

50376
1992,
133

-1-

N° d'ordre : 890

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE

DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par

ISABELLE CREVEL-THIEFFRY

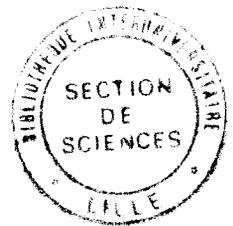
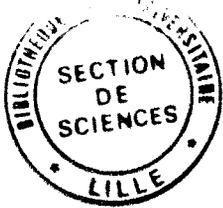
**TITRE : ETUDE SUR L'INHIBITEUR DE LA
RIBONUCLEASE**

- SON ROLE EVENTUEL DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

- ETUDE D'UN PEPTIDE TRYPSIQUE MONTRANT UNE

ACTIVITE INHIBITRICE VIS-A-VIS DE LA RIBONUCLEASE A

Presentée le 25 mars 1992 devant la commission d'examen



JURY

Président : Professeur J. MONTREUIL
Rapporteurs : Professeur G. SPIK
: Docteur N. BAUMANN
: Docteur P. SAUTIERE
Examineurs : Docteur E. SCHULLER
: Docteur S. COTTERILL
: Docteur J.C. LEVY

AVANT PROPOS

A l'issue de ce travail je tiens à remercier tous ceux sans qui celui-ci n'aurait pu être effectué.

M. J. MONTREUIL qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

Mme N. BAUMANN qui m'a accueillie dans son laboratoire et a accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur.

M. P. SAUTIERE qui m'a accueillie dans son laboratoire, et dont les conseils ont été précieux.

Melle G. SPIK qui a accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur.

M E. SCHULLER qui a dirigé ce travail.

Mme S. COTTERILL qui m'a accueillie dans son laboratoire et a permis par ses conseils l'étude du peptide inhibiteur de la ribonucléase A.

Les laboratoires DELALANDE qui ont financé ce projet, et plus particulièrement, M. J.C. LEVY qui a accepté de participer à ce jury en tant qu'examineur.

M J.J. HAUW qui a fourni les pièces anatomiques, nécessaires au dosage de l'activité ribonucléasique dans le cerveau de patients décédés de la maladie d'Alzheimer.

Je tiens également remercier ceux qui par leur aide ont participé à ce travail.

M. JOSIEN et A. GERVAIS.

Ce travail a fait l'objet d'une communication par affiche et d'un article

Communication par affiche :

Molecular analysis of human placental ribonuclease inhibitor. CREVEL-THIEFFRY, I., SCHULLER, E. AND COTTERILL, S.

International meeting on structure, mechanism and fonction of ribonucleases. Sant Feliu de Guíxols, Espagne septembre 1990.

Article :

Characterisation of a tryptic peptide from human placental ribonuclease inhibitor which inhibits ribonuclease activity. I. CREVEL-THIEFFRY, S. COTTERILL and E. SCHULLER.
Soumis à Biochimica Biophysica Acta (sous presse).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....12

CHAPITRE I

GENERALITES.....14

A- QUELQUES DONNEES SUR LA MALADIE D'ALZHEIMER.....15

- 1) Bref historique de l'étude de la maladie.....15
- 2) Critères diagnostiques.....16
- 3) Lésions neuropathologiques.....17
 - a) L'atrophie cérébrale.....17
 - b) Les dégénérescences neurofibrillaires...18
 - c) Les plaques séniles.....18

B)-IMPLICATION DE L'INHIBITEUR DE LA RIBONUCLEASE DANS
LA MALADIE D'ALZHEIMER.....21

- 1) Hypothèse de départ.....21
- 2) Le matériel disponible.....23

C)-L'INHIBITEUR DE LA RIBONUCLEASE.....25

- 1) Purification et caractérisation de cette
protéine.....25
- 2) Etude des inhibiteurs de la ribonucléase chez
d'autres mammifères.....31
- 3) Rôle de cet inhibiteur de la ribonucléase....34

4) Etude de l'interaction de cette protéine avec la ribonucléase.....	37
a) Les équipes travaillant sur cet inhibiteur placentaire de la ribonucléase.....	37
b) Les travaux du groupe de Blackburn : modifications chimiques de la ribonucléase.....	38
c) Les travaux du groupe de Vallee : modifications de l'inhibiteur par mutagenèse dirigée.....	44
d) Modifications d'un autre inhibiteur de la ribonucléase.....	48
e) Etude de la ribonucléase placentaire....	49

CHAPITRE II

ETUDE PERSONNELLE SUR L'INHIBITEUR DE LA RIBONUCLEASE, ET SON ROLE POSSIBLE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	50
A-MATERIEL ET METHODES.....	51
1) Dosage de l'activité ribonucléasique avant et après addition du PCMB.....	51
2) Méthodes statistiques.....	53
3) Préparation des coupes histologiques.....	55
4) Obtention et utilisation de l'anticorps anti-PRI.....	56
a) Immunisation des lapins.....	56
b) Chromatographie d'affinité.....	57
c) Immunomarquage.....	58

B RESULTATS.....	59
1) Dosage de l'inhibiteur de la ribonucléase dans des cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer	59
2) Essai de localisation de l'inhibiteur de la ribonucléase cérébrale dans des coupes de cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer.....	65
C DISCUSSION.....	68
D CONCLUSION.....	74

CHAPITRE III

L'INHIBITEUR PLACENTAIRE HUMAIN DE LA RIBONUCLEASE. ETUDE D'UNE REGION DE CETTE PROTEINE POSSEDANT UNE ACTIVITE INHIBITRICE.....	75
A MATERIELS ET METHODES.....	76
1) Purification de la protéine.....	76
a) Obtention des placentas.....	76
b) Etape 1 préparation de l'homogénat.....	76
c) Etape 2 et 3 : fractionnement au sulfate d'ammonium.....	77
d) Etape 4 : chromatographie d'affinité....	77
e) Analyse électrophorétique.....	78
f) composition en acides aminés.....	78
2) Coupures de la protéine (inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase (PRI)).....	79
a) Coupures enzymatiques.....	79
i) coupure par l'endoprotéase Lys-C...79	
ii) Coupure par la chymotrypsine.....	79

iii) Coupure par la trypsine.....	79
b) Coupure chimique.....	80
i) Coupure de la protéine à l'acide acétique.....	80
c) Purification des hydrolysats par chromatographie liquide haute pression en phase inverse...	80
d) Contrôle de l'activité inhibitrice des fractions obtenues.....	80
i) Dosage avec le poly-C.....	80
3) Utilisation d'une banque d'ADN complémentaire aux ARN de placentas humains.....	81
a) Méthode d'amplification de portion de gènes, ou PCR "Polymerase chain reaction".....	81
i) Purification de l'ADN à partir de la banque d'ADN complémentaire.....	81
ii) Sondes nucléotidiques.....	81
iii) Programme durée/ température, et tampons d'incubation.....	82
iv) Enzyme.....	84
b) Détection des fragments obtenus.....	84
i) Gel d'agarose.....	84
ii) "Southern blot".....	85
iii) Clonage dans " Bluescript".....	86
iv) Séquençage de l'ADN.....	88
c) Expression dans "pGEX".....	88
i) sous clonage.....	88

ii) Expression de la protéine.....	89
4) Etude du peptide actif.....	91
a) Synthèse et purification du peptide.....	91
b) Dosage enzymatique.....	91
i) Dosage avec le Cytidilyl (3'-5')	
guanosine (CpG).....	91
B RESULTATS.....	93
1) Purification de l'inhibiteur placentaire de la	
ribonucléase.....	93
a) Chromatographie d'affinité.....	93
b) Caractérisation de l'inhibiteur.....	96
2) Fragmentation de l'inhibiteur placentaire de la	
ribonucléase; analyse enzymatique des fragments obtenus	
après purification par CLHP.....	96
a) Coupure par l'acide acétique.....	96
b) Digestion limitée par la chymotrypsine à	
pH 5.....	100
c) Digestion par l'endoprotéinase Lys-C...100	
d) Digestion par la trypsine.....	101
3) Etude cinétique d'un peptide isolé par coupure	
trypsique qui présente une activité inhibitrice vis-à-vis de	
la ribonucléase.....	108
a) Etude du type d'inhibition.....	108
b) Réversibilité de l'interaction peptide/	
ribonucléase.....	110
c) Influence du temps de préincubation....112	
d) Influence du pH.....	113
e) Effet de certains ions divalents.....	115

f) Influence de la force ionique.....	120
4) Obtention, en plusieurs fragments, du gène de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase.....	121
a) Réaction polymérisique en chaîne (Pcr).	121
b) Clonage d'un fragment de 500 paires de bases.....	127
c) Sous clonage et tentative d'expression de ce fragment.....	127
C DISCUSSION.....	128
D CONCLUSION.....	148
PERSPECTIVES.....	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	153

ABREVIATIONS et TAMPONS

- ADN : acide désoxyribonucléique
ADN_c : acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP : adénosine monophosphate
ARN : acide ribonucléique
CpG : Cytidilyl (3'-5') guanosine
CLHP : chromatographie liquide haute pression
DTT : Dithiothreitol .
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
IPTG : Isopropyl βDThiogalactoside
Kb : Kilobases.
pb : paires de bases
Pcr : réaction polymérasique en chaîne
PCMB : parachloromercuribenzoate de sodium
PRI : Human Placental Ribonuclease Inhibitor =
inhibiteur placentaire de ribonucléase A,
abréviation proposée par Vallee et coll (91)
Poly-C: acide polycytidilique
SDS : dodécylsulfate de sodium
TFA : acide trifluoroacétique
TPCK : tosyl phenylalanyl chlorométhane
TRIS : hydroxyméthyl- aminométhane
- TAMPONS**
- SSC : 0,15 M NaCl, 0,015 M Citrate de sodium (pH 7)
TBE : 90 mM TRIS, 90mM acide borique, 2mM EDTA (pH 8)
PBS : KCl 2,5 mM, NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ et KH₂PO₄ 1,8 mM
(pH 7,4)

TABLE DES MATIERES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I.....	33
Tableau II.....	40
Tableau III.....	54
Tableau IV.....	60
Tableau V.....	61
Tableau VI.....	104
Tableau VII.....	105
Figure 1.....	24
Figure 2.....	30
Figure 3.....	43
Figure 4.....	46
Figure 5.....	63
Figure 6.....	64
Figure 7.....	66
Figure 8.....	83
Figure 9.....	90
Figure 10.....	94
Figure 11.....	95
Figure 12.....	97
Figure 13.....	98
Figure 14.....	102
Figure 15.....	103
Figure 16.....	107
Figure 17.....	109
Figure 18.....	111
Figure 19.....	114
Figure 20.....	117
Figure 21.....	119
Figure 22.....	122
Figure 23.....	125
Figure 24.....	126
Figure 25.....	130
Figure 26.....	135
Figure 27.....	136
Figure 28.....	138

INTRODUCTION

Dans tout organisme, le métabolisme de chaque cellule est lié à la synthèse de protéines, à partir des ARNm. Ce métabolisme est régulé par les ribonucléases qui détruisent ces ARNm après leur utilisation. Ces ribonucléases sont elles mêmes contrôlées par un inhibiteur cytoplasmique protéique.

Dans certaines maladies dites "dégénératives", comme la maladie d'Alzheimer, on observe un dérèglement du contrôle cellulaire cérébral. Une hypothèse a été formulée selon laquelle, au cours de cette maladie, l'activité de la ribonucléase cérébrale n'est plus modulée par l'inhibiteur qui lui est normalement associé.

Le but de cette recherche est l'étude de l'inhibiteur de la ribonucléase. Cette approche a été réalisée en deux temps successifs :

- étude de l'activité de l'inhibiteur de la ribonucléase alcaline, dans les cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer.

- purification et caractérisation d'un peptide tryptique isolé à partir de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase.

Dans une première partie nous résumerons l'état de la question en ce qui concerne les relations mises en évidence entre la maladie d'Alzheimer et le contrôle de la dégradation des ARNm.

Nous rappellerons aussi les recherches effectuées sur l'inhibiteur de la ribonucléase, et plus particulièrement l'inhibiteur placentaire humain.

Dans une seconde partie, nous présenterons les données obtenues après dosage de l'activité ribonucléasique dans le cerveau de patients décédés de la maladie d'Alzheimer.

Enfin la troisième partie sera consacrée à l'étude des caractéristiques cinétiques, d'un peptide inhibiteur de la ribonucléase A, obtenu à partir d'une coupure trypsique de l'inhibiteur placentaire humain purifié. Nous présenterons également le clonage d'un fragment du gène de l'inhibiteur placentaire humain de ribonucléase, à partir d'une banque d'ADNc, dans un système qui permettra son expression sous forme d'une protéine de fusion.

CHAPITRE I :

GENERALITES

A QUELQUES DONNEES SUR LA MALADIE D'ALZHEIMER.

1) Bref historique de l'étude de la maladie.

La démence sénile a déjà été décrite au siècle dernier par Jean-Etienne Esquirol et Karl Wernicke, mais c'est en 1906 qu'Aloïs Alzheimer a observé des altérations anatomiques sur le cerveau d'une patiente de 51 ans atteinte de démence. Cette démence avait donc bien une expression neuropathologique. La maladie d'Alzheimer, puisqu'elle fût appelée ainsi, ne suscitait pas un grand enthousiasme chez les scientifiques, sa fréquence au début du siècle étant assez faible. Mais avec l'augmentation de l'espérance de vie, les pays industrialisés ont vu la démence sénile de type Alzheimer devenir une des plus grandes causes de morbidité, d'invalidité, et de décès.

Alzheimer avait décrit la présence de dégénérescences neurofibrillaires, et de plaques séniles. Il a fallu attendre jusqu'en 1963 pour que les dégénérescences neurofibrillaires soient révélées en microscopie électronique par Kidd (1) et Terry (2), alors que l'étude de la plaque sénile n'a été entamée par Glenner et Wong qu'en 1984 (3). Depuis, la maladie d'Alzheimer a fait l'objet d'un très grand nombre de publications, dont la plupart concerne l'étude de ces marqueurs, la question principale étant de savoir si ces plaques séniles et ces dégénérescences neurofibrillaires sont la cause de la maladie ou sa conséquence.

Des modifications anatomo-pathologiques identiques, bien que d'intensités différentes, ont conduit Katzman (4) à regrouper les formes préséniles et séniles survenant après 65 ans sous le nom de SDAT (Senile Dementia of Alzheimer Type) traduite en français par DSTA. Ici lorsque l'on citera la maladie d'Alzheimer, c'est la Démence Sénile de Type Alzheimer dont il sera question.

2) Critères diagnostiques

On voit apparaître au cours de la maladie une lente détérioration mentale du patient qui évolue inexorablement vers une détérioration globale.

Le DSM III (5), classification américaine des maladies mentales, propose un diagnostic pour la "démence dégénérative primaire" :

- * Retentissement sur le statut social et les activités professionnelles de l'altération intellectuelle.
- * Trouble de la mémoire des faits récents.
- * Altération au moins d'une des quatre fonctions suivantes :

1^e **Pensée abstraite** (interprétation concrète de proverbes, identification des similitudes et des différences apparentes entre les mots, définition des mots et des concepts).

2^e **Jugement**

3^e **Autres fonctions supérieures** telles que :

-*aphasie* (trouble du langage lié à un dysfonctionnement cérébral),

-*apraxie* (incapacité à réaliser une activité motrice malgré une compréhension et des fonctions motrices intactes),

-*agnosie* (impossibilité de reconnaître ou d'identifier des objets malgré des fonctions sensorielles intactes),

-*troubles des "fonctions constructives"* (praxies) : par exemple une incapacité à recopier une figure à trois dimensions.

4^e **Personnalité**

* Absence de trouble de la vigilance (pas de confusion).

* Mise en évidence ou grande probabilité d'un *facteur organique*.

