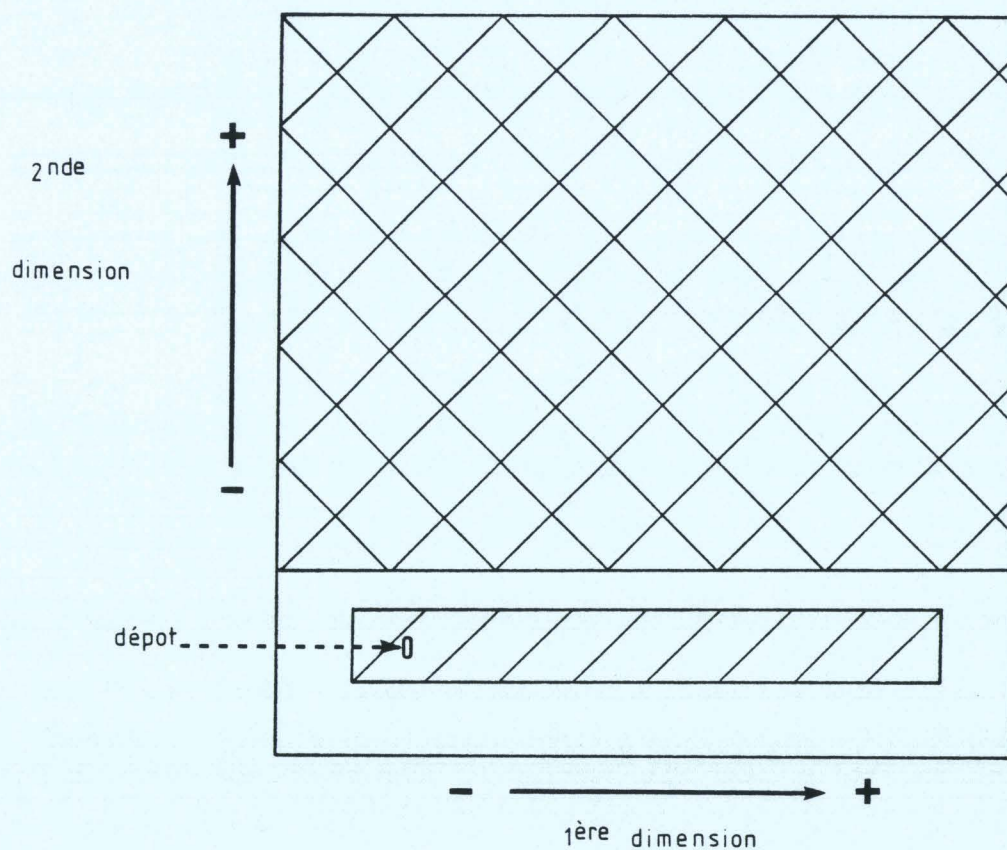


Figure T1 : Schéma de la préparation d'une plaque pour l'étude en affino-immunoélectrophorèse.


 agarose + concanavaline A

 agarose + immunsérum.

Pour la mise en évidence de l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy, l'incubation est effectuée à 37° C dans une solution de chymotrypsine bovine (SIGMA, type VII) à 2 mg/100 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,4 pendant 1/2 heure pour le gel d'agarose et 1 heure pour le gel de polyacrylamide. Le gel est ensuite rincé dans le tampon de pH 7,4 puis la révélation de l'activité estérasique est effectuée de la façon suivante : le gel est placé pendant 40 minutes à température du laboratoire dans le mélange préparé extemporanément de :

la solution a = 10 mg de N-acétyl-DL-phénylalanine- β -naphtyl ester (SIGMA) + 4 ml de N,N diméthyl formamide (SIGMA)

et de la solution b = 50 mg de o-Dianisidine tetrazotée (SIGMA) + 90 ml de tampon de pH 7,4.

Les constituants possédant une activité inhibitrice vis-à-vis de la chymotrypsine apparaissent sous la forme de "spots" transparents sur un fond rose.

L'activité estérasique de constituants est mise en évidence en plaçant la plaque d'électrophorèse dans le même mélange des solutions a et b, sans avoir fait subir au gel l'étape d'incubation dans la solution de chymotrypsine. Les constituants possédant une activité estérasique apparaissent sous forme de spots roses sur un fond transparent. Pour stopper la réaction, la plaque de gel est placée dans de l'acide acétique à 2 %. Une plaque d'agarose révélée de cette façon est ensuite séchée après avoir été recouverte d'une épaisseur de papier filtre. Un gel de polyacrylamide est par contre conservé en sac plastique soudé.

T - 6 REDUCTION ET ALKYLATION DES GROUPEMENTS SULFHYDRYLE.

Nous avons choisi l'aminoéthylation comme méthode d'alkylation des groupements sulfhydryl de l' α_1 Achy. La technique utilisée est dérivée de celle de SCHWARTZ et coll (181). L'étape de réduction est modifiée de la façon suivante : la solution de chlorhydrate de guanidine 6 M a été remplacée par une solution d'urée 8 M (préalablement désionisée sur résine BIORAD AG 11 A 8) tamponnée à pH 8,1 par du Tris 0,2 M. La réduction et l'alkylation sont effectuées sous azote, à l'abri de la lumière et sous agitation magnétique.

10^{-7} mole d' α_1 Achy (soit 5,8 mg) est reprise par 5,8 ml de la solution d'urée 8 M tamponnée. Un excès molaire de dithiothréitol de 40 fois par rapport au nombre de ponts disulfure, calculé à partir de la composition en acides aminés, est ajouté, soit 8×10^{-6} mole, puisque après oxydation performique, la préparation contiendrait environ 1 % d'acide cystéique, donc au maximum 2 ponts disulfure par molécule.

La réduction s'effectue pendant 4 heures à température du laboratoire. Le pH de la solution est alors ajusté à 8,6 par addition de NaOH 1 M, puis on ajoute un excès d'Aminoéthyl 8 (PIERCE) de 25 fois par rapport à la quantité totale de SH présente dans le milieu réactionnel, soit 4×10^{-7} mole pour les SH de la protéine et 16×10^{-6} mole de SH pour le dithiothréitol : on ajoute donc $4,1 \times 10^{-4}$ mole, soit 109 mg d'Aminoéthyl 8 dissous dans du méthanol. Le réactif est ajouté en 2 fois et la réaction est suivie en dosant les SH libres par la méthode au DTNB (réactif d'ELLMAN (56)). Au bout de 2 heures, l'alkylation est complète. Le mélange est ajusté à pH 5,5 avec de l'acide acétique et dialysé ensuite pendant 8 jours contre de l'acide acétique 0,005 M puis lyophilisé.

T - 7 DOSAGE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE DE LA CHYMOTRYPSINE, DE LA CATHEPSINE G ET DE L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE PAR METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE.

Le principe du dosage est la mesure à 410 nm de la libération de paranitroaniline en fonction du temps à partir d'un substrat chromogénique synthétique hydrolysé par l'enzyme. Le dosage est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON (KONTRON) dont le compartiment à cuves est thermostaté à 25° C.

T - 7.1 Dosage de l'activité de la chymotrypsine et de la cathepsine G (144)

Le tampon utilisé pour le dosage est le tampon Hepes 0,1 M de pH 7,5, NaCl 0,5 M, 9 % DMSO*. Le substrat utilisé est le Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA. Il est dissous dans le DMSO, le volume utilisé par dosage est de 10 μ l. La concentration finale en substrat est 10^{-3} M pour le dosage de la cathepsine G et 10^{-4} M pour le dosage de la chymotrypsine.

* DMSO : diméthylsulfoxyde.

La concentration finale en enzyme est de l'ordre de $3 \text{ à } 4 \times 10^{-7} \text{ M}$ pour la cathepsine G et de $1 \text{ à } 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ pour la chymotrypsine ; le volume final dans la cuve est de 1 ml.

T - 7.2 Dosage de l'activité de l'élastase leucocytaire (19).

Le tampon utilisé pour le dosage est le tampon Tris 0,05 M, NaCl 0,5 M de pH 8,0. Le substrat utilisé est le Suc-Ala-Ala-Ala-p-NA dissous dans le *NMP. Le volume utilisé pour le dosage est de 10 μl . La concentration finale en substrat est égale à 10^{-3} M . La concentration finale en enzyme est de l'ordre de $3 \text{ à } 4 \times 10^{-7} \text{ M}$. Le volume final dans la cuve est également de 1 ml.

Lors des expériences d'inhibition d'un enzyme par un inhibiteur, l'activité enzymatique résiduelle est exprimée en pourcentage de l'activité d'une solution d'enzyme de même concentration à laquelle l'inhibiteur n'a pas été ajouté et qui est dosée dans les mêmes conditions.

* NMP : N-méthylpyrrolidone-2

BIBLIOGRAPHIE

	Pages
1 ABILOGAARD, U. (1967) Purification of two progressive antithrombins of human plasma. <u>Scand. J. Clin. Lab. Invest.</u> , <u>19</u> , 190-195.	11
2 ABILOGAARD, U. (1979) A review of antithrombin III. in <u>The physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis</u> (Collen, D., Wiman, B. and Verstraete, M., eds) pp. 19-29., Elsevier/North Holland Biomedical Press.	33
3 ARONSEN, K.F., EKELUND, G., KINDMARK, C.O. and LAURELL, C.B. (1972) Sequential changes of plasma proteins after surgical trauma. <u>Scand. J. Clin. Lab. Invest.</u> , <u>29</u> (Suppl. 124), 127-136.	47
4 ASHWELL, G. and MORELL, A.G. (1974) The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. <u>Adv. Enzymol.</u> , <u>41</u> , 99-128.	21
5 BARRETT, A.J. and STARKEY, P.M. (1973) The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases : charac- teristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. <u>Biochem. J.</u> , <u>133</u> , 709-724.	13
6 BARRETT, A.J., STARKEY, P.M. and MUNN, E.A. (1974) The unique nature of the interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases. in <u>Bayer Symposium V : proteinase inhibitors II</u> (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and Truscheit, E., eds) pp. 72-77, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg and New York.	13
7 BARRETT, A.J., BROWN, M.A. and SAYERS C.A. (1979) The electrophoretically "slow" and "fast" forms of the α_2 -macro- globulin molecule. <u>Biochem J.</u> , <u>181</u> , 401-418.	13, 14, 15, 20
8 BARRETT, A.J. and Mc DONALD, J.K., (1980) Trypsin. in <u>Mammalian proteases : a glossary and bibliography</u> , 1. Endopeptidases (Barrett, A. J. and Mc Donald, J.K., eds) pp. 7-17, Academic Press.	90
9 BARRETT, A.J. and Mc DONALD, J.K. (1980) Chymotrypsin. in <u>Mammalian proteases : a glossary and bibliography</u> , 1. Endopeptidases (Barrett, A.J. and Mc Donald, J.K., eds) pp 18-29, Academic Press.	85
10 BARRETT, A.J. (1980) Leukocyte elastase. in <u>Methods in Enzymology</u> , Vol. <u>80</u> (Lorand, L., ed) pp 581-588, Academic Press.	90, 91

- 11 BAUGH, R.J. and TRAVIS, J. (1976) 89, 91,
Human leukocyte granule elastase : rapid isolation and charac- 96
terization.
Biochemistry, 15, 836-841.
- 12 BAUMSTARK, J.S., LEE, C.T. and LUBY, R.J. (1977) 27, 30
Rapid inactivation of α_1 -protease inhibitor (α_1 -antitrypsin)
by elastase.
Biochim. Biophys. Acta, 482, 400-411.
- 13 BAUMSTARK, J.S., BABIN, D.R., LEE, C.T. and ALLEN, R.C. (1980) 27, 30
Comparative studies on native and elastase-inactivated
 α_1 -protease inhibitor (α_1 -antitrypsin)
Biochim. Biophys. Acta, 628, 293-302.
- 14 BAYARD, B. and KERCKAERT, J.P. (1980) 70, 71
Evidence for uniformity of the carbohydrate chains in indivi-
dual glycoprotein molecular variants.
Biochem. Biophys. Res. Commun. , 95, 777-784.
- 15 BAYARD, B. and KERCKAERT, J.P. (1981) 70, 71
Uniformity of carbohydrate chains within molecular variants
of rat α_1 -fetoprotein with distinct affinity for concanavalin A.
Eur. J. Biochem., 113, 405-414.
- 16 BAYARD, B., KERCKAERT, J.P., LAINE, A. and HAYEM, A. (1982) 23, 53,
Uniformity of glycans within molecular variants of α_1 -protease 70, 71
inhibitor with distinct affinity for concanavalin A.
Eur. J. Biochem, 124, 371-376.
- 17 BEATTY, K., BIETH, J. and TRAVIS, J. (1980) 31, 121,
Kinetics of association of serine proteinases with native and 161, 163
oxidized α_1 -proteinase inhibitor and α_1 -antichymotrypsin.
J. Biol. Chem., 255, 3931-3934.
- 18 BEATTY, K., TRAVIS, J. and BIETH, J. (1982) 21, 123,
The effect of α_2 -macroglobulin on the interaction of α_1 -protei- 161
nase inhibitor with porcine trypsin.
Biochim. Biophys. Acta, 704, 221-226.
- 19 BIETH, J., SPIESS, B. and WERMUTH, C. (1974) 91, T 17
The synthesis and analytical use of a highly sensitive and
convenient substrate of elastase.
Biochem. Med., 11, 350-357.
- 20 BIETH, J. and KLUMPP, T. (1976) 21
Purification of α_2 -macroglobulin with trypsin-like activity
from pleural fluids.
Biochim. Biophys. Acta, 439, 363-367.
- 21 BIETH, J.G.(1980) 121, 152,
Pathophysiological interpretation of kinetic constants of 163
protease inhibitors.
Clin. Resp. Physiol., 16 (suppl.) 183-195.

- 22 BIETH, J.G., TOURBEZ-PERRIN, M. and POCHON, F. (1981) 20
Inhibition of α_2 -macroglobulin-bound trypsin by soybean
trypsin inhibitor.
J. Biol. Chem., 256, 7954-7957.
- 23 BJÖRK, I., DANIELSSON, A., FENTON, J.W. and JÖRNVALL, H. (1981) 34
The site in human antithrombin for functional proteolytic
cleavage by human thrombin.
FEBS Lett., 126, 257-260.
- 24 BJÖRK, I., JACKSON, C.M., JÖRNVALL, H., LAVINE, K.K., NORDLING, K. 36, 161
and SALSGIVER, W.J., (1982)
The active site of antithrombin. Release of the same proteolytically
cleaved form of the inhibitor for complexes with factor IX a, factor Xa and thrombin.
J. Biol. Chem., 257, 2406-2411.
- 25 BLOOM, J.W. and HUNTER, M.J. (1978) 28
Interactions of α_1 -antitrypsin with trypsin and chymotrypsin.
J. Biol. Chem., 253, 547-559.
- 26 BØG-HANSEN, T.C. (1973) 70
Crossed immuno-affino-electrophoresis. A method to predict
the result of affinity chromatography.
Anal. Biochem., 56, 480-488.
- 27 BØG-HANSEN, T.C., BJERRUM, O.J. and RAMLAU, J. (1975) 70, T 12
Detection of biospecific interaction during the first dimension
electrophoresis in crossed immunoelectrophoresis.
Scand.J. Immunol., 4, suppl. 1, 141-147.
- 28 BOSWELL, D.R., JEPSSON, J.O., BRENNAN, S.O. and CARRELL, R.W. 29, 30
(1983)
The reactive site of α_1 -antitrypsin is C-terminal, not N-terminal.
Biochim. Biophys. Acta, 744, 212-218.
- 29 BOUDIER, C., ANDERSSON, K.K., BALNY, C. and BIETH, J. (1980) 91, 92
Enhancement of human leukocyte elastase activity by ionic
strength.
Biochem. Med., 23, 219-222.
- 30 BOUDIER, C., HOLLE, C. and BIETH, J. (1981) 88
Stimulation of the elastolytic activity of leukocyte elastase
by leukocyte cathepsin G.
J. Biol. Chem., 256, 10256-10258.
- 31 BREHM, S.P., HOCH, S.O. and HOCH, J.A. (1975) 48, 164
DNA-binding proteins in human serum.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 24-31.
- 32 BROWER, M.S. and HARPEL, P.C. (1982) 46, 159
Proteolytic cleavage and inactivation of α_2 -plasmin inhibitor
and C $\bar{1}$ -inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase.
J. Biol. Chem., 257, 9849-9854.