Le degré de démence des malades peut être évalué à l'aide d'un mini test mental qui permet d'obtenir le score de Blessed (6)

3) **Lésions neuropathologiques**

a) L'atrophie cérébrale

De manière constante, l'examen macroscopique de cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer fait apparaître une atrophie cérébrale importante, bien que des variations individuelles ainsi que des différences selon l'âge de début de la démence (forme présénile et forme sénile) aient été notées. Cette atrophie qui affecte essentiellement les régions frontales et temporales du cortex se manifeste par

un élargissement des sillons corticaux et une dilatation des ventricules (7). On observe ainsi une perte de poids du cerveau, dont l'origine est la perte de neurones du cortex (néocortex et hippocampe surtout) et des noyaux sous corticaux (noyau de Meynert essentiellement). La baisse de l'activité cholinergique qui avait été mise en évidence par Bowen et collaborateurs en 1976 (8), semblerait secondaire à cette atteinte neuronale (9).

b) Les dégénérescences neurofibrillaires

Elles affectent les neurones pyramidaux de l'hippocampe et du néocortex, et apparaissent en microscopie optique sous l'aspect de paquets fibrillaires cytoplasmiques argentophiles. En microscopie électronique ces fibrilles sont constituées par l'assemblage de paires de filaments d'un diamètre de 10 nm, enroulés de manière hélicoïdale selon un pas de 80 nm. Ces paires hélicoïdales de filaments sont également observées dans des prolongements neuronaux dispersés dans le tissu cérébral ou concentrés à la périphérie des plaques séniles et autour de vaisseaux pathologiques (angiopathie amyloïde).

c) Les plaques séniles

Ce sont des formations arrondies extraneuronales argentophiles d'un diamètre maximum de 20 à 200 μ m. Elles possèdent un noyau central amorphe constitué de substance amyloïde et d'une couronne de prolongements dendritiques en voie de dégénérescence entourés par une réaction gliale

astrocytaire. Ces plaques séniles sont très nombreuses dans les couches 2 et 3 du cortex (10), notamment dans les lobes frontaux et les cornes d'Ammon.

Il faut noter toutefois que ces plaques séniles font partie d'un ensemble de marqueurs de la maladie d'Alzheimer. En effet, des plaques séniles apparaissent très souvent lors du vieillissement normal, sans pour autant être le signe d'une démence (11).

A partir du moment où ces marqueurs ont été caractérisés, de nombreuses recherches ont été engagées, dans le but de trouver une cause au développement de ces marqueurs dans les cerveaux "Alzheimer".

Les plaques séniles que l'on trouve également chez le sujet âgé non dément, et lors du syndrome de Down, ont suscité un grand intérêt (11,12). Le syndrome de Down étant considéré comme un vieillissement accéléré, dû à une surexpression de gènes codés par le chromosome 21, l'hypothèse d'une origine génétique de la maladie d'Alzheimer a été avancée. Cette hypothèse semblait se confirmer lorsque le gène codant pour la protéine amyloïde β , élément constitutif de la plaque sénile a été localisé par plusieurs équipes sur le chromosome 21.(13-16). Mais les résultats publiés en 1987 (17-19) allaient contre l'hypothèse qu'une malformation génétique lors de la maladie d'Alzheimer impliquait une duplication d'un segment du chromosome 21 contenant le gène de la protéine amyloïde β .

En 1988 Schellenberg et coll. confirmaient ce résultat pour une forme familiale de maladie d'Alzheimer (20). En 1990 St Georges Hyslop et coll. précisait que la maladie d'Alzheimer n'était pas une seule maladie, mais résultait de modifications à la fois sur le chromosome 21 et sur d'autres facteurs génétiques et non génétiques (21). Plus récemment, des chercheurs qui avaient travaillé en collaboration avec St Georges Hyslop ont pu montrer que pour un cas particulier de maladie d'Alzheimer, une déficience génétique pouvait être impliquée (22).

Il apparaît donc que le débat sur la cause de la maladie d'Alzheimer est encore très ouvert, et des résultats contradictoires montrent que le mécanisme d'installation de cette maladie est loin d'être compris.

Parmi les nombreuses hypothèses qui ont été avancées pour expliquer cette maladie d'Alzheimer, l'une d'elles a été la base de ce travail de thèse et sera donc plus particulièrement développée ici.

**B) IMPLICATION DE L'INHIBITEUR DE LA RIBONUCLEASE
DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER.**

1) Hypothèse de départ.

En 1981, Man et coll. avaient mis en évidence des modifications apparaissant dans la synthèse protéique lors de la maladie d'Alzheimer (23). Ensuite, en 1983, Sajdel-Sulkowska et Marotta s'intéressaient à la synthèse de protéines in vitro à partir d'ARN messagers extraits de cerveaux "Alzheimer" (24). Ils ont pu remarquer qu'une modification post-transcriptionnelle se produisait dans les cerveaux lors de la maladie d'Alzheimer; en effet les ARN totaux et les ARN polyadénylés semblaient présents en plus faible quantité que dans des cerveaux témoins (25).

En 1985, Bustany (26) a mis en évidence par tomographie à émission de positrons que la synthèse protéique était diminuée dans le cerveau lors de la maladie d'Alzheimer; la baisse de la synthèse protéique peut être liée à la faible quantité d'ARNm présents dans le cerveau, en raison d'une activité accrue de la ribonucléase.

En 1986, Guillemette et coll. (27) ont pu confirmer que les ARN polyadénylés étaient présents en moins grande quantité chez les malades Alzheimer que chez le sujet témoin, mais ils n'ont observé aucune modification des ARN totaux.

Sajdel-Sulkowska et Marotta (25) attribuèrent ces modifications à une augmentation de l'activité de la ribonucléase alcaline due à une déficience du complexe inhibiteur-ribonucléase.

Les données sur ce sujet en étaient à ce stade lorsque les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont commencé.

Ensuite de nombreux articles ont été publiés sur la diminution de certains ARNm dans le cerveau "Alzheimer". Ainsi selon Morrison et coll. (28,29) cette baisse des ARN serait due à une dégradation post-mortem liée aux conditions de décès des malades; le risque de dégradation des ARN étant diminué par oxygénation des malades avant leur décès. Zain et coll. (parmi lesquels Sajdel-Sulkowska et Marotta) ont précisé que les pièces anatomique cérébrales, obtenues après oxygénation des malades, aboutissaient à l'obtention d'un grand nombre de petits ARN (30). Sajdel-Sulkowska et Marotta ont confirmé plusieurs fois leur hypothèse de départ: à savoir que le cerveau des patients décédés de la maladie d'Alzheimer présentait une déficience en l'inhibiteur de la ribonucléase alcaline (31,32,33) Enfin certaines équipes ont apporté des renseignements complémentaires concernant l'activité de cette ribonucléase cérébrale (34,35) comme il sera discuté au chapitre II.

2) Le matériel disponible

La ribonucléase alcaline qui est présente dans le cerveau et dans d'autres tissus de mammifères est active de pH 7.2 à 8 (36,37). La régulation de son activité est effectuée grâce à la présence d'un inhibiteur cytoplasmique. Il est possible de calculer la quantité de la ribonucléase inactivée par l'inhibiteur en utilisant le Parachloromercuribenzoate de sodium (PCMB) qui se lie à l'inhibiteur en libérant la ribonucléase. Ainsi l'activité latente de l'enzyme peut être mesurée (37,38). (Voir fig 1 ainsi que les résultats du chapitre II).

Pour réaliser cette étude il était nécessaire d'avoir un nombre important de cerveaux provenant de patients décédés de la maladie d'Alzheimer de manière à pouvoir faire une étude statistique. Il était également important que cette recherche porte sur des patients ayant subi des bilans neurologiques et psychiatriques avant leur décès.

Ce précieux matériel a pu être obtenu auprès de l'équipe du professeur Jean-Jacques Hauw à l'hôpital de la Salpêtrière.

Ainsi l'étude de l'implication de l'inhibiteur de la ribonucléase dans la maladie d'Alzheimer a pu être envisagée.

Comme il avait été rapporté que le mécanisme inhibiteur de la ribonucléase alcaline semblait déficient lors de la maladie d'Alzheimer, il était intéressant de pouvoir étudier sur le plan biochimique, un inhibiteur de la ribonucléase.

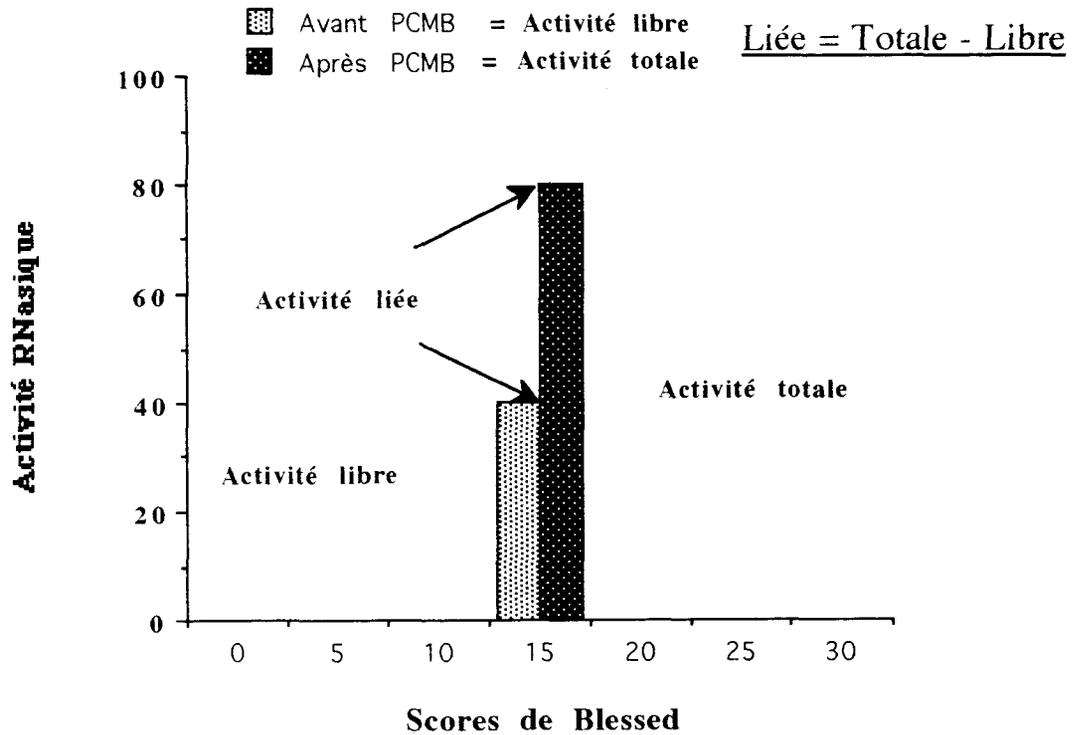


FIGURE 1

Schéma représentant les différentes activités de la ribonucléase alcaline cérébrale qui sont dosées.

Avant l'addition de PCMB, c'est l'activité ribonucléasique **libre** qui est dosée.

Après addition du PCMB, l'activité **totale** est dosée, c'est à dire l'activité **libre** + l'activité **liée** à l'inhibiteur.

En effet si l'hypothèse proposée par Sajdel-Sulkowska et Marotta (25) se confirmait sur les cerveaux utilisés dans notre étude, une meilleure connaissance de l'interaction entre l'inhibiteur de la ribonucléase et la ribonucléase s'avérerait nécessaire.

Par ailleurs, l'obtention d'anticorps dirigés contre l'inhibiteur de la ribonucléase semblait s'imposer pour localiser cet inhibiteur dans des cerveaux sains d'abord, puis dans des cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer. C'est donc dans cette optique que l'étude de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase a été envisagée parallèlement.

C) L'INHIBITEUR DE LA RIBONUCLEASE

1) Purification et caractérisation de cette protéine.

Les tissus autres que le pancréas contiennent de petites quantités de ribonucléase. Cette ribonucléase présente une activité entre pH 7,4 et 8,0. Elle est appelée selon les auteurs, ribonucléase neutre ou alcaline. Normalement 95% de cette ribonucléase sont sous forme latente : l'enzyme est liée à un inhibiteur avec lequel elle forme un complexe stabilisé par un excès de l'inhibiteur libre par rapport au complexe inhibiteur/enzyme (39) (le rapport molaire inhibiteur/complexe $[I/E] = 6 \text{ à } 8$).

L'inhibiteur de la ribonucléase est une protéine cytoplasmique qui a été mise en évidence dans de nombreux tissus de mammifères (39-42), à la suite des travaux de Pirotte et Desreux en 1952 (43). Cet inhibiteur a été également mis en évidence chez d'autres espèces, marsupiaux (44), batraciens (45), et oiseaux (46).

Les études initiales menées sur cet inhibiteur de la ribonucléase, ont été réalisées par Roth (37,38). Ces recherches complétées par celles de Shortman (36,47), ont permis de déterminer que cet inhibiteur était sensible à la chaleur, et aux acides ainsi qu'aux réactifs bloquant les groupements thiols. Par exemple le PCMB inactive l'inhibiteur et permet le relargage de l'activité ribonucléasique liée. Shortman a également montré que cette protéine n'inhibait pas la ribonucléase acide lysosomique (47).

C'est en utilisant un fractionnement au sulfate d'ammonium, suivi d'une purification par chromatographie d'échange d'ions et d'une chromatographie de gel filtration, que Gribnau et coll. (48) ont pu estimer à environ 50.000 Da le poids moléculaire de l'inhibiteur de la ribonucléase isolé de foie de rat, mais la protéine n'était pas électrophorétiquement pure. Ultérieurement la même équipe a utilisé la chromatographie d'affinité pour réaliser la purification de l'inhibiteur (49), la ribonucléase A étant greffée sur un support de carboxyméthyl-cellulose. Gribnau et coll. ont pu ainsi caractériser cet inhibiteur et mettre en évidence l'importance de la présence de dithiothréitol

(DTT) et d'EDTA, lors de l'extraction de cette protéine, pour la maintenir active (50).

De nombreuses propriétés de l'inhibiteur partiellement purifié ont été décrites (51,52).

L'inhibiteur s'avérait présent dans le placenta humain, tissu qui comporte une activité biosynthétique très élevée (53). C'est à partir de ce tissu que Blackburn et coll. ont purifié cet inhibiteur, en utilisant un fractionnement au sulfate d'ammonium, suivi d'une chromatographie d'échange d'ions et d'une chromatographie d'affinité, la ribonucléase étant greffée sur une Sepharose A (54). Ultérieurement, Blackburn proposait une technique simplifiée de purification où la chromatographie d'affinité était la seule étape suivant le fractionnement au sulfate d'ammonium (55). L'inhibiteur de la ribonucléase étudié dans le cadre de cette thèse a été purifié en utilisant cette méthode, la ribonucléase étant greffée, ici, sur un support de Trisacryl.

Blackburn et coll.(54) ont trouvé que cet inhibiteur placentaire formait un complexe 1/1 avec la ribonucléase, et se comportait comme un inhibiteur non compétitif avec un K_i de 3×10^{-10} M. Selon ces auteurs, cette protéine d'un pHi de 4,7 était constituée de 475 résidus, dont 30 résidus de cystéine. Ces cystéines formaient 11 ponts disulfures ; les 8 groupements -SH restés libres paraissaient essentiels pour l'activité de cette protéine.

En 1988 Schneider et coll.(56) ainsi que Lee et coll. (57) ont déterminé la séquence nucléotidique du gène de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase. De plus ces derniers auteurs ont confirmé leurs résultats par la détermination de la structure primaire de la protéine après digestion trypsique de cette dernière (57) L'inhibiteur de la ribonucléase appelé PRI par l'équipe de Vallee, était donc composé de 460 acides aminés, parmi lesquels 32 cystéines dont au moins 30 d'entre-elles étaient sous forme réduite. On est donc loin des 11 ponts disulfures proposé initialement par Blackburn et coll.(54). Dans deux articles publiés en 1989 (58,59), Lee et coll. précisaient que cet inhibiteur possédait un Ki très faible vis-à-vis de la ribonucléase A avec une valeur de 4×10^{-16} M, agissant comme un inhibiteur de type compétitif. Ces résultats ont été obtenus par des expériences d'association/dissociation, l'inhibiteur étant classé parmi les "tight-binding" inhibiteurs. En effet Turner et coll. (60), qui travaillaient sur les inhibiteurs de thyroïde et du foie de porc, avaient rappelé en citant Morisson (61,62) que ce type d'inhibiteur à Ki très bas ne pouvait pas être parfaitement décrit par une cinétique de type Michaelis-Menten.

Les deux équipes ayant publié la séquence primaire de cet inhibiteur confirmaient les résultats avancés par Blackburn en 1977 (54), précisant que cette protéine était riche en leucine et en cystéine. L'équipe de Vallee remarquait que cette protéine possédait des unités internes

répétitives de 57 acides aminés ayant 39% d'homologie entre-elles, alors que pour Schneider et coll.(56), il s'agissait d'unités répétitives de 28 acides aminés. En fait les unités avancées par Schneider se trouvent disposées en "tandem" dans celles proposées par Vallee (fig 2).

Les deux équipes ont mis en relation le module répétitif qu'ils ont identifié avec une séquence consensus de 24 acides aminés qui est présente dans différentes protéines impliquées dans des mécanismes biologiques importants, comme la coagulation sanguine, le développement embryonnaire, la morphogenèse des cellules et le transport des protéines.

Parmi ces protéines, on peut citer :

Les sous unités α et β de la glycoprotéine Ib de plaquettes ou GPIb (63), l' α 2-glycoprotéine humaine riche en leucine ou LRG (64), la fraction protéique du glycoconjugué de fibroblaste humain ou PG 40 (65), l'adénylate cyclase de levure ou Ad Cyc (66), le protéoglycane II d'os de boeuf ou PG II (67), la chaoptine de drosophile ou Chao (68), et la protéine Toll de drosophile (69).

Dans le modèle comportant des unités répétitives disposées en tandem, la séquence consensus proposée par Schneider et coll.(56) permet de faire apparaître clairement l'homologie qui existe entre le PRI et ces protéines aux multiples fonctions (voir fig 2).

A L - - C - - T - A - C - - L - S - L R - - - - L - E L - L S - N - L G D A G - - - L C - G L - - P - C - L E - L -

1 M S L D I Q S L D I Q C E E L S D A R W A - - - -
 50 S A L R V N P A L A E L N L R S N E L G D V G V H C V L Q
 107 S T L R T L P T L Q E L H L S D N L L G D A G L Q L L C E
 164 S V L R A K P D F K E L T V S N N D I N E A G V R V L C Q
 221 G I V A S K A S L R E L A L G S N K L G D V G M A E L C P
 278 R V L R A K E S L K E L S L A G N E L G D E G A R L L C E
 335 S V L A Q N R F L L E L Q I S N N R L E D A G V R E L C Q
 392 A T L L A N H S L R E L D L S N N C L G D A G I L Q L V E
 449 A L E K D K P S L R V I S

MODULE A

B 21 E L L P L L Q Q C Q V V R L D D C G L T E A R C K D I S
 79 G L Q T P S C K I Q K L S L Q N C C L T G A G C G V L S
 136 G L L D P Q C R L E K L Q L E Y C S L S A A S C E P L A
 193 G L K D S P C Q L E A L K L E S C G V T S D N C R D L C
 250 G L L H P S S R L R T L W I W E C G I T A K G C G D L C
 307 T L L E P G C Q L E S L W V K S C S F T A A C C S H F S
 364 G L G Q P G S V L R V L W L A D C D V S D S S C S S L A
 421 S V R Q P G C L L E Q L V L Y D I Y W S E E M E D R L Q

MODULE B

G L L Q G A - Q L R - L D L S G N - L E - L P P
 G A F - - L K - L - - L - L - N N K I S - V - -
 G A F - - L K - L - - L - L - N N K I T K V - -
C G L L - - L P - L - - L - L S - N - D T T L P -
 - - A - - L - - L - - L - L S - N - A - - A P
 - L F - H - - N L - - L - L - - N - L - - L P -
 - A F - - A - - L - - L D L S - N - L - - A P -

LRG
 PG40
 PG-II
 GPIb
 adcy
 Toll
 chaoptin

FIGURE 2

A : séquence consensus pour l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase proposé par Lee et Vallee.(57)
B : séquences répétitives en tandem à l'intérieur de l'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase. Les unités de 57 acides aminés proposées par Lee et Vallee ((57) voir également figure 16) sont divisées en deux et placées l'une au dessus de l'autre, on peut ainsi voir apparaître des identités ou des conservation d'acides aminés à l'intérieur de groupes d'acides aminés (IVMLFA, WYF, TS, RKH, NEQD, PG, C). D'après Schneider et coll.(56).

C : alignement des séquences consensus des protéines ayant un lien avec le PRI.

La séquence du peptide de 15 acides aminés, étudié dans le cadre de cette thèse, est soulignée.

Takahashi et coll. (64) à partir d'études sur l'alpha 2-glycoprotéine ont émis l'hypothèse que ces motifs répétitifs pourraient jouer un rôle dans les interactions protéine/protéine ou protéine/membrane.

Actuellement l'interaction éventuelle de ces différentes protéines avec la ribonucléase n'est pas connue.

Certaines apolipoprotéines possèdent des unités répétitives disposées en tandem (70), qui ressemblent à ce module par leur longueur, la richesse en leucine, et en d'autres résidus hydrophobes, mais l'homologie de séquence n'est pas prononcée. La relation qui existe entre ces apolipoprotéines et les protéines citées plus haut (ainsi que l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase) concerne donc plus leur fonction que leur génome.

Il est possible que ces motifs hydrophobes, disposés de façon répétitive dans des protéines réparties dans le règne animal, puissent avoir une fonction commune.

2) Etude des inhibiteurs de la ribonucléase chez d'autres mammifères.

Burton qui avait purifié initialement les inhibiteurs de foie de cinq mammifères (boeuf, souris, porc, rat et mouton), avait montré que ces inhibiteurs très similaires de par leur taille, possédaient la même activité inhibitrice vis-à-vis de la ribonucléase pancréatique A. En revanche, un anticorps reconnaissant l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase ne donnait pas de réaction croisée avec ces inhibiteurs hépatiques (42).

Ultérieurement, ces résultats ont été infirmés par Bloemendal et coll. (40). Ces auteurs ont réussi, grâce à un anticorps dirigé contre l'inhibiteur placentaire à détecter des inhibiteurs de quatre différentes espèces (homme, lapin, chat et veau), et dans différents organes ou cellules (foie, rate, rein, thymus, coeur, poumon, moelle osseuse et erythrocytes). Ils ont pu montrer en perfusant ces organes que ce n'était pas un inhibiteur circulant dans le sang qui était détecté. Enfin, à l'aide de "western-blot", les auteurs ont pu attribuer à ces inhibiteurs des poids moléculaires très voisins.

Actuellement, les inhibiteurs de la ribonucléase qui ont été isolés de différents tissus ont des compositions en acides aminés analogues, (voir tableau I). Les analogies sont plus marquées quand on compare les compositions en acides aminés des inhibiteurs isolés d'un même tissu -en l'occurrence le foie de différents mammifères.

La leucine est toujours présente en grande quantité (environ 20%), et la cystéine représente environ 6%. Il peut donc être envisagé que ces inhibiteurs hépatiques soient issus d'un même inhibiteur ancestral, qui n'aurait pas subi de profondes modifications génétiques.

L'inhibiteur de foie de porc et celui de placenta humain, dont les séquences ont été déterminées, présentent de nombreuses homologies de séquences qui peuvent atteindre 78%.

TABLEAU I

Composition en acides aminés de différents inhibiteurs de ribonucléase. la composition en acides aminés de Les résultats sont exprimés en nombre de résidus par molécule de protéine.

l'inhibiteur placentaire humain de ribonucléase est présentée selon Blackburn et coll.(54) et Lee et Coll.(57)
(a)Composition établie d'après la séquence.

	Placenta humain (54)	Placenta(a) humain (57)	Cerveau de boeuf (41)	Cerveau de porc (123)	Foie de rat (42)	Foie de boeuf (42)	Foie de souris (42)	Foie de porc (42)	Foie(a) de porc (95)	Foie de mouton (42)	Testicule de Rat (80)
Asx	47	44	43	37	59	47	55	47	40	48	55
Thr	16	13	20	32	23	21	22	25	23	19	25
Ser	45	45	40	41	43	45	43	43	38	42	42
Glx	64	59	65	85	60	62	63	64	60	62	61
Pro	17	14	18	47	17	15	16	15	16	17	15
Gly	36	32	53	33	33	47	33	43	37	51	40
Ala	34	32	38	44	29	37	30	35	32	35	30
Val	24	24	22	25	22	24	20	19	18	23	20
Met	2-3	2	2	10	2	2	3	2	2	1-2	2
Ile	12	12	9	14	10	9	13	9	9	10	13
Leu	85	92	88	34	89	91	94	93	98	92	66
Tyr	4	3	5	11	5	5	5	4	5	4	8
Phe	6	4	3	12	5	4	3	2	0	4	7
His	6	5	5	8	6	6	3	9	7	5	7
Lys	17	16	15	28	20	14	21	15	14	15	18
Arg	23	24	20	13	20	19	19	21	22	20	23
Cys	30	32	30	5	31	30	26-27	35	30	27	31
Trp	5	6	5	5	5	5	5	5	5	6	non déterminé
TOTAL	475	460	481	481	479	483	475	486	456	482	463 +Trp

Les ribonucléases ayant montré une grande conservation de leur séquence au cours de l'évolution (71), il est possible que l'inhibiteur qui leur est associé ait également une structure très conservée.

En ce qui concerne les modifications post-traductionnelles, l'inhibiteur placentaire, bien que possédant un site de glycosylation en position 397, ne semble pas glycosylé (54, 57). En revanche l'inhibiteur de foie de porc est N-acétylé en N-terminal.

Ces protéines ayant une structure qui semble bien conservée, la connaissance du mécanisme de régulation de ces inhibiteurs paraît essentielle.

Ces inhibiteurs présentent donc des réactions immunologiques croisées vis-à-vis d'un même anticorps. Ils ont une taille identique, possèdent des compositions en acides aminés très similaires et réagissent cinétiquement de la même manière avec la ribonucléase A.

3) Rôle de cet inhibiteur de la ribonucléase

L'activité ribonucléasique a été notée dès le début du siècle par Jones (72), mais ce n'est qu'à partir de 1952 qu'un inhibiteur de cet enzyme a été mis en évidence (43,38). Cet inhibiteur s'est avéré présent dans tous les tissus où la ribonucléase existait. Sa fonction ne semble pas faire de doute : cette protéine bloque l'action de la ribonucléase de façon temporaire, la laissant à l'état d'enzyme à activité latente.

C'est à partir de là qu'une question se pose :

Quels sont les événements extérieurs qui font que l'inhibiteur bloque ou non la ribonucléase?

Roth qui est l'un des précurseurs de l'étude de la ribonucléase avait montré que l'activité de cette enzyme semblait décroître et même parfois disparaître dans les cellules tumorales, avec des variations entre les ribonucléases alcaline et acide au cours du développement de tumeurs induites chez le rat (73,74). Roth précisait également que cet inhibiteur devait jouer un rôle important dans le contrôle du métabolisme des ARN et de la synthèse des protéines.

Il est bien établi que l'intégrité des polysomes dépend de la présence de l'inhibiteur de la ribonucléase lors de l'extraction, et ce dernier s'avère beaucoup moins toxique que d'autres inhibiteurs (48,75,76). Roth avait d'ailleurs dressé une liste de tous les inhibiteurs de la ribonucléase, parmi lesquels figurent des polyanions tels que l'héparine (74). L'inhibiteur est une protéine acide dont le pHi est de 4,7; il est également chargé négativement dans le cytoplasme. Il était envisageable que l'inhibiteur interagisse par des liaisons ioniques, avec la ribonucléase alcaline (de pHi 9,6), chargée positivement, mais ce n'est apparemment pas le cas (54).

Cet inhibiteur de la ribonucléase s'est montré très efficace pour la synthèse de protéines (77), et d'ARN (78) *in vitro*. L'inhibiteur placentaire de la ribonucléase est d'ailleurs maintenant couramment utilisé pour inhiber les

ribonucléases contaminantes lors des expériences de traduction *in vitro*.

Son activité varie en fonction de l'état de la cellule ou du tissu dans lequel il se trouve. Kraft et Shortman en 1970 ont émis l'hypothèse que le rapport entre le complexe (inhibiteur/ribonucléase) et l'inhibiteur libre pouvait varier en fonction de l'activité du tissu, ceci déterminant le degré d'hydrolyse des ARN (79). Dans de nombreux systèmes, la concentration en inhibiteur de la ribonucléase est plus élevée lorsqu'il y a croissance ou prolifération cellulaire (79-81); par contre, l'activité de cet inhibiteur est plus faible lorsque la croissance cellulaire est inhibée ou que la synthèse protéique est diminuée (30,44,82).

La concentration en inhibiteur semble être également influencée par l'environnement hormonal. De nombreuses études ont été faites sur l'utérus de rat. Un traitement par les oestrogènes provoque l'hypertrophie de l'utérus du rat non mature et augmente la synthèse de toutes les classes d'ARN. Normalement, dans ces conditions, la concentration en inhibiteur devrait augmenter. Mais au contraire, sa concentration diminue, et l'inhibiteur de la ribonucléase ne réapparaît pas chez le rat adulte. Il faut noter aussi que cette protéine est présente dans l'utérus de rats immatures, ou ovariectomisés, mais non chez l'adulte. Zan-Kowalczewska et Roth avaient suggéré que cet inhibiteur pourrait être le récepteur du β -oestradiol (83).

Par contre, la concentration en inhibiteur est augmentée dans le foie de coq après un traitement aux oestrogènes (46).

Récemment, Alberghina et coll.(84) ont étudié les différences d'activité des ribonucléases dans le cerveau du rat au cours du vieillissement, et montré que l'activité de la ribonucléase alcaline et de son inhibiteur n'était pas modifiée. En revanche, ils attribuent l'augmentation de l'activité ribonucléasique acide à un accroissement de l'activité lysosomique apparaissant au cours du vieillissement.

Il semble donc que l'inhibiteur de la ribonucléase puisse avoir une concentration modulable au cours du développement, et selon les tissus. Mais les éléments intervenant dans sa régulation ne sont pas encore bien connus.

4) Etude de l'interaction de cette protéine avec la ribonucléase.

a) Les équipes travaillant sur cet inhibiteur placentaire de la ribonucléase.

Au début des années 1980, Blackburn et coll.(54,55,85-87) ne disposaient pas de la séquence de l'inhibiteur. Ils avaient effectué des modifications chimiques spécifiques de certains acides aminés de la ribonucléase A, puis étudié l'interaction inhibiteur/ ribonucléase.

Les travaux effectués par le groupe de Vallee ont porté sur l'étude de modifications de l'inhibiteur suivie d'une étude cinétique de l'interaction entre la protéine native ou modifiée et la ribonucléase A.

Les travaux réalisés par ces deux équipes à presque dix ans d'intervalle, sont rappelés dans la discussion. Toutefois, l'importance des résultats pour la compréhension des interactions entre l'inhibiteur et la ribonucléase, rend nécessaire de les présenter précisément ici

b) Les travaux du groupe de Blackburn :
modifications chimiques de la ribonucléase.

Blackburn et coll.(54) ont mis en évidence un type d'inhibition non-compétitif pour cet inhibiteur vis-à-vis de la ribonucléase; ils ont en outre étudié l'effet de modifications chimiques d'acides aminés de la ribonucléase, sur l'interaction entre l'enzyme et son inhibiteur.

Ces auteurs ont pu remarquer que les acides aminés His-12, et His 119, ainsi que les résidus auxiliaires : Lys-7, Phe-120, Asp-121 et Ser-123, n'étaient pas essentiels pour l'interaction entre les deux protéines (85). Ainsi des résidus appartenant au site actif de la ribonucléase ne semblaient pas impliqués dans l'interaction avec l'inhibiteur.

Dans ce même article, les auteurs ont montré qu'une modification par carbamylation, (c'est à dire avec

neutralisation des charges positives), de seulement trois des dix lysines exposées diminuait de 90% l'activité de l'inhibiteur sur la ribonucléase. En revanche une amidination avec rétention des charges positives de neuf des dix résidus de lysine exposés, n'affectait pas autant l'inhibition (75% de baisse d'activité de l'inhibiteur).