- 33 BROWN, R.K., BAKER, W.H., PETERKOFISKY, A. and KAUFFMAN, D.L. (1954) 11
Crystallization and properties of a glycoprotein isolated from
human plasma.
J. Amer. Chem. Soc., 76, 4244
- 34 CARP, H., MILLER, F., HOIDAL, J.R. and JANOFF, A. (1982) 77
Potential mechanism of emphysema : α_1 -proteinase inhibitor re-
covered from lungs of cigarette smokers contains oxidized
methionine and has decreased elastase inhibitory capacity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2041-2045.
- 35 CARRELL, R.W. and OWEN, M.C. (1979) 32
 α_1 -antitrypsin : structure, variation and disease
Essays Med. Biochem., 4, 83-119.
- 36 CARRELL, R., OWEN, M., BRENNAN, S. and VAUGHAN, L. (1979) 29, 36
Carboxy-terminal fragment of human α_1 -antitrypsin from hydroxy-
lamine cleavage : homology with antithrombin III.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 91, 1032-1037.
- 37 CARRELL, R.W., BOSWELL, D.R., BRENNAN, S.O. and OWEN, M.C. (1980) 29, 30
Active site of α_1 -antitrypsin : homologous site in antithrom-
bin III.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 93, 399-402.
- 38 CARRELL, R.W., JEPSSON, J.O., VAUGHAN, L., BRENNAN, S.O., OWEN, 23, 29
M.C. and BOSWELL, D.R. (1981)
Human α_1 -antitrypsin : carbohydrate attachment and sequence
homology.
FEBS. Lett., 135, 301-303.
- 39 CARRELL, R.W., JEPSSON, J.O., LAURELL, C.B., BRENNAN, S.O., OWEN, 23
M.C., VAUGHAN, L. and BOSWELL, D.R. (1982)
Structure and variation of human α_1 -antitrypsin.
Nature, 298, 329-334.
- 40 CHAN, S.K., REES, D.C., LI, S.C. and LI, Y.T. (1976) 23
Linear structure of the oligosaccharide chains in α_1 -protease
inhibitor isolated from human plasma.
J. Biol. Chem., 251, 471-476.
- 41 CLARKE, H.G.M. and FREEMAN, T. (1967) T 12
Quantitative immunoelectrophoresis method (Laurell electropho-
resis).
in Protides of the biological fluids, 14th Colloquium 1966
(Peeters, H., ed) pp 503-509, Elsevier Amsterdam.
- 42 CLEMMENSEN, I. (1979) 42
Different molecular forms of α_2 -antiplasmin.
in The physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis
(Collen, D., Wiman, B. and Verstraete, M., eds) pp 131-136,
Elsevier/ North Holland Biomedical press.
- 43 CLEMMENSEN, I., THORSEN, S., MÜLLERTZ, S. and PETERSEN, L.C. (1981) 80
Properties of three different molecular forms of the α_2 - plas-
min inhibitor.
Eur. J. Biochem. 120, 105-112.

- 44 COHEN, A.B., GECZY, D. and JAMES, H.L. (1978) 26, 30
Interaction of human α_1 -antitrypsin with porcine trypsin.
Biochemistry, 17, 392-400
- 45 COLLEN, D. (1976) 12, 41, 42
Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma.
Eur. J. Biochem., 69, 209-216.
- 46 COLLEN, D. and DE COCK, F. (1978) 38, 139
Neoantigenic expression in enzyme-inhibitor complexes. A means to demonstrate activation of enzyme systems.
Biochim. Biophys. Acta, 525, 287-290.
- 47 Mc CONNELL, D.J. and LOEB, J.N. (1974) 12
Kallikrein inhibitory capacity of α_2 -macroglobulin subunits.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 147, 891-896.
- 48 DANIELSSON, A. et BJÖRK, I. (1980) 34, 123, 161, 162
Slow, spontaneous dissociation of the antithrombin-thrombin complex produces a proteolytically modified form of the inhibitor.
FEBS Letters, 119, 241-244.
- 49 DANIELSSON, A. and BJÖRK, I. (1982) 38, 39, 162
Mechanism of inactivation of trypsin by antithrombin.
Biochem. J., 207, 21-28.
- 50 DAVIS, B.J. (1964) T 6
Disc electrophoresis.II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- 51 DEL MAR, E.G., LARGMAN, C., BRODRICK, J.W. and GEOKAS, M.C. (1979) 85
A sensitive new substrate for chymotrypsin.
Anal. Biochem., 99, 316-320.
- 52 DIEZEL, W., KOPPERSCHLAGER, G. and HOFMANN, E. (1972) T 6
An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant blue.
Anal. Biochem., 48, 617-620.
- 53 Mac DUFFIE F.C., PETERSON, J.M., CLARK, G. and MANN, K.G. (1981) 38, 139
Antigenic changes produced by complex formation between thrombin and antithrombin III.
J. Immunol., 127, 239-244.
- 54 EDMAN, P. (1956) 73
On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides.
Acta. Chem. Scand., 10, 761-768.
- 55 EDY, E. and COLLEN, D. (1977) 46
The interaction in human plasma of antiplasmin. The fast reacting plasmin inhibitor, with plasmin, thrombin, trypsin and chymotrypsin.
Biochim. Biophys. Acta, 484, 423-432.

- 56 ELLMAN, G.L. (1959) 69, T 16
Tissue sulfhydryl groups.
Archives Biochem. Biophys., 82, 70-77.
- 57 ERIKSSON, S. (1964) 31
Pulmonary emphysema and alpha-antitrypsin deficiency.
Acta Med. Scand., 175, 197-202.
- 58 FAGERHOL, M.K. and LAURELL, C.B. (1967) 22
The polymorphism of "prealbumins" and α_1 -antitrypsin in human sera
Clin. Chim. Acta, 16, 199-203.
- 59 FILHO, J.X. and De AZEVEDO MOREIRA, R. (1978) 79, T 13
Visualization of proteinase inhibitors in SDS-polyacrylamide gels.
Anal. Biochem., 84, 296-303.
- 60 FISH, W.W., ORRE, K. and BJÖRK, I. (1979) 34
The production of an inactive form of antithrombin through limited proteolysis by thrombin.
FEBS Lett., 98, 103-106.
- 61 FISH, W.W. and BJÖRK, I. (1979) 34, 35, 38
Release of a two-chain form of antithrombin from the antithrombin-thrombin complex.
Eur. J. Biochem., 101, 31-38.
- 62 FISH, W.W., ORRE, K. and BJÖRK, I. (1979) 35
Routes of thrombin action in the production of proteolytically modified secondary forms of antithrombin-thrombin complex.
Eur. J. Biochem., 101, 39-44.
- 63 FOSTER, J., BRUENGER, E., RUBIN, L., IMBERMAN, M., KAGAN, H., 88
MECHAM, R. and FRANZBLAU, C. (1976)
Circular dichroism studies of an elastin crosslinked peptide.
Biopolymers, 15, 833-841.
- 64 FRANZEN, L.E., SVENSSON, S. and LARM, O. (1980) 33
Structural studies on the carbohydrate portion of human antithrombin III.
J. Biol. Chem., 255, 5090-5093.
- 65 FRYKSMARK, U., OHLSSON, K., ROSENGREN, M. and TEGNER, H. (1981) 2
A radioimmunoassay for measurement and characterization of human antileukoprotease in serum.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 1273-1277.
- 66 GADEK, J.E., HUNNINGHAKE, G.W., FELS, G.A., ZIMMERMAN, R.L. 84
KEOGH, B.A. and CRYSTAL, R.G. (1980)
Evaluation of the protease-antiprotease theory of human obstructive lung disease.
Clin. Resp. Physiol., 16 (Suppl.), 27-39.
- 67 GERBER, A. Ch., CARSON, J.H. and HADORN, B. (1974) 85
Partial purification and characterization of a chymotrypsin-like enzyme from human neutrophil leukocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 364, 103-112.

- 68 GIANAZZA, E. and ARNAUD, P. (1981) 66, 123,
Isoelectric patterns of human α_1 -antichymotrypsin (A_1 Achy) 155
and A_1 Achy-protease complexes.
Electrophoresis, 2, 247-250.
- 69 GLASER, C.B., KARIC, L., HUFFAKER, T., CHANG, R. and MARTIN, J. 24, 68
(1982)
Studies on the disulfide region of α_1 -protease inhibitor.
Int. J. Peptide Protein Res., 20, 56-62.
- 70 GRANELLI-PIPERNO, A. and REICH, E. (1978) 79, T 13
A study of proteases and protease inhibitor complexes in biological fluids.
J. Exp. Med., 148, 223-234.
- 71 GRIFFITH, M.J. and LUNDBLAD, R.L. (1981) 38
Dissociation of antithrombin III-thrombin complex. Formation of active and inactive antithrombin III.
Biochemistry, 20, 105-110.
- 72 HARTLEY, B.S. (1960) 12
Proteolytic enzymes.
Annu. Rev. Biochem., 29, 45-72.
- 73 HEDNER, U. (1973) 11
Studies on an inhibitor of plasminogen activation in human serum.
Thrombos. Diathes. Haemorrh., 30, 414-424.
- 74 HEIDE, K., HEIMBURGER, N. and HAUPT, H. (1965) 11
An inter-alpha trypsin inhibitor of human serum.
Clin. Chim. Acta, 11, 82-85.
- 75 HEIMBURGER, N. and HAUPT, H. (1965) 11, 47, 52
Characterisierung von α_1 X-Glykoprotein als Chymotrypsin-Inhibitor des Humanplasmas. 67, 69, 76
Clin. Chim. Acta, 12, 116-118. 79, 155
- 76 HEIMBURGER, N. (1967) 11
On the proteinase inhibitors of human plasma with especial reference to antithrombin.
In 1st international Symposium on tissue factors in the haemostasis of the coagulation-fibrinolysis System, 1, pp 353-
Unione Chimica Medicamenti, Florence, Italy.
- 77 HEIMBURGER, N., HAUPT, H. and SCHWICK, H.G., (1970) 10
Proteinase inhibitors of human plasma.
in Proceedings of the international Research conference on proteinase inhibitors (Fritz, H. and Tschesche, H., eds) pp 1-21,
Berlin : Walter de Gruyter-1971.
- 78 HEIMBURGER, N. (1974) 10
Biochemistry of proteinase inhibitors from human plasma : a review of recent development.
in Bayer Symposium V : Proteinase inhibitors II (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., and Truscheit, E., eds) pp 14-22,
Springer Verlag, New-York.