Le résidu de lysine en position 41 semble très important, puisque l'introduction de charges négatives de façon spécifique sur ce résidu diminue de 90% l'interaction de la ribonucléase avec l'inhibiteur (86).

De plus de façon inattendue la carboxyméthylation du résidu His-119 multiplie par 3,5 la force de l'interaction entre l'inhibiteur et la ribonucléase (85,86).

La structure tridimensionnelle de la ribonucléase étant connue, Blackburn et coll. ont aussi étudié le degré de protection que pouvait apporter l'inhibiteur à la ribonucléase vis-à-vis d'une amidination des lysines (87). Parallèlement, ils ont pu montrer qu'un analogue de substrat (l'acide polyadénylique) ne protégeait pas les mêmes lysines de l'amidination (87). Les résultats sont représentés dans le tableau II.

TABLEAU II

Effet protecteur de l'inhibiteur de la ribonucléase ou d'un analogue de substrat vis-à-vis de l'amidination des résidus de lysine de la ribonucléase A.

position des résidus de lysine	1	7	31	37	41	61	66	91	98	104
Protection* apportée(%) par l'inhibiteur	<5	100	100	71	100	100	<5	100	<5	<5
Protection* apportée(%) par le Poly A	<5	51	25	36	100	100	<5	40	<5	43

* D'après Blackburn et Moore (39), selon des résultats obtenus par Blackburn et Gavillanes (87).

Les régions de contact avec la ribonucléase pour le substrat et l'inhibiteur ne sont pas les mêmes, mais se recouvrent. Ceci a permis à Blackburn et coll. de confirmer que l'inhibition était de type non-compétitif, résultat déjà obtenu par étude enzymatique (54).

Cette même équipe a également étudié l'interaction du peptide-S et de la protéine-S avec l'inhibiteur. Ces fragments étant obtenus par digestion de la ribonucléase A avec la subtilisine. Blackburn et coll. ont pu ainsi démontrer que le site de liaison entre la ribonucléase et l'inhibiteur résidait dans la protéine-S, les résidus 1 à 20 ne s'avérant pas nécessaires. De même, la ribonucléase privée de ses résidus C-terminaux 119 à 124 est toujours capable de lier l'inhibiteur (85,86).

Par ailleurs, Blackburn et Gavilanes (86), ont pu montrer qu'au moins une tyrosine était impliquée: celle située en position 92. En effet cette tyrosine est celle qui est la plus conservée dans les ribonucléases de type pancréatique des différentes espèces qu'ils ont étudiées (boeuf, souris, dromadaire, hamster, rat, porc, hamster).

Ainsi l'étude de modifications de la ribonucléase A, a permis à Blackburn et coll. de formuler une hypothèse quant aux résidus impliqués dans la formation du complexe ribonucléase/inhibiteur.

Ils ont désigné trois groupes de résidus **A,B,C**, en fonction de leur localisation dans la molécule.

Le groupe A comprend

a) Lys-7

b) Lys-41, Pro-42, Val-43

c) Lys-91, Tyr-92, Pro-93

A et B étant adjacents

Le groupe B comprend

Lys-31 + Lys-37

C éloigné de A et B

Le groupe C comprend

Lys-61 et les résidus adjacents

La localisation de ces résidus et des régions **A, B, C** est précisée dans la figure 3.

L'hypothèse serait donc la suivante: l'interaction impliquerait un large contact entre l'inhibiteur et la ribonucléase A s'étendant de **A** à **B** et autour de **C**.

D'autres régions de contact se trouveraient entre **A, B** et **C**; sans impliquer les régions où les groupements epsilon-NH₂ des Lys 1, 66, 98 et 104 sont présents puisque ces résidus ne sont pas protégés de l'amidation. Le contact entre **B** et **C** pourrait impliquer le sillon formé par les résidus Ser-77 à Thr-82. Enfin une interaction ionique cruciale impliquerait le groupement epsilon-NH₂ de la lysine 41, et un groupement négativement chargé de l'inhibiteur.

Les travaux réalisés par l'équipe de Blackburn ont apporté de précieuses informations concernant les régions de la ribonucléase A qui étaient en contact avec l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase lors de la formation du complexe enzyme/inhibiteur.

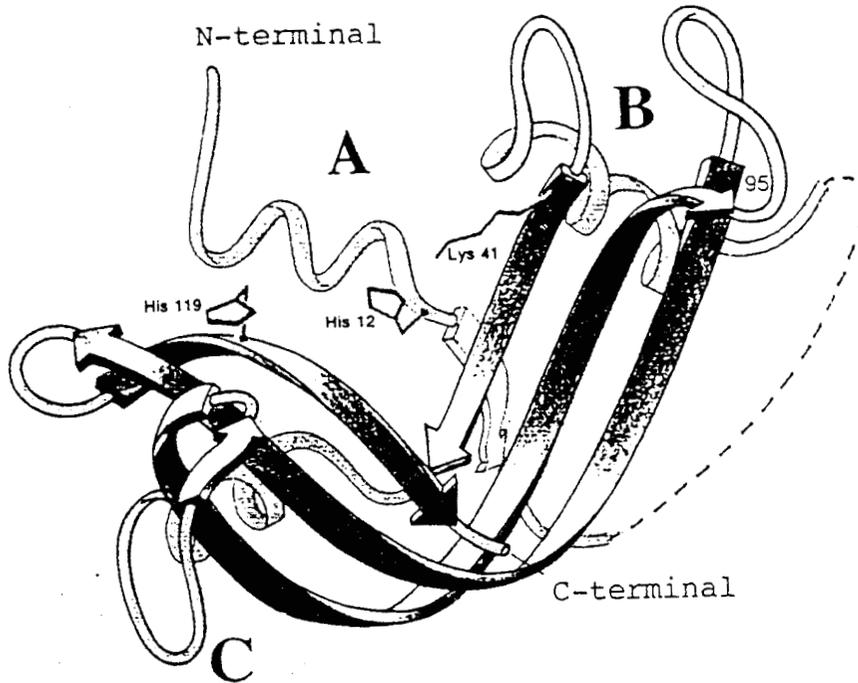


FIGURE 3

Représentation de la structure tridimensionnelle de la ribonucléase A. La structure en hélice α est figurée en bleu, les feuillets β en gris foncé. Les régions de l'enzyme interagissant avec l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase sont représentées par les trois lettres A, B, C. (D'après Blackburn et Moore (39))

Nota : la molécule qui a été cristallisée pour permettre de déterminer cette structure est la *ribonucléase S*, dans laquelle la liaison peptidique entre les acides aminés 20 et 21 a été coupée (pointillés). Cette forme cristallise mieux, mais la ribonucléase a vraisemblablement subi de légers réarrangements.

Il semble bien que l'inhibiteur soit en contact avec des régions de l'enzyme éloignées dans l'espace. Bien que le nombre d'acides aminés ne permette pas de présumer de la taille dans l'espace d'une protéine, on peut toutefois envisager au vu des résultats obtenus par Blackburn et coll. que cette molécule d'inhibiteur, presque quatre fois plus longue que la ribonucléase, soit capable d'englober l'enzyme. Certaines séquences de l'inhibiteur seraient responsables de la liaison, tandis que d'autres seraient impliquées dans l'inhibition.

c) Les travaux du groupe de Vallee : modifications de l'inhibiteur par mutagenèse dirigée.

L'équipe de Vallee s'intéressait à l'angiogénine, une molécule de 123 acides aminés, identifiée comme un facteur de néovascularisation des vaisseaux dans les tumeurs. Ils avaient en effet remarqué que cette angiogénine possédait aussi une activité ribonucléasique vis-à-vis des ARN ribosomiaux 18S et 28S. Sa séquence primaire, qu'ils ont déterminée en 1985, montre 35% d'homologies avec celle de la ribonucléase; cette homologie est très marquée pour les acides aminés impliqués dans le site actif (88-90).

L'inhibiteur placentaire de la ribonucléase (PRI), s'est avéré capable d'inhiber les propriétés angiogéniques et ribonucléasiques de l'angiogénine (91). Cette inhibition avec un K_i de $7,1 \times 10^{-16}$ M est soixante fois plus forte que

celle exercée sur la ribonucléase A. Cette inhibition est également compétitive .

Dans un premier temps, Lee et coll.(57) ont séquencé l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase. Puis Lee et Vallee (92) ont étudié l'action de mutants de cet inhibiteur sur la ribonucléase. Ces mutants correspondent principalement à la protéine, amputée de certaines des unités répétitives internes que ces auteurs avaient mises en évidence.

Au cours de ces travaux, Lee et Vallee (92) ont observé séparément les capacités de **liaison** à la ribonucléase, de celles d'**inhibition**. La figure 4 montre les différents mutants étudiés; il apparaît que certains mutants ne possèdent que l'activité de liaison. En revanche aucun mutant obtenu n'est capable d'inhiber seulement la ribonucléase. Les auteurs ont déduit de ces travaux que les régions N et C-terminales étaient essentielles pour la bonne fixation de l'inhibiteur sur la ribonucléase.

Il semble également que certaines régions de la protéine soient des séquences clés pour l'activité de cet inhibiteur. D'ailleurs deux mutants possédant à la fois la capacité de liaison et d'inhibition ont fait l'objet d'une étude plus précise de la part de Lee et Vallee (93).

Dans le cadre d'études sur l'angiogénine, Bond et Vallee (94) ont effectué des modifications sur l'angiogénine qui ont permis d'apporter des renseignements concernant les résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction avec l'inhibiteur.

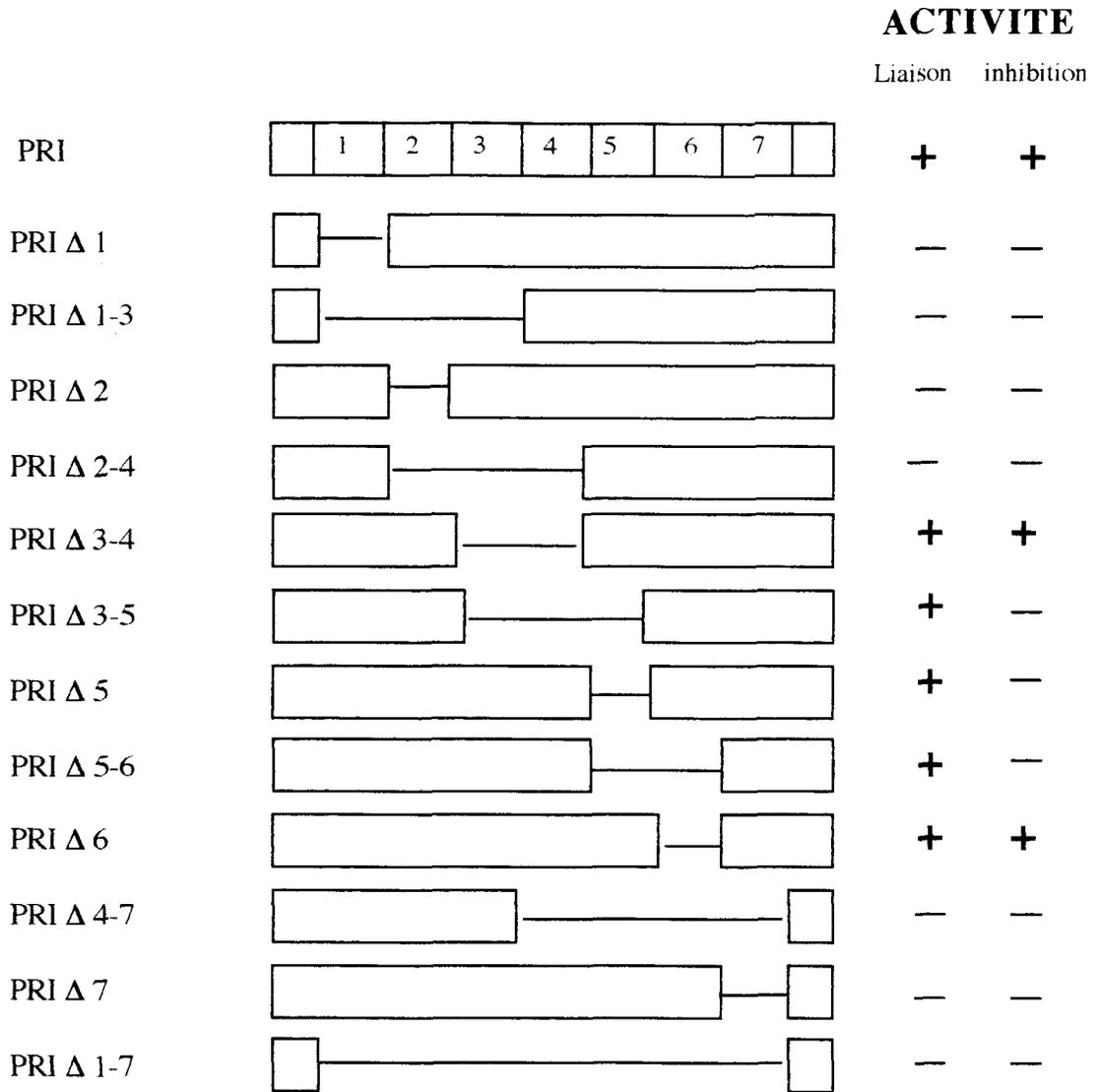


FIGURE 4

Schéma des différents mutants de l'inhibiteur placentaire de ribonucléase obtenus par mutagenèse dirigée. Leur capacité de liaison et d'inhibition sur la ribonucléase A est figuré par un (+). D'après Lee et Vallee (92).

Ces auteurs ont noté que le remplacement des résidus 8 à 22 de l'angiogénine par les résidus 7 à 21 de la ribonucléase, augmentait très fortement l'activité de l'inhibiteur pour cette nouvelle angiogénine obtenue.

Bond et Vallee (94) posent l'hypothèse que l'addition de ces résidus sur l'angiogénine, éliminerait peut être des interactions gênantes. En se basant sur la structure de la ribonucléase, ces auteurs pensent que les acides aminés Lys-8 et Arg-10 de la nouvelle angiogénine obtenue seraient de bons candidats pour la formation de ponts hydrogène ou de liaisons ioniques avec l'inhibiteur.

Mais ceci est en désaccord avec les résultats trouvés par Blackburn et coll.(85) qui montraient que les vingt premiers résidus de la ribonucléase n'étaient pas impliqués dans l'interaction avec l'inhibiteur.

En réalisant une étude cinétique, l'équipe de Vallee (59,91) a montré que l'inhibition était de type compétitif. Par contre, Blackburn et coll.(54) avaient mis en évidence une inhibition non-compétitive par étude cinétique, et étayé ce résultat en notant la différence entre les résidus impliqués dans le site actif de la ribonucléase, et ceux impliqués dans le contact avec l'inhibiteur.

Les deux types d'inhibition n'ont pas été obtenus de la même manière; en effet, le très faible K_i du PRI vis-à-vis de la ribonucléase impliquait peut être des études cinétiques différentes de celles utilisées par Blackburn et coll. (54). Le type de liaison étant "Tight-Binding", une approche selon les théories de Michaelis-Menten donne

toujours un type non-compétitif d'inhibition dans la représentation selon Lineweaver-Burk (61,62).

Toutefois, Blackburn et Gavilanes (87) avaient noté que les acides aminés impliqués dans l'interaction entre la ribonucléase et son inhibiteur ou son substrat se recouvraient mais n'étaient pas similaires.

Il est donc encore assez difficile de déterminer le type d'inhibition exact qu'exerce le PRI sur la ribonucléase. Les modifications chimiques sont tout aussi crédibles que des études cinétiques par techniques d'association-dissociation. Le peptide qui a fait l'objet du travail présenté dans le cadre de cette thèse a montré une inhibition non compétitive vis-à-vis de la ribonucléase A.

d) Modifications d'un autre inhibiteur de la ribonucléase

Hofsteenge et coll.(95-97) se sont intéressé à l'inhibiteur de la ribonucléase de foie de porc. Cette protéine présente une grande similarité avec l'inhibiteur placentaire (voir Tableau I page 33).

L'inhibiteur isolé de foie de porc possède, 456 acides aminés, des homologues de séquence avec le PRI, des unités répétitives de 28 ou 29 acides aminés riches en leucine, et un K_i vis-à-vis de la ribonucléase similaire à celui de l'inhibiteur placentaire. Certaines régions de la protéine présentent 78% d'homologie avec le PRI.

Hofsteenge et coll.(97) ont donc montré que cet inhibiteur isolé du foie de porc et amputé des 90 acides

aminés N-terminaux, était capable d'inhiber la ribonucléase, avec un K_i du même ordre. Ces auteurs remettent ainsi en question la théorie proposée par Lee et coll.(92) qui donnait un rôle primordial aux extrémités N et C-terminales de l'inhibiteur.

Cependant l'homologie entre l'inhibiteur de placenta humain et celui de foie de porc n'est peut être pas suffisante pour permettre de conclure.

e) Etude de la ribonucléase placentaire

Récemment l'équipe de Vallee a purifié la ribonucléase majoritaire présente dans le placenta (98), le but étant de pouvoir étudier l'interaction de l'inhibiteur (PRI) avec l'enzyme qu'il inhibe dans le placenta. Le pouvoir d'inhibition de cette protéine sur la ribonucléase placentaire est semblable à celui exercé sur l'angiogénine.

Compte tenu de sa structure primaire et de ses propriétés catalytiques, la ribonucléase de placenta humain qu'ils ont isolée est semblable à la ribonucléase isolée de cellules éosinophiles (eosinophil-derived neurotoxin EDN (99)), et de l'urine (100). Ces enzymes appartiennent d'ailleurs à une "superfamille" de ribonucléase où l'angiogénine serait présente (71).

CHAPITRE II

**ETUDE PERSONNELLE SUR L'INHIBITEUR DE LA
RIBONUCLEASE, ET SON ROLE POSSIBLE DANS LA
MALADIE D'ALZHEIMER.**

A MATERIEL ET METHODES

1) Dosage de l'activité ribonucléasique avant et après addition du PCMB

Les cerveaux étudiés, provenaient de patients décédés de maladie d'Alzheimer à l'Hôpital Charles Foix d'Ivry. Deux séries prospectives ont été étudiées. Il s'agissait de 14 femmes pour la première série, et de 15 femmes pour la seconde, toutes âgées de plus de 75 ans et pour lesquelles un score de Blessed (6,7) avait été établi avant le décès. Ce score variant de 0 à 30 permet d'évaluer le degré de démence du malade (0 étant pour les plus déments, 30 pour le sujet sain). Les prélèvements de tissu ont eu lieu dans la région frontale F2 sur l'hémisphère qui avait été congelé. L'autre hémisphère (de façon arbitraire, le droit ou le gauche) a été fixé au formol pour permettre après traitement, des études neuropathologiques, en particulier: comptage du nombre de plaques séniles et du nombre de dégénérescences neurofibrillaires. (Tout ce qui vient d'être énoncé ci-dessus a été réalisé par l'équipe du professeur Jean-Jacques Hauw à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière de Paris, et à l'Hôpital Charles Foix d'Ivry).

Les pièces anatomiques ont été prélevées après décongélation, puis pesées, et broyées au Potter dans un tampon 0,1M Tris-HCl pH 7,1 (10 ml/g de tissu). L'homogénat 10% obtenu a été centrifugé deux fois à 500 x g pendant 10 minutes. Le deuxième surnageant obtenu a été réparti en plusieurs aliquotes puis congelé à -70 °C. Les dosages de

l'activité ribonucléasique ont été réalisés sur ces surnageants avant et après l'addition de PCMB. Ainsi 5 μ l de PCMB 5 mM (ou 5 μ l de NaCl à 0,9%, pour le dosage en absence de PCMB), ont été ajoutés à 20 μ l d'homogénat. Le mélange a été incubé 1 h à 4 °C puis dilué au 1/20 dans NaCl à 0,9%. Enfin 10 μ l de ces dilutions ont été testés pour leur activité ribonucléasique, mesurée en suivant la vitesse de formation de matériel acido-soluble, à partir du Poly-C utilisé comme substrat. Le milieu d'incubation était un tampon phosphate 30 mM (350 μ l), l'extrait de cerveau (10 μ l), et le Poly-C à 9 mM (25 μ l). Après différents temps d'incubation, une aliquote de 300 μ l a été prélevée puis ajoutée à 200 μ l d'albumine bovine à 5 mg/ml. Puis 500 μ l d'acide perchlorique 1N ont été ajoutés immédiatement. Après 20 minutes à 0 °C, les tubes ont été centrifugés à 17000 x g pendant 10 minutes. L'absorption du surnageant obtenu a été mesurée à 278 nm. (101). Pour chaque détermination trois points (10, 20, 30 minutes) de cinétique ont été réalisés. Un échantillon prélevé au temps zéro a servi de blanc. Dans ce dosage, une unité de ribonucléase est définie comme étant celle qui produit 1 unité de matériel acido-soluble à partir de Poly-C, la mesure était effectuée à 278 nm (101). Les valeurs d'activité ribonucléasique obtenues avant l'addition de PCMB (activité libre) ont été soustraites de celles obtenues après addition de PCMB (activité totale) (voir figure 1 page 24); cette nouvelle valeur correspondant à l'activité ribonucléasique inhibée (activité liée) a été divisée par la valeur d'activité totale de la ribonucléase

pour obtenir le pourcentage d'inhibition. Les dosages ont été dupliqués, et effectués en "aveugle", c'est à dire sans connaître la valeur du score de Blessed correspondant au patient étudié.

La quantité de protéine par ml d'homogénat a été déterminée par la méthode de Lowry (102).

2) Méthodes statistiques

Les corrélations entre le score de Blessed et le pourcentage d'inhibition ont été réalisées par madame Monique Josien.

Les différentes valeurs de score de Blessed (zéro étant pour les plus déments, et trente pour les patients ne présentant aucun signe de démence), n'étant pas réparties de manière paramétrique, les études de corrélations ont été envisagées d'une part sur la totalité des valeurs, d'autre part, en considérant que les valeurs étaient réparties en trois groupes distincts.

Les comparaisons de moyennes ont été étudiées au moyen du test de Mann-Whitney.

Les recherches de corrélations ont été réalisées par le test de Spearman.(voir tableau III)

TABLEAU III

Valeurs comparées dans le cadre de l'étude de l'activité de la ribonucléase dans les cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer. Les valeurs des scores de Blessed (non paramétriques) ont été considérées soit comme une série unique G_T , soit comme trois petits groupes (1, 2, 3).

Le **groupe G_T** recouvre toutes les valeurs des scores de Blessed (29 cas).

Le **groupe 1** correspond aux patients ayant un score de Blessed variant de 0 à 6 (11 cas).

Le **groupe 2** score de Blessed variant de 10 à 16 (9 cas).

Le **groupe 3** score de Blessed variant de 19 à 28 (9 cas).

Corrélation des rangs de Spearman.

Le **groupe G_T** (29 cas) a été corrélé avec l'activité

- de la **ribonucléase libre** (du **cortex** et du **cervelet**)
- de la **ribonucléase liée** (du **cortex** et du **cervelet**)

Le **groupe G_T** a été corrélé au **délai post-mortem**

Comparaisons de moyennes (Mann-Whitney)

les **groupes 1, 2 et 3** ont été comparés entre eux pour différentes valeurs d'activité ribonucléasique.

1/2; 1/3; 2/3

Les comparaisons de moyennes ont été réalisées pour les mesures de l'activité

- de la **ribonucléase libre** (du **cortex** et du **cervelet**)
- de la **ribonucléase liée** (du **cortex** et du **cervelet**)

Lorsque trois groupes distincts de patients ont été envisagés, il s'agissait de patients ayant les scores de Blessed suivants :

Groupe 1 : scores de Blessed variant de 0 à 6 (11 cas)

Groupe 2 : scores de Blessed variant de 10 à 16 (9 cas)

Groupe 3 : scores de Blessed variant de 19 à 30 (9 cas).

Les valeurs d'activité libres et totales de la ribonucléase ont été mesurées dans le cortex et dans le cervelet des patients. Ainsi, les valeurs d'activité ribonucléasique liée à l'inhibiteur ont pu être calculées.

Les taux d'inhibition exercés par l'inhibiteur sur la ribonucléase alcaline, ont été déduits de ces résultats.

3) Préparation des coupes histologiques

Ces coupes ont été préparées par l'équipe du professeur Jean-Jacques Hauw. Après deux mois de fixation dans le formol 10%, les pièces anatomiques ont été prélevées sur les cerveaux dans la région frontale F2, fixées dans la paraffine et des coupes de 7,5 μm ont été réalisées.

4) Obtention et utilisation de l'anticorps anti-PRI

a) Immunisation des lapins

L'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase purifié a été utilisé pour obtenir un immunsérum. La technique de purification de cette protéine est détaillée au chapitre III. Brièvement on peut préciser qu'un fractionnement au sulfate d'ammonium d'un homogénat placentaire a été déposé sur une colonne de chromatographie d'affinité possédant la ribonucléase pancréatique A comme ligand. Après élution des protéines non spécifiques, la protéine (l'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase) a été obtenue pure en une seule étape.

Trois lapins blancs New Zealand ont été immunisés avec cette protéine.

Tout d'abord 100 μg d'inhibiteur placentaire de la ribonucléase lyophilisés, ont été repris dans un mélange 1/1 (NaCl à 0,9%, adjuvant incomplet de Freund), 0,5 ml de cette émulsion ont été injectés par voie intramusculaire dans chaque cuisse. Pour les injections suivantes (soit 330 μg), la protéine a été reprise dans un mélange similaire contenant cette fois l'adjuvant complet de Freund (NaCl 0,9%, adjuvant complet de Freund). Des injections sous-cutanées, correspondant respectivement à 100, 50, 50, 75, 25 et 30 μg ont été effectuées à intervalle d'une semaine. Avant chaque nouvelle injection un prélèvement sanguin a été effectué de manière à vérifier (par la méthode d'Ouchterlony) la présence d'anticorps dirigés contre cet

inhibiteur placentaire de la ribonucléase. Enfin les lapins ont été saignés, et le sérum obtenu purifié par chromatographie d'affinité.

b) Chromatographie d'affinité

Afin d'éviter de purifier des anticorps dirigés contre d'éventuels contaminants de la protéine qui n'auraient pas été détectés en gel de polyacrylamide, l'inhibiteur placentaire, (RNasin®, Promega) a été greffé sur la colonne d'affinité. Dans ce but, 260 μ l de solution de RNasin® (soit environ 100 μ g de protéine) ont été dialysés contre un tampon NaHCO_3 0,1M pH 9, puis cette solution a été mise en contact avec le support de chromatographie constitué de Trisacryl GF 2000 activé à la glutaraldéhyde (IBF). Le greffage a été réalisé selon le protocole proposé par le fabricant en "batch" dans un tube microfuge (Eppendorf). Le support greffé obtenu (200 μ l) a servi à purifier l'immunsérum de lapin selon le protocole de Lee et coll. (57);

L'immunsérum a donc été dilué avec un volume égal de tampon PBS, mis en "batch" avec le support de chromatographie possédant la RNasin® comme ligand, soumis à une agitation douce pendant 15 heures à 4 °C. La colonne de chromatographie a été lavée par le PBS, puis l'élution de la colonne a été réalisée à l'aide d'un tampon MgCl_2 3,5 M, contenant 10% de dioxane(v/v). Une dialyse contre un tampon PBS a été réalisée immédiatement après, et le dialysat

obtenu a été réparti en aliquotes congelées dans l'azote liquide puis conservées à -70 °C. Tous les pipettages effectués lors de la purification, ont été réalisés au moyen d'un cône garni de laine de verre, et branché sur une pipette automatique de manière à ne pas aspirer le support de chromatographie lors des différents lavages et éluations. La pureté des éluats a été vérifiée par "Western Blot"(103), après électrophorèse d'extraits de placenta sur gel de polyacrylamide, et transfert sur feuille de nitrocellulose (Amersham).

c) Immunomarquage

L'anticorps obtenu chez le lapin a été utilisé à différentes concentrations: 1/2000^e, 1/1000^e, 1/500^e, 1/200^e, et 1/100^e. L'anticorps secondaire était marqué à la streptavidine-biotine, la coloration a été réalisée selon la méthode de Sternberger (104), en utilisant la diaminobenzidine comme chromogène. La contre-coloration a été réalisée avec l'hématoxyline de Harris pour les résultats positifs.

B RESULTATS

1) Dosage de l'inhibiteur de la ribonucléase dans des cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer

Deux séries de cerveaux (au total 29 cerveaux), provenant de l'étude prospective Charles FOIX ont été analysées. Les dosages de l'activité ribonucléasique ont été effectués avant et après addition de PCMB aux homogénats de pièces anatomiques prélevées sur le cortex frontal en F2. Le PCMB bloque l'action de l'inhibiteur sur la ribonucléase et permet de mesurer l'activité ribonucléasique latente, celle qui est liée à l'inhibiteur (fig 1 page 24). On peut ainsi déduire le pourcentage d'inhibition exercé par l'inhibiteur sur la ribonucléase. (Tableaux IV et V)

Avant de chercher une corrélation entre le score de Blessed et l'activité ribonucléasique libre ou liée, il fallait tenir compte de l'éventuelle influence du délai post mortem sur les dosages. En effet, les délais entre le décès des malades et le prélèvement du cerveau variaient d'un sujet à un autre, il pouvait donc en résulter un début de dégradation des protéines cérébrales dont l'activité était dosée. Pour apprécier cette éventuelle protéolyse, le taux d'inhibition a été divisé par le nombre de grammes de protéines présents dans l'homogénat, et le dosage des protéines a été réalisé en utilisant la technique de Lowry, qui dose également les protéines dégradées. Il apparaît que la différence de délai post mortem n'a pas provoqué de

TABLEAU IV

Valeurs d'activité ribonucléasique totale, et liée obtenue lors des dosages effectués sur les **cortex** de patients décédés de la maladie d'Alzheimer.
 Les pourcentages d'inhibition exercés par l'inhibiteur sur la ribonucléase alcaline cérébrale ont pu être déduits (% inhibition).
 Les délais post-mortem correspondants sont également présentés (DPM).

Score Blessed	RNase Totale	RNase Liée	% inhibition	DPM (heures)
0	20.95	5.45	26	6
1	15.54	11.19	72	5
2	22.86	17.83	78	28
2	15	11.25	75	7
2	10.33	7.85	76	18
3	11.84	6.51	55	42
3	11.8	10.03	85	18
4	26.96	20.76	77	24
5	11.92	7.39	62	7
6	9.88	1.98	20	12
6	33.21	15.91	48	29
10	31.67	14.57	46	48
12	14.33	11.32	79	18
13	17.87	9.47	53	26
14	6.36	2.16	34	12
15	15.43	8.64	56	57
15	7.59	4.48	59	35
16	15.24	8.84	58	24
16	14.98	8.99	60	25
16	13.65	5.19	38	23
19	27.95	17.05	61	17
20	10.41	6.14	59	24
25	11.91	8.1	68	26
26	33.62	26.56	79	24.5
26	34.59	21.79	63	23
27	26.5	21.2	80	7
27	11.46	8.71	76	22
27	10.79	7.77	72	9
28	24.19	16.69	69	9.5

TABLEAU V

Valeurs d'activité ribonucléasique totale, et liée obtenue lors des dosages effectués sur les **cervelets** de patients décédés de la maladie d'Alzheimer.
 Les pourcentages d'inhibition exercés par l'inhibiteur sur la ribonucléase alcaline cérébrale ont pu être déduits (% inhibition).
 Les délais post-mortem correspondants sont également présentés (DPM).