- 79 HERCZ, A., KATONA, E., CUTZ, E., WILSON, J.R., and BARTON, M. (1978) 32
 α_1 -antitrypsin : the presence of excess mannose in the Z variant isolated from liver.
Science, 201, 1229-1232.
- 80 HIRS, C.H.W. (1967) 68
 Determination of cystine as cysteic acid.
 in Methods in Enzymology Vol. 11 (Hirs, C.H.W., ed.) pp 59-62,
 Academic Press.
- 81 HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S. and WERLE, E. (1972) 2
 Isolierung und Charakterisierung eines Proteasen-inhibitors aus
 menschlichem Bronchialsekret.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 221-226.
- 82 HODGES, L.C., LAINE, R. and CHAN, S.K. (1979) 23
 Structure of the oligosaccharide chains in human α_1 -protease
 inhibitor.
J. Biol. Chem., 254, 8208-8212.
- 83 HODGES, L.C. and CHAN, S.K. (1982) 23
 Locations of oligosaccharide chains in human α_1 -protease inhibitor and oligosaccharide structures at each site.
Biochemistry, 21, 2805-2810.
- 84 IMBER, M.J. and PIZZO, S.V. (1981) 21
 Clearance and binding of two electrophoretic "fast" forms of
 human α_2 -macroglobulin.
J. Biol. Chem., 256, 8134-8139.
- 85 JACOBSSON, K. (1955) 11
 Studies on the trypsin and plasmin inhibitors in human blood
 serum.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 14 (suppl), 55.
- 86 JAMES, G.T. (1978) 97, 126,
 Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl 149, 151
 fluoride in buffers.
Anal. Biochem., 86, 574-579.
- 87 JAMES, H.L. and COHEN, A.B. (1978) 26, 29,
 Mechanism of inhibition of porcine elastase by human alpha-1- 30
 antitrypsin.
J. Clin. Invest., 62, 1344-1353.
- 88 JANOFF, A. and SCHERER, J., (1968) 90
 Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes.
J. Exp. Med., 128, 1137-1151.
- 89 JANOFF, A. and CARP, H. (1977) 31
 Possible mechanisms of emphysema in smokers. Cigarette smoke condensate suppresses protease inhibition in vitro.
Am. Rev. Resp. Dis., 116, 65-72.

- 90 JEPPSSON, J.O. and LAURELL, C.B. (1975) 24
Function and chemical composition of α_1 -antitrypsin.
in Proteases and biological control (Reich, E., Rifkin, D.B.
and Shaw, E., eds) pp. 405-414. Cold Spring Harbor.
- 91 JEPPSSON, J.O. (1976) 32
Amino acid substitution Glu $\rightarrow$ Lys in α_1 -antitrypsin PiZ.
FEBS Lett., 65, 195-197.
- 92 JEPPSSON, J.O. and FRANZEN, B. (1982) 22
Typing of genetic variants of α_1 -antitrypsin by electrofocusing.
Clin. Chem., 28, 219-225.
- 93 JESTY, J. (1979) 36
Dissociation of complexes and their derivatives formed during
inhibition of bovine thrombin and activated Factor X by anti-
thrombin III.
J. Biol. Chem., 254, 1044-1049.
- 94 JOCHUM, M., LANDER, S., HEIMBURGER, N. and FRITZ, H. (1981) 41, 159
Effect of human granulocyte elastase on isolated human anti-
thrombin III.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 103-112.
- 95 JOHNSON, D., PANNELL, R. and TRAVIS, J. (1974) 25
The molecular stoichiometry of trypsin inhibition by human
alpha-1-proteinase inhibitor.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 57, 584-589.
- 96 JOHNSON, D. and TRAVIS, J. (1975) 28
Mechanism and structure of human alpha-1-proteinase inhibitor.
in Protides of the Biological Fluids,
23th. Colloquium 1975, (Peeters, H., ed) pp. 35-38, Elsevier,
Amsterdam.
- 97 JOHNSON, D. and TRAVIS, J. (1976) 25, 29, 30
Human α_1 -proteinase inhibitor mechanism of action : evidence
for activation by limited proteolysis.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 72, 33-39.
- 98 JOHNSON, D. and TRAVIS, J. (1977) 159
Inactivation of human α_1 -proteinase inhibitor by thiol protei-
nases.
Biochem. J., 163, 639-641.
- 99 JOHNSON, D. and TRAVIS, J. (1978) 25, 29, 30
Structural evidence for methionine at the reactive site of
human α_1 -proteinase inhibitor.
J. Biol. Chem., 253, 7142-7144.
- 100 JOHNSON, D. and TRAVIS, J. (1979) 25, 31, 160
The oxidative inactivation of human α_1 -proteinase inhibitor.
J. Biol. Chem., 254, 4022-4026.
- 101 JONES, J.M., CREETH, J.M. and KEKWICK, R.A. (1972) 12
Thiol reduction of human α_2 -macroglobulin. The subunit structu-
re.
Biochem. J., 127, 187-197.

- 102 JORNVALL, H., FISH, W.W. and BJÖRK, I. (1979) 34
The thrombin cleavage site in bovine antithrombin.
FEBS Lett., 106, 358-362.
- 103 KAPLAN, J., RAY, F.A. and KEOGH, E.A. (1981) 21
Recognition of nucleophile treated α_2 -macroglobulin by the
alveolar macrophage α -macroglobulin - protease complex recep-
tor.
J. Biol. Chem., 256, 7705-7707.
- 104 KATSUNUMA, T., TSUDA, M., KUSUMI, T., OHKUBO, T., MITOMI, T., 48, 57,
NAKASAKI, H., TAJIMA, T., YOKOYAMA, S., KAMIGUCHI, H., KOBAYASHI, K. 58, 164
and SHINODA, H. (1980)
Purification of a serum DNA binding protein (64 DP) with a
molecular weight of 64,000 and its diagnostic significance in
malignant diseases.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 93, 552-557.
- 105 KERCKAERT, J.P., (1978) T-5
Highly simplified analytical or preparative slab gel electro-
phoresis.
Anal. Biochem., 84, 354-360.
- 106 KERCKAERT, J.P., BAYARD, B. and BISERTE, G. (1979) T-13
Microheterogeneity of rat, mouse and human α -fetoprotein as
revealed by polyacrylamide gel electrophoresis and by crossed
immuno-affino-electrophoresis with different lectins.
Biochim. Biophys. Acta, 576, 99-108.
- 107 KEZDY, F.J. and KAISER, E.T. (1970) 98
Principles of active site titration of proteolytic enzymes.
in Methods in Enzymology, Vol. 19 (Perlmann, G.E., and Lorand,
L., eds) pp. 3-20, Academic Press.
- 108 KRESS, L.F. and CATANESE, J. (1980) 40, 159
Enzymatic inactivation of human antithrombin III. Limited pro-
teolysis of the inhibitor by snake venom proteinases in the
presence of heparin.
Biochim. Biophys. Acta, 615, 178-186.
- 109 KRESS, L.F. and CATANESE, J.J. (1981) 40, 159
Identification of the cleavage sites resulting from enzymatic
inactivation of human antithrombin III by crotalus adamanteus
proteinase II in the presence and absence of heparin.
Biochemistry, 20, 7432-7438.
- 110 KRUSIUS, T., FINNE, J. and RAUVALA, H. (1976) 70
The structural basis of the different affinities of two types
of acidic N-glycosidic glycopeptides for concanavalin A -
Sephrose.
FEBS Lett., 71, 117-120.
- 111 KURACHI, K., SCHMER, G., HERMODSON, M.A., TELLER, D.C. and DAVIE, 33
E.W. (1976)
Characterization of human, bovine and horse antithrombin III.
Biochemistry, 15, 368-373.