Score Blessed	RNase Totale	RNase liée	% inhibition	DPM (heures)
0	9.05	5.52	61	6
1	5.26	3.84	73	5
2	11	8.8	80	28
2	3.82	0.84	22	7
2	8.33	6.33	76	18
3	6.1	4.21	69	42
3	3.39	2.44	72	18
4	11.39	9.34	82	24
5	8.51	5.36	63	7
6	6.74	5.19	77	12
6	6.6	3.3	50	29
10	14.44	7.94	55	48
12	4.5	2.88	64	18
13	6.48	4.73	73	26
14	3.97	1.47	37	12
15	12.12	8	66	57
15	3.8	2.05	54	35
16	9.27	7.88	85	24
16	7.54	5.43	72	25
16	8.58	4.29	50	23
19	14.55	9.75	67	17
20	4.37	2.49	57	24
25	9.37	5.81	62	26
26	13.34	9.07	68	24.5
26	6.09	3.29	54	23
27	10.68	5.98	56	7
27	9.1	6.37	70	22
27	5.41	3.03	56	9
28	10	9.3	93	9.5

dégradations notables, puisque le pourcentage d'inhibition ramené au poids de tissu cérébral est égal (à 0,1% près) au pourcentage d'inhibition ramené à la quantité de protéines. Ainsi aucune corrélation n'apparaît entre le délai post-mortem et le pourcentage d'inhibition; ceci élimine donc une éventuelle source d'erreur.

Les recherches de corrélations ainsi que les comparaisons de moyennes (tableau III page 54), n'ont permis de mettre en évidence aucune valeur significative.

Dans notre étude, l'activité ribonucléasique libre et liée dosée dans le cortex et dans le cervelet des patients décédés de la maladie d'Alzheimer, n'est donc pas corrélée de manière significative au degré de démence des malades.

Les figures 5 et 6, illustrent l'absence de corrélation déjà mathématiquement démontrée par les calculs statistiques. Les activités ribonucléasiques libres et totales, ainsi que le pourcentage d'inhibition ne varient pas d'un groupe à un autre. De même, si on considère un seul groupe de 29 patients (qui correspondrait au trois graphiques 1,2,3 réunis) l'absence de liaison significative entre les activités ribonucléasiques, et les scores de Blessed est nette. Toutefois ces graphiques ne permettaient pas à eux seuls de préjuger de l'absence de corrélation, c'est pour cela qu'une approche statistique a été envisagée.

On remarque (fig 5) que dans le cortex, l'activité de la ribonucléase libre et l'activité de la ribonucléase totale, sont beaucoup plus élevées que dans le cervelet.

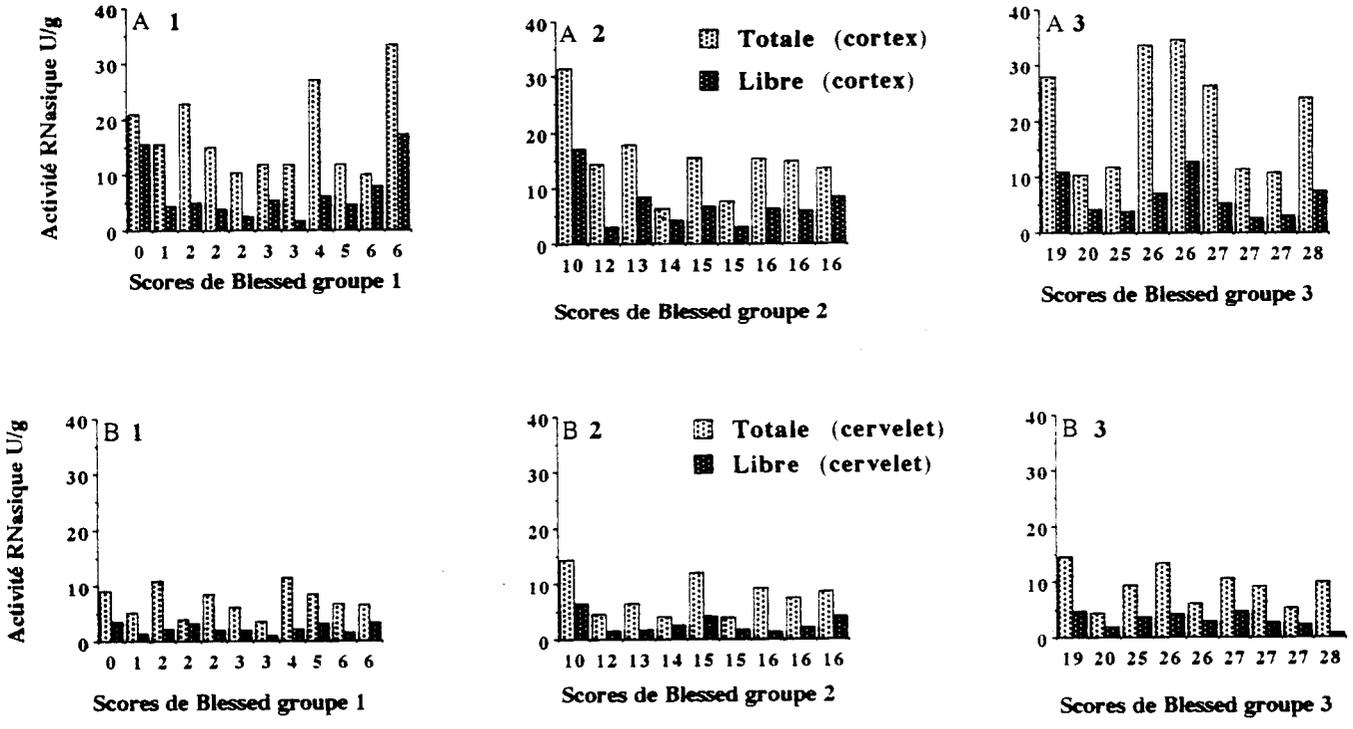


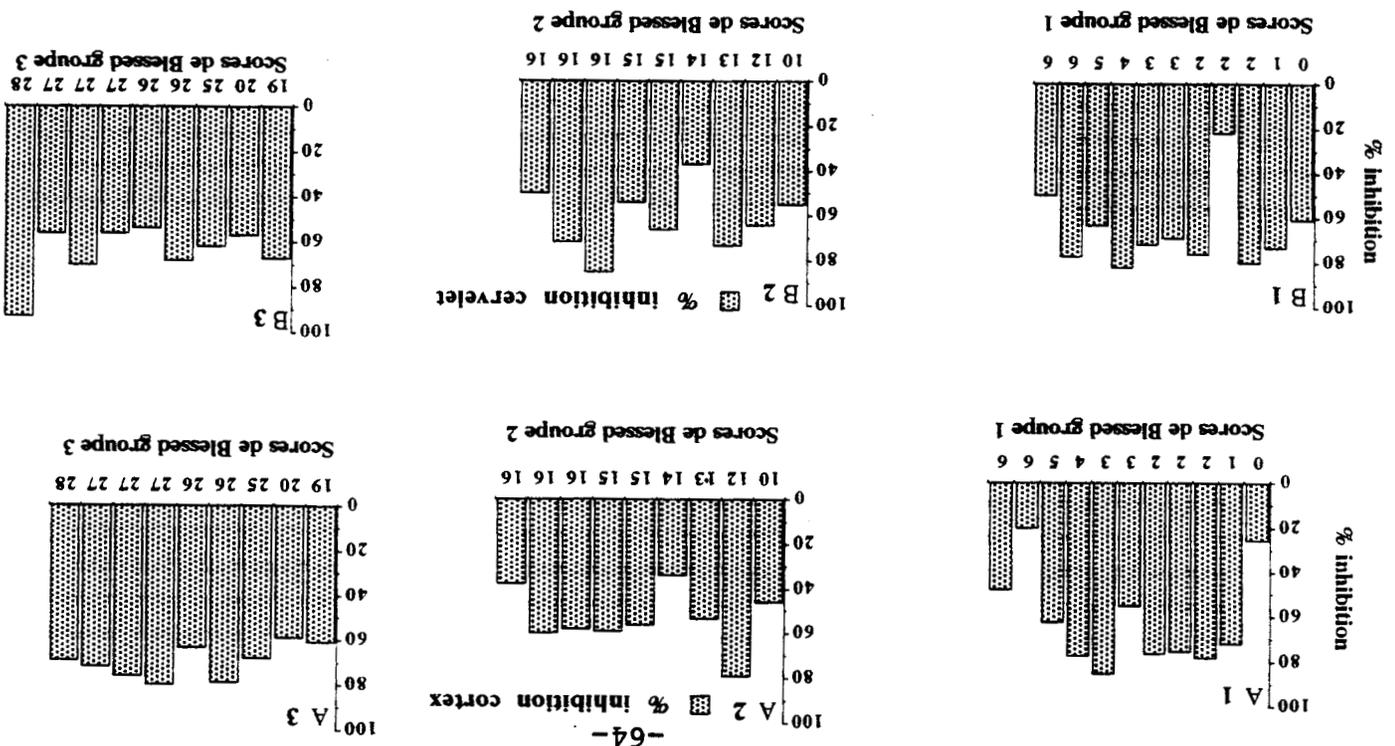
FIGURE 5

Graphiques représentant les dosages de l'activité ribonucléasique alcaline libre et totale (en A) dans le cortex et (en B) dans le cervelet de patients décédés de la maladie d'alzheimer.

Trois différents groupes ont été considérés.

Graphiques représentant les pourcentages d'inhibition effectués par l'inhibiteur cérébral sur la ribonucléasique alcaline présente dans le cortex (en A) et dans le cervelet (en B) de patients décédés de la maladie d'Alzheimer. Trois différents groupes ont été considérés.

FIGURE 6



Le cervelet a été considéré comme témoin pour le cortex, car lorsque cette étude a été commencée, aucun marqueur de la maladie d'Alzheimer n'avait encore été mis en évidence dans ce tissu.

2) Essai de localisation de l'inhibiteur de la ribonucléase cérébrale dans des coupes de cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer.

L'anticorps utilisé pour détecter l'inhibiteur de la ribonucléase cérébrale était un anticorps dirigé contre l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase. Le sérum a été purifié par chromatographie d'affinité avec le PRI comme ligand; la figure 7 montre deux Western-blot effectués sur les extraits de placentas en utilisant comme anticorps le sérum de lapin non purifié (A), et l'anticorps purifié (B). Avant purification, le sérum reconnaît de nombreuses protéines dans le placenta humain, peut-être parce que les anticorps de lapins sont capables de réagir avec certaines protéines humaines. Mais il est également possible que certaines protéines contaminantes lors de la purification de l'inhibiteur, qui n'ont pas été détectées en gel de polyacrylamide (car présentes en trop faible quantité), aient aussi immunisé les lapins. Ceci expliquerait la réaction avec certaines protéines de l'extrait total de placenta utilisé pour ce Western-Blot.

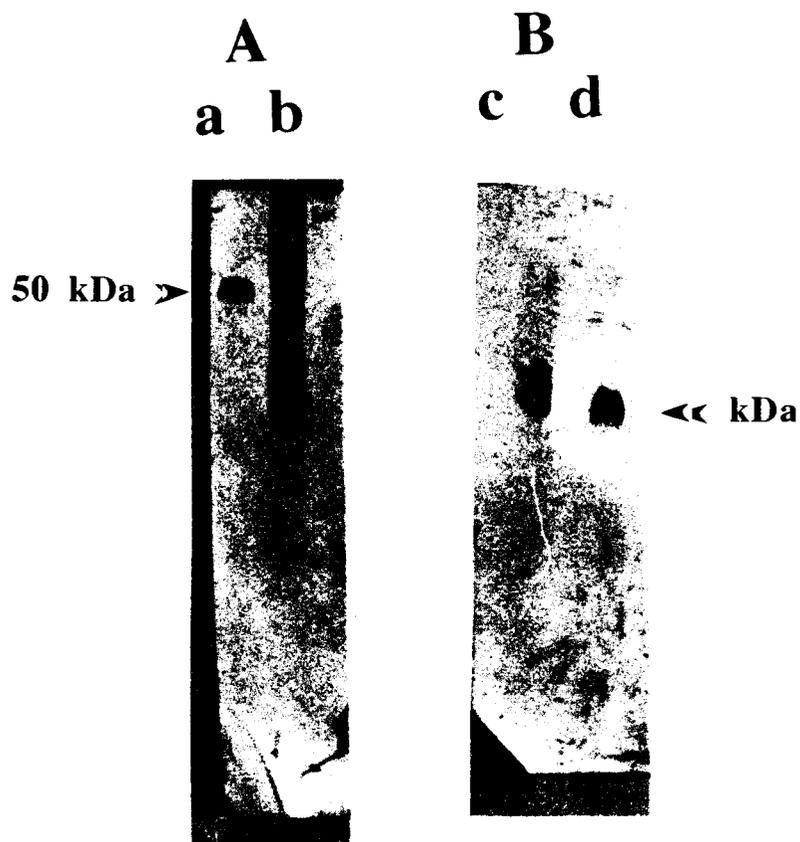


FIGURE 7

Western-Blot de gels de polyacrylamide.

les gels de polyacrylamides ont été chargés de la manière suivante :

En a et d la RNasin® a été chargée.

En b et c un extrait d'homogénat placentaire après fractionnement au sulfate d'ammonium a été déposé.

Les western-Blot ont été réalisés de la manière suivante :

A Révélation par l'immunsérum non purifié.

B Révélation par L'immunsérum purifié par chromatographie d'affinité.

Après purification du sérum par chromatographie d'affinité, il n'y a plus que deux bandes qui réagissent avec l'anticorps (fig 7 B), l'une ayant un poids moléculaire d'environ 50 kDa (correspondant à l'inhibiteur), l'autre d'environ 64 kDa, qui pourrait correspondre à l'inhibiteur complexé à la ribonucléase, dans un rapport 1/1. En effet l'affinité de l'inhibiteur pour la ribonucléase placentaire est telle que l'on peut supposer qu'une partie de l'inhibiteur soit encore complexé à la ribonucléase malgré l'action des agents dénaturants utilisés pour effectuer le gel précédant le Western-Blot. (Il faut aussi rappeler que le complexe PRI/Ribonucléase placentaire a un K_i de 9×10^{-16} M (98)).

L'anticorps ayant été testé en "western-Blot", il importait donc de vérifier sa valeur sur des coupes de placenta humain, traitées de la même manière que les coupes provenant de cerveaux congelés. Toute la surface de la coupe a été marquée par cet anticorps; la protéine étant présente en grande quantité dans ce tissu, ce marquage généralisé était attendu.

Cet anticorps a ensuite été testé sur des coupes de cerveaux provenant de patients décédés de la maladie d'Alzheimer, et sur des coupes de cerveaux témoins.

Pour analyser l'influence éventuelle du traitement subi par les pièces anatomiques, différents types de prétraitements ont été employés sur des cerveaux témoins. Ces essais ont été effectués sur des cerveaux témoins car ce

matériel est plus facile à obtenir. Tout d'abord une coupe provenant d'un cerveau fixé moins longuement par le formol a été utilisée pour le marquage, mais sans succès. Ensuite, des traitements par la trypsine ou l'acide formique permettant de mieux exposer les épitopes de l'antigène ont été utilisés, mais ces méthodes n'ont pas permis d'identifier la protéine recherchée. Enfin une coupe provenant d'un cerveau congelé (donc: sans fixation au formol) n'a pas non plus permis d'obtenir de marquage.

Au total: les essais de marquage de l'inhibiteur de la ribonucléase cérébrale à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'inhibiteur de la ribonucléase placentaire, n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

C DISCUSSION

La détection immunologique de l'inhibiteur cérébral de la ribonucléase devait être tentée puisque tous les éléments étaient apparemment rassemblés pour ceci. Comme il n'était pas possible de vérifier si l'anticorps placentaire (anti-inhibiteur placentaire) reconnaissait en Western-blot l'inhibiteur cérébral humain (cette protéine n'ayant pas été purifiée chez l'homme); un essai préliminaire a été réalisé par immunomarquage de coupes de placenta humain. L'anticorps a permis le marquage de toute la surface de la coupe, résultat attendu le PRI étant présent en grande quantité (environ 4.4 mg par placenta humain (54)). En revanche sur les coupes de cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer ou sur les coupes de cerveaux témoins aucun

marquage n'a jamais pu être réalisé, et ceci quel que soit le prétraitement effectué sur ces coupes. Il a pourtant été rapporté que ce type d'anticorps polyclonal dirigé contre le PRI était capable de reconnaître la protéine présente dans de nombreux tissus humains, (foie, rate, rein, coeur, poumon, erythrocytes, moelle épinière)(40). Par ailleurs les inhibiteurs cérébraux de la ribonucléase qui ont été purifiés chez les autres espèces, présentent une grande similitude de composition avec le PRI (voir Tableau I page 33). Bien sûr, il paraît difficile à partir de ces seuls éléments de dire que la structure de l'inhibiteur de la ribonucléase alcaline cérébrale chez l'homme est proche de celle du PRI; toutefois une corrélation positive entre la structure primaire et la réactivité croisée, vis-à-vis d'un anticorps anti-PRI a déjà été mise en évidence pour les inhibiteurs de la ribonucléase du foie de cinq espèces de mammifères (rat, souris, boeuf, porc, mouton) (42).

Il a déjà été montré qu'un anticorps polyclonal dirigé contre l'inhibiteur placentaire était capable de reconnaître le complexe Enzyme-Inhibiteur, et même de permettre l'expression de l'activité latente de la ribonucléase (105). Le fait que l'inhibiteur soit complexé à la ribonucléase ne semblerait donc pas être un élément gênant pour le marquage par l'anticorps.

Comme aucun marquage n'est apparu sur ces coupes de cerveaux en dépit des différents prétraitements employés, il faut peut-être envisager que dans le cerveau humain, l'inhibiteur de la ribonucléase se trouve dans une

conformation telle, que ses sites antigéniques ne sont pas accessibles à l'anticorps, par les techniques employées dans le cadre de cette thèse. Il se peut également qu'il soit présent en quantité trop faible pour être détecté.

Enfin il faut envisager l'éventualité de sites antigéniques non identiques à ceux de l'inhibiteur placentaire.

Pour les cerveaux provenant de patients décédés de la maladie d'Alzheimer, un dosage de l'activité ribonucléasique dans le cortex frontal et dans le cervelet a été réalisé, le cervelet étant utilisé comme témoin interne. Ces dosages ont été effectués avant et après l'addition de PCMB qui libère l'activité ribonucléasique latente masquée par l'inhibiteur; on peut ainsi en déduire l'activité de l'inhibiteur de la ribonucléase cérébrale alcaline.

Sajdel-Sulkowska et coll.(25), avaient mis en évidence une augmentation de l'activité de la ribonucléase alcaline cérébrale libre dans le cortex de patients décédés de maladie d'Alzheimer; leurs travaux portaient sur 14 cas.

Dans le cadre de cette thèse, 29 cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer ont été étudiés, et l'activité ribonucléasique a été mesurée pour chaque cortex et chaque cervelet. Les études statistiques des résultats obtenus n'ont permis de mettre en évidence aucune corrélation entre le score de Blessed et l'activité de la ribonucléase. L'activité de l'inhibiteur de la ribonucléase cérébrale a été également mesurée, aucune corrélation entre

l'activité de cet inhibiteur et le degré de démence des malades n'a été mise en évidence.

Par ailleurs l'activité de l'inhibiteur est très variable dans le cortex, mais sa valeur dans le cervelet est peu influencée par le degré de démence (fig 6 page 64). Ce résultat serait en accord avec les données morphologiques puisque les lésions caractérisant la maladie d'Alzheimer semblent toujours épargner le cervelet.

Compte tenu des résultats obtenus sur le cervelet ces variations ne peuvent être imputées qu'à des changements dans le cortex frontal lui même et non à des modifications intervenues après la mort du sujet. En effet, comme il n'apparaît pas de corrélation entre le délai post-mortem et le pourcentage d'inhibition, ces variations ne peuvent pas être dues à un début éventuel de protéolyse.

Les travaux effectués par Sajdel-Sulkowska (25) qui avaient inspiré le travail présenté ici, faisaient état d'une baisse des ARN messagers dans le cortex des patients décédés de la maladie d'Alzheimer, ils démontraient parallèlement une augmentation de l'activité ribonucléasique qu'ils attribuaient à une déficience en inhibiteur de la ribonucléase.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ne sont pas en accord avec l'hypothèse proposée par Sajdel-Sulkowska (25). Il faut noter que les études effectuées ici ont porté sur un nombre plus important de cerveaux (29 cerveaux au lieu de 14).

Toutefois les résultats présentés ici ne sont pas les seuls à mettre en doute l'hypothèse proposée par Sajdel-Sulkowska (25). En effet, d'autres travaux sont venus étayer ou infirmer l'hypothèse de Sajdel-Sulkowska.

Il est assez difficile de faire la part des choses, car toutes les études n'ont pas été faites dans les mêmes zones du cerveau. Guillemette et coll. en 1986 (27), n'ont trouvé aucune différence de quantité d'ARN entre les néocortex des cerveaux "Alzheimer" et témoins, mais ils ont remarqué une baisse des ARN à poly-A chez les "Alzheimer". Maschhoff et coll. en 1989 (29) ont analysé le cortex temporal inférieur et le pôle occipital. Ils ont trouvé 59 à 90% d'inhibition (valeur qui par son écart à la moyenne est assez peu précise), et selon eux, la dégradation élevée des ARN dans la maladie d'Alzheimer ne serait pas due à une augmentation de l'activité de la ribonucléase, mais à une "dégradation" de ces ARN liée à l'hypoxie des malades avant le décès. Ils se réfèrent pour cela à des dosages effectués sur des échantillons provenant de cerveaux n'ayant pas subi d'hypoxie avant le décès, et ayant fait l'objet d'un prélèvement rapide post-mortem (28). Pour ces dosages, aucune différence entre la quantité d'ARN présente dans les cerveaux sains et les cerveaux "Alzheimer" n'est apparue. Jones et Knowler, en 1989 (34), ont dosé l'activité ribonucléasique dans différentes parties du cerveau, et en particulier le pôle frontal et le cervelet, ce qui permet de comparer leurs résultats avec les travaux présentés ici. Ces études montrent que dans le cervelet et le pôle frontal,

l'inhibiteur est légèrement plus actif chez le sujet normal que chez le malade, mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les dosages effectués sur les cerveaux "Alzheimer", par rapport aux cerveaux témoins lorsqu'ils considèrent le cerveau dans son ensemble. Enfin Langstrom et coll. (35) ont trouvé une baisse de 40% du rendement en polysomes cytosoliques dans le cortex frontal des patients décédés de maladie d'Alzheimer. Cette baisse du rendement en polysomes pourrait être attribuée à une augmentation de l'activité de la ribonucléase due à une baisse de l'efficacité de son inhibiteur.

Il apparaît donc que l'hypothèse proposée par Sajdel-Sulkowska, étayée par les travaux en tomographie à émission de positron de Bustany (26), reste difficile à confirmer, mais aussi, difficile à infirmer.

D CONCLUSION

Les résultats présentés ici montrent que l'activité de la ribonucléase cérébrale est modifiée dans le cerveau des malades décédés de la maladie d'Alzheimer. Il semble que cette modification de l'activité de la ribonucléase soit due à une modification de l'activité de l'inhibiteur cérébral. Mais la détérioration intellectuelle des patients ne semble pas être uniquement liée à une baisse de l'efficacité de l'inhibiteur. Certains sujets très détériorés mentalement, ont un faible taux d'inhibition, d'autres sujets ne présentant quasiment pas d'atteinte des capacités intellectuelles ont un inhibiteur qui semble parfaitement

actif. Toutefois, certains cas ne suivent pas cette règle, or l'étude présentée ici est effectuée sur un certain nombre de cas qu'il faut considérer dans leur ensemble comme une série, ou comme trois petits groupes.

Par ailleurs, il était attendu des expériences d'immunomarquage (qui n'ont pas pu être réalisées avec succès) une mise en évidence de différences entre les cerveaux "Alzheimer" et les cerveaux témoins. Par exemple un marquage plus faible chez les cerveaux "Alzheimer" aurait pu suggérer une quantité d'inhibiteur plus faible ou une modification des épitopes de tout ou partie des molécules d'inhibiteur. Un marquage identique aurait pu suggérer que l'inhibiteur était présent mais non actif. Dans ce cas il aurait été intéressant de pouvoir déceler en amont les modifications intervenues lors de la synthèse de cette protéine : modifications post-traductionnelles qui n'affecteraient pas les épitopes, mais l'activité de cet inhibiteur de la ribonucléase. Il ne nous est donc pas possible de déterminer si la(les) modification(s) éventuelle(s) de cet inhibiteur de la ribonucléase lors de la maladie d'Alzheimer est(sont) une des causes ou l'une des multiples conséquences de cette maladie d'Alzheimer.

CHAPITRE III

L'INHIBITEUR PLACENTAIRE HUMAIN DE LA
RIBONUCLEASE. ETUDE D'UNE REGION DE CETTE
PROTEINE POSSEDANT UNE ACTIVITE INHIBITRICE

A MATERIELS ET METHODES .

1) Purification de la protéine

a) Obtention des placentas

Les placentas humains ont été obtenus à la maternité de l'hôpital de la Salpêtrière moins d'une demi-heure après l'accouchement. Toutes les manipulations ultérieures ont été réalisées en chambre froide à 4 °C, tous les tampons utilisés contenaient du DTT 5 mM, et de l'EDTA 1 mM (54,55). Chaque placenta a été manipulé séparément.

b) Etape 1 préparation de l'homogénat.

Le placenta débarrassé des membranes, est épongé de manière à éliminer le maximum de sang. Il est ensuite coupé, rincé dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, saccharose 250 mM, puis broyé dans un mixer Sorval à vitesse 10 pendant 90 s en présence du même tampon.

L'homogénat a été centrifugé à 16000 x g pendant 30 min, et le surnageant retenu.

c) Etape 2 et 3 : fractionnement au sulfate
d'ammonium

Le sulfate d'ammonium solide a été ajouté au surnageant obtenu dans l'étape 1, de manière à atteindre 35% de saturation. La suspension a été agitée doucement à 4 °C pendant 1 heure, puis centrifugée à 16000 x g pendant 30 min. Le surnageant recueilli a été amené à 60% de saturation en sulfate d'ammonium, puis agité et centrifugé comme précédemment.

d) Etape 4 : chromatographie d'affinité

le précipité correspondant à un placenta, obtenu après l'étape 3, a été resuspendu dans un tampon phosphate de potassium 45 mM, pH 6,4, puis dialysé contre 20 volumes de ce même tampon pendant 20 heures. La suspension obtenue a été centrifugée à 48000 x g pendant 1 h.

Le surnageant a été chargé sur une colonne de chromatographie d'affinité.

Cette colonne de chromatographie a été préparée de la manière suivante : le support utilisé est le Trisacryl GF 2000 activé à la glutaraldéhyde (IBF) au lieu du Sepharose 4B activé au bromure de cyanogène utilisé par les auteurs (54). Suivant le protocole proposé par le fabricant, 100 mg de ribonucléase pancréatique bovine A (Sigma 5500) ont été ajoutés à 15 ml de Trisacryl GF2000 non décanté. Une colonne d'affinité d'environ 10 ml a été ainsi obtenue.

Les étapes de purification par chromatographie d'affinité sont celles proposées par Blackburn (55).

Après chargement du surnageant, la colonne a été rincée par un tampon phosphate de potassium 45 mM pH 6,4 jusqu'à un retour à la ligne de base.

Un tampon phosphate de potassium 45 mM pH 6,4, NaCl 0,5 M, a d'abord été appliqué pour éliminer les protéines liées de façon non spécifique à la colonne.

Enfin un tampon acétate de sodium 20 mM, pH 5, NaCl 3M et 15% (v/v) en glycérol a été déposé sur la colonne pour éluer l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase.

e) Analyse électrophorétique

La pureté des fractions obtenues a été vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS) avec un gradient de polyacrylamide de 5 à 15% en présence de SDS 0,1% (106).

f) composition en acides aminés

Les analyses d'acides aminés des fractions purifiées par chromatographie d'affinité ont été réalisées sur des hydrolysats de 24 h avec analyseur 119 CL Beckman. Les fractions obtenues après passage en chromatographie liquide haute pression de la protéine digérée par la trypsine ont été hydrolysées 18h et analysées sur un appareil Beckman 121MB. Ces hydrolyses ont été réalisées dans des tubes scellés sous vide à 110 °C dans HCl 6 M, en présence de phénol pour éviter toute dégradation excessive de la tyrosine.

2) Coupures de la protéine (inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase (PRI))

a) Coupures enzymatiques

i) coupure par l'endoprotéase Lys-C

La protéine (4 nmoles) a été hydrolysée par l'endoprotéase LYS-C (Boehringer) pendant 1 h à 37 °C dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5, EDTA 1 mM, en utilisant un rapport enzyme/substrat de 1/20 en poids. L'arrêt de la digestion a été obtenu par abaissement du pH avec de l'acide formique.

ii) Coupure par la chymotrypsine

La protéine (4 nmoles) a été hydrolysée par la chymotrypsine pendant 4 h à 30°C dans un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 5 en utilisant un rapport enzyme /substrat de 1/200 en poids. L'arrêt de la digestion a été obtenu par abaissement du pH avec de l'acide formique.

Les conditions particulières de l'hydrolyse décrites par Ohe et coll.(107), limitent l'action de la chymotrypsine aux liaisons où le groupement α -carboxylé de la tyrosine est engagé.

iii) Coupure par la trypsine

La protéine (16 nmoles) a été hydrolysée par la trypsine (Merck) pendant 4 h à 37 °C dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM pH 8,5, en utilisant un rapport enzyme/substrat de 1/30 en poids. La réaction a été arrêtée par congélation.

b) Coupure chimique

i) Coupure de la protéine à l'acide acétique

La protéine a été hydrolysée par l'acide acétique 0,25 N dans des tubes scellés sous vide pendant 15 heures à 105 °C.

c) Purification des hydrolysats par chromatographie liquide haute pression en phase inverse

Les peptides obtenus par coupure enzymatique ou chimique de la protéine ont été séparés par chromatographie liquide haute pression (CLHP) en phase inverse sur une colonne C18 μ Bondapak (Waters. Millipore) ou ultrapore RPMC (Beckman), en utilisant un gradient d'acétonitrile dans le TFA 0,05%.

d) Contrôle de l'activité inhibitrice des fractions obtenues

i) Dosage avec le poly-C

L'acide polycytidilique (Poly-C) (Pharmacia) a été utilisé comme substrat de la ribonucléase pour mesurer la capacité d'inhibition de la ribonucléase que possédaient les fractions éluées en CLHP.

Après lyophilisation les différentes fractions obtenues ont été reprises par 200 μ l d'eau distillée stérile. Des aliquotes de 20 μ l ont été utilisées pour le dosage de l'inhibition de l'activité de la ribonucléase pancréatique bovine (Sigma) en utilisant la technique décrite

précédemment au chapitre I (101) (voir "Matériels et Méthodes").

3) Utilisation d'une banque d'ADN complémentaire aux ARN de placentas humains

Ce chapitre fait appel à des techniques de base utilisées en biologie moléculaire; les méthodes non référencées sont celles décrites dans le manuel de Maniatis et coll. (108). Les tampons sont précisés page 10.

a) Méthode d'amplification de portion de gènes, ou PCR "Polymerase chain reaction"

i) Purification de l'ADN à partir de la banque d'ADN complémentaire

La banque d'ADN complémentaire aux ARN de placenta humain a été obtenue chez Clontech. Elle possédait des inserts d'ADN d'une longueur moyenne de 1,8 Kb. L'ADN que l'on voulait amplifier mesurait 1,698 Kb.

Pour obtenir une grande quantité d'ADN, des bactéries *Escherichia Coli* de souche Y 1090, sont utilisées pour la multiplication des phages de la banque d'ADN_c. Les phages sont ensuite séparés de l'ADN bactérien par ultracentrifugation en présence de chlorure de Cesium .

L'ADN phagique est obtenu par éclatement des phages en présence de formamide (109).

ii) Sondes nucléotidiques

Les sondes nucléotidiques ont été synthétisées avec un appareil Pharmacia (Gene Assembler).

La séquence de ces sondes devait satisfaire à plusieurs critères :

- Etre capable de se lier à une séquence unique dans le gène.

- Posséder une thymidine en position 3'-Terminale, pour permettre un meilleur rendement lors de leur synthèse.

- Ces sondes doivent avoir une longueur d'environ vingt nucléotides.

- La température d'hybridation des sondes est calculée en fonction du T_m (qui est égal à $4 \times (G+T) + 2 \times (A+C)$).