- 112 KURACHI, K., CHANDRA, T., FRIEZNER DEGEN, S.J., WHITE, T.T.,
MARCHIORO, T.L., WOO, S.L.C. and DAVIE, E.W. (1981) 23, 29
Cloning and sequence of cDNA coding for α_1 -antitrypsin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6826-6830.
- 113 LAEMMLI, U.K. (1970) T-8
Cleavage of structural proteins during the assembly of the
head of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680-685.
- 114 LAINE, A. (1975) 2, T 12
Etude des protéides de la sécrétion bronchique humaine.
Thèse de 3ème cycle. Faculté des Sciences et Techniques de
Lille.
- 115 LAU, H.K. and ROSENBERG, R.D. (1980) 38, 139
The isolation and characterization of a specific antibody
population directed against the thrombin-antithrombin complex.
J. Biol. Chem., 255, 5885-5893.
- 116 LAURELL, C.B. and ERIKSSON, S. (1963) 22
The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in α_1 -anti-
trypsin deficiency.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 15, 132-140.
- 117 LAURELL, C.B. (1965) T 12
Antigen antibody crossed electrophoresis.
Anal. Biochem., 10, 358-361.
- 118 LAURELL, C.B. (1966) T 12
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in aga-
rose gel containing antibodies.
Anal. Biochem., 15, 45-52.
- 119 LAURELL, C.B., THULIN, E. and BYWATER, R.P. (1977) 23, 53
Thiol-disulfide interchange chromatography using Sepharose-
linked thiol compounds to separate plasma proteins.
Anal. Biochem., 81, 336-345.
- 120 LIEBERMAN, J., MITTMAN, C. and KENT, J.R. (1971) 31
Screening for heterozygous α_1 -antitrypsin deficiency. III.
A provocative test with diethyl stilbestrol and effect of
oral contraceptives.
J. Amer. Med. Ass., 217, 1198-1206.
- 121 LIEBERMAN, J., MITTMAN, C. and GORDON, H.W. (1972) 31
 α_1 -antitrypsin in the livers of patients with emphysema.
Science, 175, 63-65.
- 122 LIS, H. and SHARON, N. (1973) 70
The biochemistry of plant lectins (phyto-hemagglutinins)
Ann. Rev. Biochem., 42, 541-574.
- 123 LO, T.N., COHEN, A.B. and JAMES, H.L. (1976) 26, 30
The interaction of α_1 -antitrypsin with soluble and Sepharose
bound elastase.
Biochim. Biophys. Acta, 453, 344-346.

- 124 LÖBERMANN, H., LOTSPEICH, F., BODE, W. and HUBER, R. (1982) 124, 126, 147
Interaction of human α_1 -proteinase inhibitor with chymotrypsinogen A and crystallization of a proteolytically modified α_1 -proteinase inhibitor.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 363, 1377-1388.
- 125 LONGAS, M.O. and FINLAY, T.H. (1980) 34, 36, 37
The covalent nature of the human antithrombin III-thrombin bond.
Biochem. J., 189, 481-489.
- 126 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, H.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951) 95, 96
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 127 MARCH, S.C., PARIKH, I. and CUATRECASAS, P. (1974) T 3
A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography.
Anal. Biochem., 60, 149-152.
- 128 MARTODAM, R.R., BAUGH, R.J., TWUMASI, D.Y. and LIENER, I.E. (1979) 88, 89
A rapid procedure for the large scale purification of elastase and cathepsin G from human sputum.
Preparative Biochemistry, 9, 15-31.
- 129 MARTODAM, R.R. and LIENER, I.E. (1981) 28, 29, 30
The interaction of α_1 -antitrypsin with trypsin, chymotrypsin and human leukocyte elastase as revealed by end group analysis.
Biochim. Biophys. Acta, 667, 328-340.
- 130 MATSUMOTO, M., YAMAMURA, M., TSUDA, M., TAKADA, S. and KATSUNUMA, T. (1982) 76, 123
The biological activity of α_1 -antichymotrypsin : the change of chymotrypsin-inhibitory and immunoenhancing activities by heat treatment.
J. Biochem., 92, 1979-1983.
- 131 MEGA, T., LUJAN, E. and YOSHIDA, A. (1980) 23
Studies on the oligosaccharide chains of human α_1 -protease inhibitor .I. Isolation of glycopeptides.
J. Biol. Chem., 255, 4053-4056.
- 132 MEGA, T., LUJAN, E. and YOSHIDA, A. (1980) 23
Studies on the oligosaccharide chains of human α_1 -protease inhibitor.II. Structure of oligosaccharides.
J. Biol. Chem., 255, 4057-4061.
- 133 MILLER-ANDERSSON, M., ANDERSSON, L.O. and BORG, H. (1973) 11
Isolation and characterization of a new immediate antithrombin from human plasma.
4th International Symposium on thrombosis and haemostasis, Abs. 181.
- 134 MILLER-ANDERSSON, M., BORG, H. and ANDERSSON, L.O. (1974) 32
Purification of antithrombin III by affinity chromatography.
Thromb. Res., 5, 439-452.

- 135 MORAWITZ, P. (1905) 32
 Die Chemie der Blutgerinnung.
Ergebnis. der Physiol., 4, 307-422.
- 136 MORII, M., ODANI, S., KOIDE, T. and IKENAKA, T. (1978) 27
 Human α_1 -antitrypsin. Characterization and N- and C-terminal
 sequences.
J. Biochem., 83, 269-277.
- 137 MORII, M., ODANI, S. and IKENAKA, T. (1979) 27, 29,
 Characterization of a peptide released during the reaction of 30
 human α_1 -antitrypsin and bovine chymotrypsin.
J. Biochem., 86, 915-921.
- 138 MORII, M. and TRAVIS, J. (1983) 74, 75,
 Structural alterations in alpha₁-antichymotrypsin from nor- 153
 mal and acute phase human plasma.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 111, 438-443.
- 139 MOROI, M. and YAMASAKI, M. (1974) 24, 25,
 Mechanism of interaction of bovine trypsin with human α_1 -anti- 30
 trypsin.
Biochim. Biophys. Acta, 359, 130-141.
- 140 MOROI, M. and AOKI, N. (1976) 12, 41,
 Isolation and characterization of α_2 -plasmin inhibitor from 42
 human plasma.
J. Biol. Chem., 251, 5956-5965.
- 141 MOROI, M. and AOKI, N. (1977) 46
 On the interaction of α_2 -plasmin inhibitor and proteases.
 Evidence for the formation of a covalent crosslinkage and
 non-covalent weak bondings between the inhibitor and protea-
 ses.
Biochim. Biophys. Acta, 482, 412-420.
- 142 MORTENSEN, S.B., SOTTRUP-JENSEN, L., HANSEN, H.F., PETERSEN, T.E., 14, 16
 and MAGNUSSON, S. (1981)
 Primary and secondary cleavage sites in the bait region of
 α_2 -macroglobulin.
FEBS. Lett., 135, 295-300.
- 143 MÜLLERTZ, S. and CLEMMENSEN, I. (1976) 12, 41,
 The primary inhibitor of plasmin in human plasma. 42
Biochem. J., 159, 545-553.
- 144 NAKAJIMA, K., POWERS, J.C., ASHE, B.M. and ZIMMERMAN, M. (1979) 88, 128,
 Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G T 16
 and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates
 related to the α_1 -protease inhibitor reactive site.
J. Biol. Chem., 254, 4027-4032.
- 145 NEURATH, H. and WALSH, K.A. (1976) 5, 6
 The role of proteases in biological regulation.
 in Proteolysis and physiological regulation (Ribbons, D.W.
 and Brew, K., eds) pp. 29-40 Academic Press.

- 146 NILSSON, T. and WIMAN, B. (1982) 44, 162
On the structure of the stable complex between plasmin and α_2 -antiplasmin.
FEBS Lett., 142, 111-114.
- 147 ODA, K., LASKOWSKI, M. Sr., KRESS, L.F. and KOWALSKI, D. (1977) 26, 30, 123, 161
Human plasma α_1 -proteinase inhibitor : temporary inhibition and multiple molecular forms of the complex with porcine trypsin.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 1062-1070.
- 148 OHLSSON, K. (1974) 24
Interaction between endogenous proteases and plasma protease inhibitors in vitro and in vivo.
In Bayer Symposium V : proteinase inhibitors II (Fritz, H. Tschesche, H., Greene, L.J. and Truscheit, E., eds) pp. 96-105, Springer Verlag, New York.
- 149 OHLSSON, K. and OLSSON, I. (1974) 91
The neutral proteases of human granulocytes : isolation and partial characterization of granulocyte elastases.
Eur. J. Biochem., 42, 519-527.
- 150 OHLSSON, K. and DELSHAMMAR, M. (1975) 21
Interaction between granulocyte elastase and collagenase and the plasma protease inhibitors in vitro and in vivo.
In Dynamics of connective tissue macromolecules, (Burleigh, P.M.C. and Poole, A.R., eds) pp. 259-275, North Holland, Publishing Co. Amsterdam and London.
- 151 OHLSSON, K. and AKESSON, U. (1976) 47, 48
 α_1 -antichymotrypsin interaction with cationic proteins from granulocytes.
Clin. Chim. Acta, 73, 285-291.
- 152 OHLSSON, K. and LAURELL, C.B. (1976) 13
The disappearance of enzyme-inhibitor complexes from the circulation of man.
Clin. Sci. Mol. Med., 51, 87-92.
- 153 OHLSSON, K., TEGNER, H. and AKESSON, U. (1977) 2
Isolation and partial characterization of a low molecular weight acide stable protease inhibitor from human bronchial secretion.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 583-589.
- 154 OHLSSON, K., FRYSMARK, U. and TEGNER, H. (1980) 31
The effect of cigarette smoke condensate on α_1 -antitrypsin, antileukoprotease and granulocyte elastase.
Europ. J. Clin. Invest., 10, 373-379.
- 155 ORJASAETER, H. (1976) 48
Study of substances related to carcinoembryonic antigens, CEA-NCA and association with α_1 -antichymotrypsin.
Acta. path. Microbiol. Scand., Sect. C, 84, 235-244.

- 156 OWEN, M.C., CARRELL, R.W., and BRENNAN, S.O. (1976) 32
The abnormality of the S variant of human α_1 -antitrypsin.
Biochim. Biophys. Acta, 453, 257-261.
- 157 OWEN, W.G. (1975) 34, 36
Evidence for the formation of an ester between thrombin and
heparin cofactor.
Biochim. Biophys. Acta, 405, 380-387.
- 158 PANNELL, R., JOHNSON, D. and TRAVIS, J. (1974) 11
Isolation and properties of human plasma α_1 -proteinase inhi-
bitor.
Biochemistry, 13, 5439-5445.
- 159 PENKE, B., FERENCZI, R. and KOVACS, K. (1974) 67
A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in
peptides and proteins.
Anal. Biochem., 60, 45-50.
- 160 PENSKEY, J., LEVY, L.R. and LEPOW, I.H. (1961) 11
Partial purification of a serum inhibitor of C'1-esterase.
J. Biol. Chem., 236, 1674-1679.
- 161 PENSKEY, J. and SCHWICK, H.G. (1969) 11
Human serum inhibitor of C'1-esterase : identity with
 α_2 -neuraminoglycoprotein.
Science, 163, 698-699.
- 162 PETERSEN, T.E., DUDEK-WOJCIECHOWSKA, G., SOTTRUP-JENSEN, L. and 33, 77
MAGNUSSON, S. (1979)
Primary structure of antithrombin III (heparin cofactor).
Partial homology between α_1 -antitrypsin and antithrombin III.
in The physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis (Collen, D., Wiman, B. and Verstraete, M., eds)
pp. 43-54, Elsevier/ North-Holland Biomedical Press.
- 163 PLOW, E.F., WIMAN, B. and COLLEN, D. (1980) 44, 45
Changes in antigenic structure and conformation of α_2 -anti-
plasmin induced by interaction with plasmin.
J. Biol. Chem., 255, 2902-2906.
- 164 POWERS, J.C., CARROLL, D.L. (1975) 128
Reaction of acyl carbazates with proteolytic enzymes.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 67, 639-644.
- 165 PRIEELS, J.P., PIZZO, S.V., GLASGOW, L.R., PAULSON, J.C. and 21
HILL, R.L. (1978)
Hepatic receptor that specifically binds oligosaccharides
containing fucosyl $\alpha 1 \rightarrow 3$ N-acetylglucosamine linkages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75, 2215-2219.
- 166 REILLY, C.F. and TRAVIS, J. (1980) 88
The degradation of human lung elastin by neutrophil proteina-
ses.
Biochim. Biophys. Acta, 621, 147-155.

- 167 RINDLER-LUDWIG, R. and BRAUNSTEINER, H. (1975) 47, 85
Cationic proteins from human neutrophil granulocytes.
Evidence for their chymotrypsin-like properties.
Biochim. Biophys. Acta, 379, 606-617.
- 168 ROSENBERG, R.D. and DAMUS, P.S. (1973) 33
The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor.
J. Biol. Chem., 248, 6490-6505.
- 169 RUOSLAHTI, E. (1976) T 2
Antigen-antibody precipitates and immuno-adsorbents.
Application to purification of alpha-foetoprotein.
Scand. J. of Immunol. Suppl. 3 (Ruoslahti, E., ed) pp. 45-49.
- 170 RYLEY, H.C. and BROGAN, T.D. (1973) 47
Quantitative immunoelectrophoretic analysis of the plasma proteins in the sol phase of sputum from patients with chronic bronchitis.
J. Clin. Path., 26, 852-856.
- 171 SAKLATVALA, J., WOOD, G.C. and WHITE, D.D. (1976) 28
Isolation and characterization of human plasma α_1 -proteinase inhibitor and a conformational study of its interaction with proteinases.
Biochem. J., 157, 339-351.
- 172 SATOH, J., KURECKI, J., KRESS, L.F. and LASKOWSKI, M. Sr. (1978) 123
The dual nature of the reaction between porcine elastase and human plasma α_1 -proteinase inhibitor.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 86, 130-137.
- 173 SAUNDERS, R., DYCE, B.J., VANNIER, W.E. and HAVERBACK, B.J. (1971) 13
The separation of α_2 M into five components with differing electrophoretic and enzyme-binding properties.
J. Clin. Invest., 50, 2376-2383.
- 174 SCHLESINGER, P.H., DOEBBER, T.W., MANDELL, B.F., WHITE, R. 21
DESCHRYVER, C., RODMAN, J.S., MILLER, M.J. and STAHL, P. (1978)
Plasma clearance of glycoproteins with terminal mannose and N-acetylglucosamine by liver non-parenchymal cells.
Biochem. J., 176, 103-109.
- 175 SCHMIDT, W. and HAVEMANN, K. (1974) 85
Isolation of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases from human granulocytes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355, 1077-1082.
- 176 SCHRAMM, H.J. and SCHRAMM, W. (1982) 20
Computer averaging of single molecules of α_2 -macroglobulin and the α_2 -macroglobulin/trypsin complex.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 363, 803-812.
- 177 SCHULTZE, H.E.I., GÖLLNER, K., HEIDE, K., SCHÖNENBERGER, M. and SCHWICK, G. (1955) 11
Zur Kenntnis der α -Globuline der menschlichen Normalserums.
Z. Naturforsch., 10b, 463.

- 178 SCHULTZE, H.E.K., HEIDE, K. and HAUPT, H. (1962) 11
 α_1 -antitrypsin aus Humanserum.
K. Wochenschrift, 40, 427.
- 179 SCHULTZE, H.E., HEIDE, K. and HAUPT, H. (1962) 11, 47,
 Über ein noch nicht beschriebenes α_1 -Glycoprotein des mensch-
 lichen Serums.
Naturwissenschaften, 49, 133.
- 180 SCHULTZE, H.E., HEIMBURGER, N., HEIDE, K., HAUPT, H., STÖRIKO, K., 11
 and SCHWICK, H.G. (1963)
 Preparation and characterization of α_1 -trypsin inhibitor and
 α_2 -plasmin inhibitor of human serum.
 in Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisbon (Karger, S., ed)
 pp. 1315-1320. Basel : Karger 1964.
- 181 SCHWARTZ, W.E., SMITH, P.K. and ROYER, G.P. T 15
 N-(β -Iodoethyl) trifluoroacetamide : a new reagent for the
 aminoethylation of thiol groups in proteins.
Anal. Biochem., 106, 43-48.
- 182 SCHWICK, H.G., HEIMBURGER, N. and HAUPT, H. (1966) 11
 Antiproteinasen des Humanserums.
Z. Ges. Exp. Med., 21, 1.
- 183 SHTACHER, G., MAAYAN, R. and FEINSTEIN, G. (1973) 21
 Proteinase inhibitors in human synovial fluid.
Biochim. Biophys. Acta, 303, 138-147.
- 184 SIDDIQUI, A.A., HUGHES, A.E., DAVIES, R.J.H. and HILL, J.A. (1980) 57, 58,
 The isolation and identification of α_1 -antichymotrypsin as a 164
 DNA-binding protein from human serum.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, 1737-1742.
- 185 SOTTRUP-JENSEN, L., STEPANIK, T.M., JONES, C.M., PETERSEN, T.E. 14
 and MAGNUSSON, S. (1979)
 Studies on the primary structure of human α_2 -macroglobulin.
 in The physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis
 (Collen, D., Wiman, B., and Verstraete, M., eds)
 pp. 255-271, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- 186 SOTTRUP-JENSEN, L., PETERSEN, T.E. and MAGNUSSON, S. (1980) 17, 18,
 A thiol-ester in α_2 -macroglobulin cleaved during proteinase 69
 complex formation.
FEBS Lett., 121, 275-279.
- 187 SOTTRUP-JENSEN, L., HANSEN, H.F., MORTENSEN, S.B., PETERSEN, T.E. 17
 and MAGNUSSON, S. (1981)
 Sequence location of the reactive thiol ester in human α_2 -
 macroglobulin.
FEBS Lett., 123, 145-148.
- 188 SOTTRUP-JENSEN, L., LØNBLAD, P.B., STEPANIK, T.M., PETERSEN, T.E. 14
 MAGNUSSON, S. and JÖRNVALL, H. (1981)
 Primary structure of the "bait" region for proteinases in
 α_2 -macroglobulin.
FEBS Lett., 127, 167-173.

- 189 SOTTRUP-JENSEN, L., PETERSEN, T.E. and MAGNUSSON, S. (1981) 20
Trypsin-induced activation of the thiol esters in α_2 -macroglobulin generates a short-lived intermediate ("Nascent" α_2 M) that can react rapidly to incorporate not only methylamine or putrescine but also proteins lacking proteinase activity.
FEBS Lett., 128, 123-126.
- 190 SOTTRUP-JENSEN, L., PETERSEN, T.E. and MAGNUSSON, S. (1981) 19
Mechanism of proteinase complex formation with α_2 -macroglobulin.
FEBS Lett., 128, 127-132.
- 191 STAHL, P.D., RODMAN, J.S., MILLER, M.J. and SCHLESINGER, P.H. (1978) 21
Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75, 1399-1403.
- 192 STARKEY, P.M. and BARRETT, A.J. (1976) 85, 88, 96
Neutral proteinases of human spleen. Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G.
Biochem. J., 155, 255-263.
- 193 STARKEY, P.M., BARRETT, A.J. and BURLEIGH, M.L. (1977) 88
The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases.
Biochem. Biophys. Acta, 483, 386-397.
- 194 STARKEY, P.M. and BARRETT, A.J. (1977) 13, 110
 α_2 -macroglobulin : a physiological regulator of proteinase activity.
in Proteinases in mammalian cells and tissues
(Barrett, A.J., ed) pp. 663-696, North-Holland, Publishing Co., Amsterdam.
- 195 STARKEY, P.M. (1979) 21
 α_2 -macroglobulin : a review.
in The physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis (Collen, D., Wiman, B. and Verstraete, M., eds) pp. 221-239. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press.
- 196 STEINBUCH, M. (1961) 11
Isolation of an α_2 -globulin from human plasma.
Nature, 192, 1196.
- 197 STROUD, R.M., KRIEGER, M., KOEPPE, R.E., KOSSIAKOFF, A.A. and CHAMBERS, J.L. (1975) 7, 8
Structure-function relationships in the serine proteases.
in Proteases and biological control (Reich, E., Rifkin, D.B., and Shaw, E., eds) pp. 13-32, Cold Spring Harbor.
- 198 SVENDSEN, P.J. and ROSE, C. (1970) T 12
Separation of proteins using Ampholine carrier ampholytes as buffer and spacer ions in an isotachopheresis system.
Science Tools, 17, 13-17.

- 199 SWENSON, R.P. and HOWARD, J.B. (1979) 17
 Characterization of alkylamine-sensitive site in α_2 -macroglobulin.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 76, 4313-4316.
- 200 TACK, B.F., HARRISON, R.A., JANATOVA, J., THOMAS, M.L. and PRAHL, J.W. (1980) 17, 18
 Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 5764-5768.
- 201 TRAVIS, J., BAUGH, R., GILES, P.J., JOHNSON, D., BOWEN, J. and REILLY, C.F. (1977) 28, 30, 88, 96
 Human leukocyte elastase and cathepsin G : isolation, characterization and interaction with plasma proteinase inhibitors. in Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes (Havemann, K. and Janoff, A., eds) pp. 118-128, Urban and Schwarzenberg, Inc. Baltimore-Munich.
- 202 TRAVIS, J., GARNER, D. and BOWEN, J. (1978) 51, 57, 58, 59, 67, 69, 74, 95, 154, 155, 160
 Human α_1 -antichymotrypsin : purification and properties. Biochemistry, 17, 5647-5651.
- 203 TRAVIS, J., BOWEN, J. and BAUGH, R. (1978) 120, 154, 155
 Human α_1 -antichymotrypsin : interaction with chymotrypsin-like proteinases. Biochemistry, 17, 5651-5656.
- 204 TRAVIS, J. and MORII, M. (1980) 57
 Human α_1 -antichymotrypsin. in Methods in Enzymology, Vol. 80, (Lorand, L. ed) pp 765-771, Academic Press.
- 205 TWUMASI, D.Y. and LIENER, I.E. (1977) 89
 Proteases from purulent sputum. Purification and properties of the elastase and chymotrypsin-like enzymes. J. Biol. Chem., 252, 1917-1926.
- 206 URIEL, J. and BERGES, J. (1968) 90, 108, T 13
 Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. Nature, 218, 578-580.
- 207 VAN LEUVEN, F., CASSIMAN, J.J. and VAN DEN BERGHE (1979) 21, 22
 Demonstration of an α_2 -macroglobulin receptor in human fibroblasts, absent in tumor-derived cell lines. J. Biol. Chem., 254, 5155-5160.
- 208 VAN LEUVEN, F. (1982) 17, 19
 Human α_2 -macroglobulin : structure and function. Trends-Biochem-Sci, 7, 185-187.
- 209 VAN LEUVEN, F. CASSIMAN, J.J. and VAN DER BERGUE, H. (1982) 19
 Functional modifications of α_2 -macroglobulin by primary amines. Biochem.J., 201, 119-128.

- 210 VAUGHAN, L., LORIER, M.A. and CARRELL, R.W. (1982) 23
 α_1 -antitrypsin microheterogeneity. Isolation and physiological
 significance of isoforms.
Biochim. Biophys. Acta, 701, 339-345.
- 211 WALGREN, P., NORDLING, K. and BJÖRK, I. (1981) 38, 139
 Immunological evidence for a proteolytic cleavage at the active
 site of antithrombin in the mechanism of inhibition of coagula-
 tion serine proteases.
Eur. J. Biochem., 116, 493-496.
- 212 WALSH, K.A. and WILCOX, P.E. (1970) 7, 96
 Serine proteases.
 in Methods in Enzymology, Vol. 19 (Perlmann, G.E. and Lorand,
 L., eds) pp. 31-41, Academic Press.
- 213 WANG, D., WU, K. and FEINMANN, R.D. (1981) 20, 22
 The reaction of α_2 -macroglobulin-bound trypsin with soybean
 trypsin inhibitor.
J. Biol. Chem., 256, 10934-10940.
- 214 WEEKE, B. (1973) 93
 Crossed immunoelectrophoresis.
Scand. J. Immunol., 2, suppl. 1, 47-56.
- 215 WIDE, L. (1969) T 2
 Radioimmunoassays employing immunoadsorbents.
 in 1st Karolinska Symposium on research methods in reproductive
 endocrinology ; pp. 207.
- 216 WILCOX, P.E. (1970) 85, 96
 Chymotrypsinogens, chymotrypsins.
 in Methods in Enzymology, Vol. 19 (Perlmann, G.E. and Lorand, L.,
 eds) pp. 64-108, Academic Press.
- 217 WIMAN, B. and COLLEN, D. (1978) 42, 43
 On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and
 plasmin.
Eur. J. Biochem., 84, 573-578.
- 218 WIMAN, B. and COLLEN, D. (1979) 42
 On the mechanism of the reaction between plasmin and α_2 -anti-
 plasmin. Kinetics and structural changes
 in The physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis
 (Collen, D., Wiman, B. and Verstraete, M., eds) pp. 145-156,
 Elsevier/North-Holland, Biomedical Press.
- 219 WIMAN, B. and COLLEN, D. (1979) 43
 On the mechanism of the reactions between α_2 -antiplasmin and
 plasmin.
J. Biol. Chem., 254, 9291-9297.
- 220 WONG, R.F., CHANG, T.L. and FEINMAN, R.D. (1982) 39, 40,
 Reaction of antithrombin with proteases. Nature of the reactions 123, 161
 with trypsin.
Biochemistry, 21, 6-12.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE SUR LES SERINE-PROTEASES ET LEURS INHIBITEURS DU PLASMA HUMAIN	4
I - 1 LES SERINE-PROTEASES	7
I - 2 LES INHIBITEURS DE SERINE-PROTEASES DU PLASMA HUMAIN	10
I - 3 PROPRIETES ET MODE D'ACTION DES PRINCIPAUX INHIBITEURS DU PLASMA HUMAIN : ETAT DES CONNAISSANCES	12
I-3.1 α_2 -macroglobuline (α_2M)	12
I-3.1.1 Structure de l' α_2M	14
I-3.1.2 Formation des complexes	17
I-3.1.3 Aspect physiologique	20
I-3.2 α_1 -antiprotéase (α_1PI)	22
I-3.2.1 Propriétés physico-chimiques	23
I-3.2.2 Interactions avec les endopeptidases	24
I-3.2.3 Fonction	31
I-3.2.4 Variations et affections	31
I-3.3 Antithrombine III (AT)	32
I-3.3.1 Propriétés physico-chimiques	33
I-3.3.2 Interactions avec les endopeptidases	33
I-3.4 α_2 -antiplasmine (AP)	41
I-3.4.1 Propriétés physico-chimiques	41
I-3.4.2 Interactions avec les sérine-protéases	42
I-3.5 α_1 -antichymotrypsine (α_1Achy)	47
CHAPITRE II : PURIFICATION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L' α_1 -ANTI-CHYMOTRYPSINE	50
II - 1 PURIFICATION DE L' α_1 -ANTICHYMOTRYPSINE	51
II-1.1 Choix des méthodes	51

II-1.2	Protocoles actuels	56
II-1.3	Protocoles de purification de l' α_1 Achy publiés par d'autres auteurs	57
II - 2	PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	58
II-2.1	Masse moléculaire relative	58
II-2.2	Comportement en électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 %) à pH 8,3 et en immunoélectrophorèse bidimensionnelle	63
II-2.3	Détermination du point isoélectrique	63
II-2.4	Composition chimique de l' α_1 -antichymotrypsine	67
II-2.4.1	Composition en acides aminés	67
II-2.4.1.1	Dosage du tryptophane et de la méthionine	67
II-2.4.1.2	Dosage de la cystéine	67
II-2.4.2	Composition en sucres	69
II-2.5	Interactions avec la concanavaline A	70
II-2.6	Détermination de la séquence amino-terminale	73
II-2.7	Stabilité de l'activité inhibitrice de l' α_1 Achy après divers traitements physiques ou chimiques	76
II-2.7.1	Effet de la température	76
II-2.7.2	Effet du dessalage et de la lyophilisation	77
II-2.7.3	Effet de la succinylation	77
II-2.7.4	Effet de l'oxydation performique	77
II-2.7.5	Effet de l'aminoéthylation	79
II-2.7.6	Effet d'un agent dénaturant : le SDS	79
CHAPITRE III : REACTION DE L' α_1 -ANTICHYMotRYPSINE AVEC 4 SERINE-PROTEASES		81
III - 1	CHOIX ET PROPRIETES PRINCIPALES DES PROTEASES UTILISEES AU COURS DE NOTRE ETUDE	84
III-1.1	Choix des protéases	84
III-1.2	Propriétés principales des protéases choisies	85
III-1.2.1	α -Chymotrypsine bovine(E.C.3.4.21.1)	85
III-1.2.2	Cathepsine G leucocytaire humaine (E.C.3.4.21.20)	85
III-1.2.3	Trypsine bovine (E.C. 3.4.21.4)	90
III-1.2.4	Elastase leucocytaire humaine (E.C.3.4.21.37)	90

III - 2	APPROCHE TECHNOLOGIQUE DES PHENOMENES D'INTERACTION. APPORT ET LIMITES DES DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES.	92
III-2.1	Dosage spectrophotométrique de l'activité enzymatique	92
III-2.2	Révélation de l'activité inhibitrice et révélation de l'activité estérasique après séparation électrophorétique	92
III-2.3	Méthodes faisant intervenir la précipitation antigène - anticorps	93
III-2.4	Modifications des propriétés physico-chimiques de l'inhibiteur et des enzymes	94
III - 3	DEFINITION DES CONDITIONS OPERATOIRES CHOISIES POUR LES ETUDES DES INTERACTIONS DE L' α_1 -ANTICHYMotRYPsINE AVEC LES ENZYMES	94
III-3.1	Tampon utilisé	95
III-3.2	Détermination des concentrations des solutions d'inhibiteur et d'enzyme	95
III-3.2.1	Détermination de la concentration de la solution d' α_1 -antichymotrypsine	95
III-3.2.2	Détermination de la concentration de la solution d'enzyme	96
III-3.3	Mélange de contrôle : α_1 -antichymotrypsine - enzyme inactivé.	96
III-3.4	Arrêt de la réaction	97
III-3.5	Température choisie pour l'incubation	97
III-3.6	Dispositions générales	98
III - 4	REACTION AVEC LA CHYMotRYPsINE BOVINE	98
III-4.1	Titration des sites actifs de la chymotrypsine	98
III-4.2	Courbe d'inhibition de la chymotrypsine par l' α_1 -antichymotrypsine	99
III-4.3	Etude de l'inhibition à 0° C de la chymotrypsine par l' α_1 -antichymotrypsine	99
III-4.3.1	Préparation des mélanges	101
III-4.3.2	Dosage de l'activité enzymatique résiduelle	101

III-4.3.3	Etude en électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 30 % d'acrylamide) en présence de SDS	101
III-4.3.4	Electrophorèse à pH alcalin en absence d'agent dénaturant	104
III-4.4	Stabilité dans le temps du complexe α_1 Achy-chymotrypsine	107
III-4.4.1	Stabilité d'un mélange gardé à 0° C	107
III-4.4.1.1	Mesure de l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps d'incubation	107
III-4.4.1.2	Etude en électrophorèse en gel d'agarose à pH 8,6	107
III-4.4.2	Stabilité d'un mélange à 25° C	110
III-4.4.2.1	Mesure de l'activité enzymatique en fonction du temps d'incubation	110
III-4.4.2.2	Préparation des échantillons pour les études électrophorétiques	110
III-4.4.2.3	Etude en électrophorèse en gel de polyacrylamide	112
III-4.4.2.4	Etude en immunoélectrophorèse bidimensionnelle	116
III-4.4.3	Essai de synthèse des résultats concernant l'évolution en fonction du temps d'un complexe α_1 Achy-chymotrypsine préparé en présence d'un excès d'inhibiteur	121
III-4.5	Résultats publiés par d'autres auteurs.	121
III-4.6	Considérations sur le caractère temporaire de l'inhibition par certains inhibiteurs sériques	123
III-4.7	Etude de la stabilité du complexe α_1 Achy-chymotrypsine en présence de PMSF	124
III - 5	REACTION AVEC LA CATHEPSINE G	126
III-5.1	Résumé des résultats présentés dans les publications n°2 et 3	126
III-5.2	Questions posées par ces résultats et par l'utilisation d'une nouvelle préparation de cathepsine G	127

III-5.3	Stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G dans un mélange préparé en présence d'inhibiteur en excès	130
III-5.3.1	Dosage de l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps d'incubation	130
III-5.3.2	Préparation des échantillons pour les études électrophorétiques	131
III-5.3.3	Etude en SDS-PAGE	131
III-5.3.4	Etude électrophorétique en gel de polyacrylamide en absence d'agent dénaturant (à pH 8,3)	133
III-5.3.5	Etude en électrophorèse en gel d'agarose à pH 8,6	136
III-5.3.6	Analyse immunologique	136
III-5.3.7	Etude en isoélectrofocalisation	141
III-5.4	Stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G lorsqu'une activité enzymatique résiduelle existe dans le mélange au début de la réaction	143
III-5.4.1	Etude en SDS-PAGE	145
III-5.4.2	Etude électrophorétique en gel de polyacrylamide en absence d'agent dénaturant	147
III-5.5	Etude de la stabilité du complexe α_1 Achy-cathepsine G en présence de PMSF	147
III-5.6	Essai de synthèse des résultats obtenus dans l'étude de la réaction de l' α_1 Achy avec la cathepsine G	151
III-5.7	Résultats publiés par d'autres auteurs	154
III - 6	REACTION AVEC LA TRYPSINE BOVINE ET L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE HUMAINE	155
III-6.1	Réaction avec la trypsine bovine	155
III-6.2	Réaction avec l'élastase leucocytaire humaine	157
III-6.3	Synthèse et comparaison avec la réaction entre d'autres inhibiteurs et des enzymes qu'ils n'inhibent pas	159
III - 7	DISCUSSION. HYPOTHESE D'UN MECANISME D'ACTION DE L' α_1 -ANTI-CHYMOTRYPSINE	160

CONCLUSIONS		166
PERSPECTIVES		169
PARTIE TECHNIQUE		T 1
T - 1	CHROMATOGRAPHIE D'IMMUNOAFFINITE	T 2
T-1.1	Préparation des immunoglobulines G d'un immunosérum	T 2
T-1.2	Préparation du gel de Sepharose 4 B activé par le bromure de cyanogène et couplage de protéines sur ce gel activé	T 2
T-1.2.1	Activation du gel de Sepharose 4 B	T 3
T-1.2.2	Couplage des protéines sur le gel activé	T 3
T-1.2.3	Saturation des sites activés restés éventuellement libres	T 3
T-1.3	Chromatographie d'immunoaffinité	T 3
T - 2	ELECTROPHORESES ANALYTIQUES	T 4
T-2.1	Electrophorèse en plaque de gel de polyacrylamide	T 5
T-2.1.1	Equipement, solutions stock, détails techniques communs	T 5
T-2.1.2	Fixation et coloration des protéines	T 6
T-2.1.3	Electrophorèse en gel de polyacrylamide (10 % en acrylamide) à pH 8,3 sans agent dénaturant	T 6
T-2.1.4	Electrophorèse en gradient d'acrylamide (5 à 30 %) en présence de SDS	T 8
T-2.2	Electrophorèse en plaque d'agarose	T 10
T - 3	ISOELECTROFOCALISATION EN PLAQUE D'ISOGEL	T 10
T-3.1	Préparation de la plaque	T 11
T-3.2	Conditions d'électrophorèse	T 11
T-3.3	Détermination du gradient de pH	T 11
T-3.4	Fixation et coloration	T 11
T - 4	TECHNIQUES D'ELECTRO-IMMUNODIFFUSION	T 12

T - 5	METHODES PERMETTANT LA REVELATION D'UNE ACTIVITE ESTERASI- SIQUE OU D'UNE ACTIVITE INHIBITRICE ENVERS DES ENZYMES POSSEDANT UNE ACTIVITE ESTERASIQUE	T 13
T - 6	REDUCTION ET ALKYLATION DES GROUPEMENTS SULFHYDRYLE	T 15
T - 7	DOSAGE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE DE LA CHYMOTRYPSINE, DE LA CATHEPSINE G ET DE L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE PAR METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE	T 16
T-7.1	Dosage de l'activité de la chymotrypsine et de la cathep- sine G	T 16
T-7.2	Dosage de l'activité de l'élastase leucocytaire	T 17

BIBLIOGRAPHIE