La séquence des sondes utilisées ainsi que la région du gène avec laquelle elles s'hybrident est représenté dans la figure 8 .

iii) Programme durée/ température, et tampons d'incubation.

Les conditions de dénaturation, d'hybridation, et de polymérisation étaient les suivantes.

Cycle	Dénaturation	Hybridation	Polymérisation
Premier cycle	5 min à 94°C	2 min à 56°C	2 min à 72°C
Cycles 2 à 41	1 min à 94°C	2 min à 56°C	2 min à 72°C
Dernier cycle	1 min à 94°C	2 min à 56°C	10 min à 72 °C

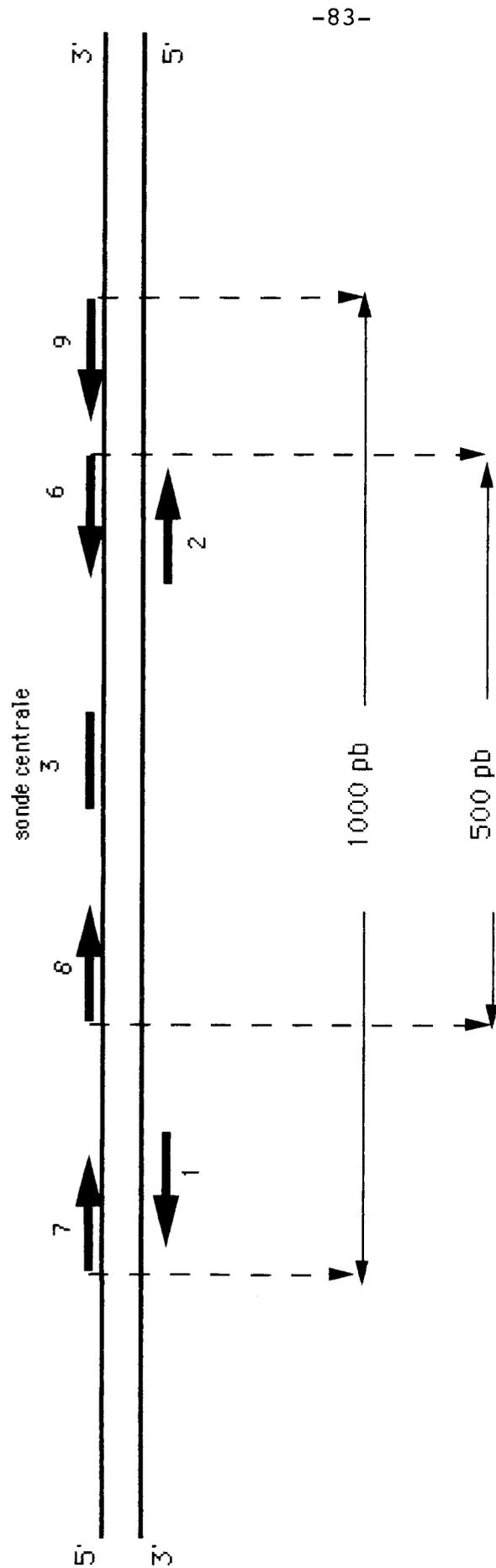


FIGURE 8 gène du PRI avec position des sondes nucléotidiques synthétisées. Les flèches indiquent le sens de synthèse suivi par la Taq polymérase.

La réaction de Pcr a été réalisée dans un tampon d'amplification : (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 15 mM, et 0,01% de gélatine), en présence des 4 nucléotides (1,25 mM chacun), et d'un maximum de 2 µg d'ADN correspondant au gène du PRI.

Pour chaque réaction 100 pmoles de sondes nucléotidiques ont été ajoutées.

iv) Enzyme

L'enzyme utilisée a été la Taq-DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) à 5 unités par µl. Environ 0,5 µl de cette enzyme a été ajoutée au mélange réactionnel préalablement chauffé à 94 °C.

b) Détection des fragments obtenus

i) Gel d'agarose

La taille des fragments amplifiés par PCR a été vérifiée sur gel d'agarose 1,5%, en tampon Tris-Borate-EDTA (TBE), en présence de bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml. Après migration sous un voltage constant de 100 V, en tampon Tris-Borate-EDTA, la taille des fragments obtenus a été observée en plaçant le gel sur une source ultra-violette.

Pour les gels analytiques la longueur d'onde ultra-violette utilisée était de 254 nm.

Pour les gels préparatifs une longueur d'onde de 340 nm, était utilisée. A cette longueur d'onde, l'ADN est moins bien détecté en gel, mais n'est pas endommagé.

ii) "Southern blot"

Une des sondes synthétisée a servi à vérifier par hybridation la nature des fragments amplifiés qui avaient la taille requise. La sonde n°3 qui correspondait à la séquence nucléotidique 751-767, donc en position centrale par rapport aux autres sondes synthétisées, a tout d'abord été marquée radioactivement au ^{32}P . Un marquage en 5' par la kinase a été réalisé en présence de γATP . Les fragments amplifiés présents sur le gel d'agarose ont été transférés sur un filtre de nylon par capillarité en présence de tampon (SSC), et après traitement pour éviter toute fixation non spécifique, la sonde marquée a été mise en contact avec le filtre de nylon. Après lavages, le filtre de nylon a été placé contre un film photographique et celui ci a été développé après une nuit d'exposition.

Les deux autres sondes n°7 et 9 ont également été marquées au ^{32}P , pour détecter les fragments obtenus par amplification des portions 5' et 3' terminales du gène. Deux sondes F et R s'hybridant avec le vecteur dans lequel était inséré le gène du PRI, ont servi de point d'ancrage de l'amplification de part et d'autre du gène inséré.

iii) Clonage dans " Bluescript "

Le vecteur pBS(+/-) dérivé de pUC19 a été utilisé. Il possédait une résistance à l'ampicilline et un gène lac⁺ et des promoteurs T3 et T7 qui permettent d'utiliser ce vecteur pour effectuer une synthèse protéique in-vitro. Une coupure à bouts francs de ce vecteur a été réalisée par l'enzyme de restriction SmaI pendant 4 h à 25 °C dans un tampon (IBI). L'enzyme de restriction a été ensuite détruite par la chaleur (60 °C 10 min). Le fragment de 528 pb a été rendu à bouts francs en utilisant la Klenow (NBL); Une aliquote (1/5), de la réaction de PCR (soit 20µl) a été mis en contact avec la Klenow et les nucléotides triphosphate 10µM dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 30 min à 37 °C. La réaction a été stoppée par addition d'EDTA 10 mM. L'ADN a été précipité 1/4 h à - 20 °C par l'alcool absolu (2 vol) en présence d'acétate d'ammonium 5 M (0,4 vol), puis centrifugé 30 min à 4 °C.

Une ligation réalisée grâce à la ligase T4 (IBI) entre 9 ng du fragment de 528 pb, et 53 ng du vecteur pBS(+/-) de manière à avoir un rapport légèrement supérieur à 1/1 en mole a permis d'obtenir un nouveau vecteur de 3732 pb. Le tampon de ligation est un tampon (IBI) comportant en outre de l'AMP. Le vecteur pBS(+/-) flanqué du fragment de 528 pb a été introduit dans des bactéries *Escherichia Coli* de souche DH₅ α (sensible à l'ampicilline) par électroporation, les bactéries ayant été rendues compétentes auparavant.

La préparation des bactéries a été réalisée de la manière suivante :

* Un demi litre de L broth a été inoculé avec 10 ml de culture de bactéries DH5 α , et laissé se développer jusqu'à obtenir une densité optique de 0,6 unités à 600 nm.

* Après refroidissement sur la glace, les bactéries ont été recueillies par centrifugation, puis le culot a été repris dans 250 ml d'HEPES 1 mM pH 7, froid.

* Les bactéries ont été à nouveau centrifugées, puis reprises dans 10 ml de glycérol 10 % dans l'eau distillée stérile, froid.

* Après une dernière centrifugation, le culot de bactéries "compétentes" a été repris dans 1,25 ml de glycérol 10% froid.

* Des aliquotes de 120 μ l ont été réalisées, puis congelées dans l'azote liquide et conservées à -70°C.

L'électroporation a été réalisée avec un appareil Bio-Rad Gene pulser à 2,5 Kv.

Un contrôle a été réalisé en insérant 200 pg de vecteur pBS(+/-).

Les bactéries ayant inséré le plasmide de 3732 pb ont été repérées par sélection des colonies bleues sur plaque d'agar en présence d'ampicilline. La sélection Bleu/blanc permet de reconnaître les colonies de bactéries qui sont capables, grâce à l'insertion du plasmide, d'hydrolyser le X-gal après induction par l'IPTG (libérant ainsi cette couleur bleue).

Une lyse alcaline suivie d'un gel d'agarose a permis de vérifier la longueur du fragment inséré.

iv) Séquençage de l'ADN

Un microgramme du plasmide de 3732 pb a été séquencé par la méthode de Sanger, en utilisant des sondes externes à l'insert de 528 pb fournies dans un Kit de séquence (U.S.Biochemichs).

c) Expression dans "pGEX"

i) sous clonage

Le vecteur pGEX (AMRAD) a été digéré par l'enzyme de restriction BamHI. Une aliquote a été déposée sur gel d'agarose de manière à confirmer sa linéarisation, puis ce vecteur a été digéré par l'enzyme EcoRI, et le tout a été déposé sur gel d'agarose. La portion du gel contenant le fragment linéarisé possédant ainsi des bouts collants a été excisée et centrifugée dans un tube microfuge (Eppendorf), percé par une aiguille au fond et possédant un culot d'environ 5 mm de laine de verre. Le fragment a donc pu être récupéré dans un autre tube placé en dessous du premier par simple centrifugation à 14000 t/min dans une centrifugeuse de paillasse (Eppendorf) pendant 10 secondes. L'ADN collecté a été précipité par l'alcool absolu en présence d'acétate d'ammonium comme précisé précédemment.

Le fragment de 528 pb a été excisé du vecteur pBS(+/-), par action conjointe de l'enzyme BamHI et EcoRI, le fragment a été recueilli à partir d'un gel d'agarose de la même

manière que le fragment précédent. Le vecteur et le fragment de 528 pb ont été digérés par les mêmes enzymes, ceci permet l'insertion du fragment du gène de l'inhibiteur placentaire dans le vecteur pGEX en phase de lecture.

L'ADN a été purifié par extraction au phénol.

Une ligation a été réalisée comme précisé précédemment, entre le vecteur pGEX, et la portion du gène de l'inhibiteur placentaire humain de ribonucléase, qui recouvre la séquence codant pour le peptide de 15 acides aminés inhibant la ribonucléase A.

ii) Expression de la protéine

Le vecteur pGEX a été choisi pour sa capacité à produire la protéine sous forme d'une protéine de fusion en suivant le protocole proposé par Guan et coll. (110).

Ceci peut être effectué à partir d'un extrait de bactéries de souche TG2 ayant intégré le vecteur pGEX flanqué de la séquence nucléotidique intéressante, par électroporation. L'induction est réalisée par le X-Gal.

Ainsi, la protéine est exprimée, liée à une séquence en acides aminés qui correspond à un site de coupure par la thrombine, lui même lié à la glutathion serine transférase (GST) (fig 9). Une colonne de chromatographie d'affinité préparée en greffant le glutathion sur des billes d'agarose, permet de purifier la protéine de fusion. Une élution de la colonne a été réalisée à l'aide de glutathion réduit.

L'étape suivante consiste normalement en l'excision de la protéine par la thrombine.

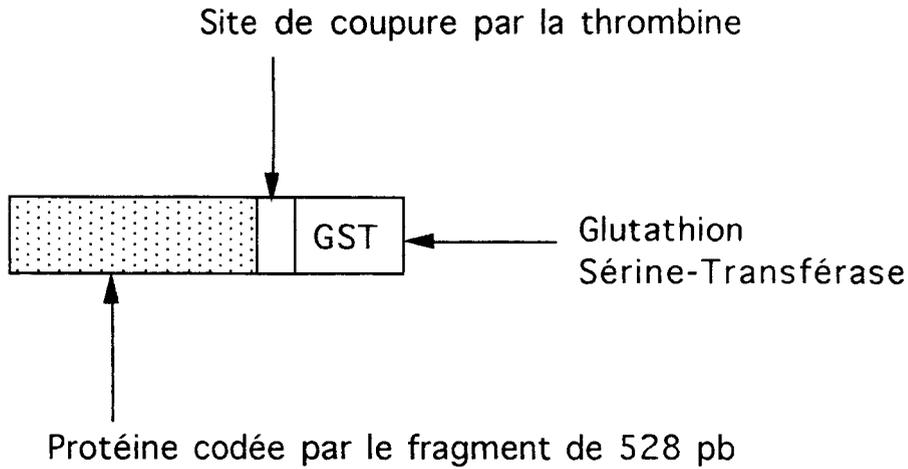


FIGURE 9

Schéma représentant la protéine de fusion obtenue lorsqu'elle est exprimée par les bactéries ayant inséré le vecteur pGEX. La glutathion sérine transférase permet de lier cette protéine de fusion obtenue, à un support de chromatographie d'affinité. La thrombine est ensuite utilisée pour éluer sélectivement la protéine correspondant au fragment de gène inséré dans ce vecteur pGEX.

4) Etude du peptide actif

a) Synthèse et purification du peptide

Le peptide de séquence E-L-S-L-A-G-N-E-L-G-D-E-G-A-R a été synthétisé par Alta Bioscience à l'université de Birmingham en utilisant la chimie FMOC en phase liquide. Le peptide a été purifié en CLHP en phase inverse sur une colonne Ultra sphère IP 5 μm (Beckman), en utilisant un gradient de TFA dans l'acétonitrile. L'absorbance de l'effluent a été mesurée à 214 nm. Les fractions collectées ont été lyophilisées puis reprises par 200 μl d'eau distillée stérile. Les premiers essais d'activité inhibitrice ont été effectués sur des aliquotes de 2 μl en utilisant le Poly-C comme substrat.

La dilution du peptide synthétique a été réalisée dans le tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7. Les essais ultérieurs ont été réalisés en utilisant le CpG comme substrat.

b) Dosage enzymatique

i) Dosage avec le Cytidilyl (3'-5') guanosine (CpG)

Le dinucléotide CpG (Sigma) a été utilisé pour les essais enzymatiques réalisés sur le peptide synthétique. La digestion de ce substrat par la ribonucléase implique la coupure d'une seule liaison phosphodiester, et cette réaction peut être suivie en continu, ce qui permet des études cinétiques approfondies. La dégradation du substrat a été suivie à la longueur d'onde donnant le moins

d'absorption pour le produit obtenu, c'est à dire 245 nm. L'essai a été réalisé avec un spectrophotomètre PHILIPS PU 8720 en utilisant des cuves en quartz de 1 ml ayant 1 cm de trajet optique. Le tampon et le substrat ont été successivement déposés dans la cuvette et mesurés par pesée, l'addition de l'enzyme étant réalisée à l'aide d'une seringue, après différents temps de préincubation avec le peptide. Le tampon et le substrat ont été préincubés également à 30 °C.

Toutes les réactions ont été réalisées dans 1 ml de tampon Tris-HCl 0,1M pH 7, avec des concentrations de substrat (CpG) variant entre 27,5 et 82,5 mM, et une concentration de ribonucléase A de pancréas de boeuf (Sigma), égale à 28 nM. Le peptide synthétique avait une concentration variant de 0 à 12 fM pour les calculs de K_m et de K_i , pour toutes les autres réactions (réversibilité, influence de la préincubation, influence du pH, effet du NaCl et effet des ions divalents), la concentration du peptide était de $3,7 \times 10^{-15}$ M.

Des solutions 1M de $CaCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$ et $CuSO_4$ ont été préparées, puis stérilisées par passage sur des filtres Acrofiltres $0,22\mu m$ (Pharmacia). Différentes concentrations de ces solutions ont été ajoutées à la réaction, de manière à obtenir des concentrations variant entre 0 et 30mM.

Il faut préciser que le pH utilisé dans cet essai (pH 7), n'est pas le pH d'activité optimale de la ribonucléase (voir résultats) : Il en résulte que dans ces

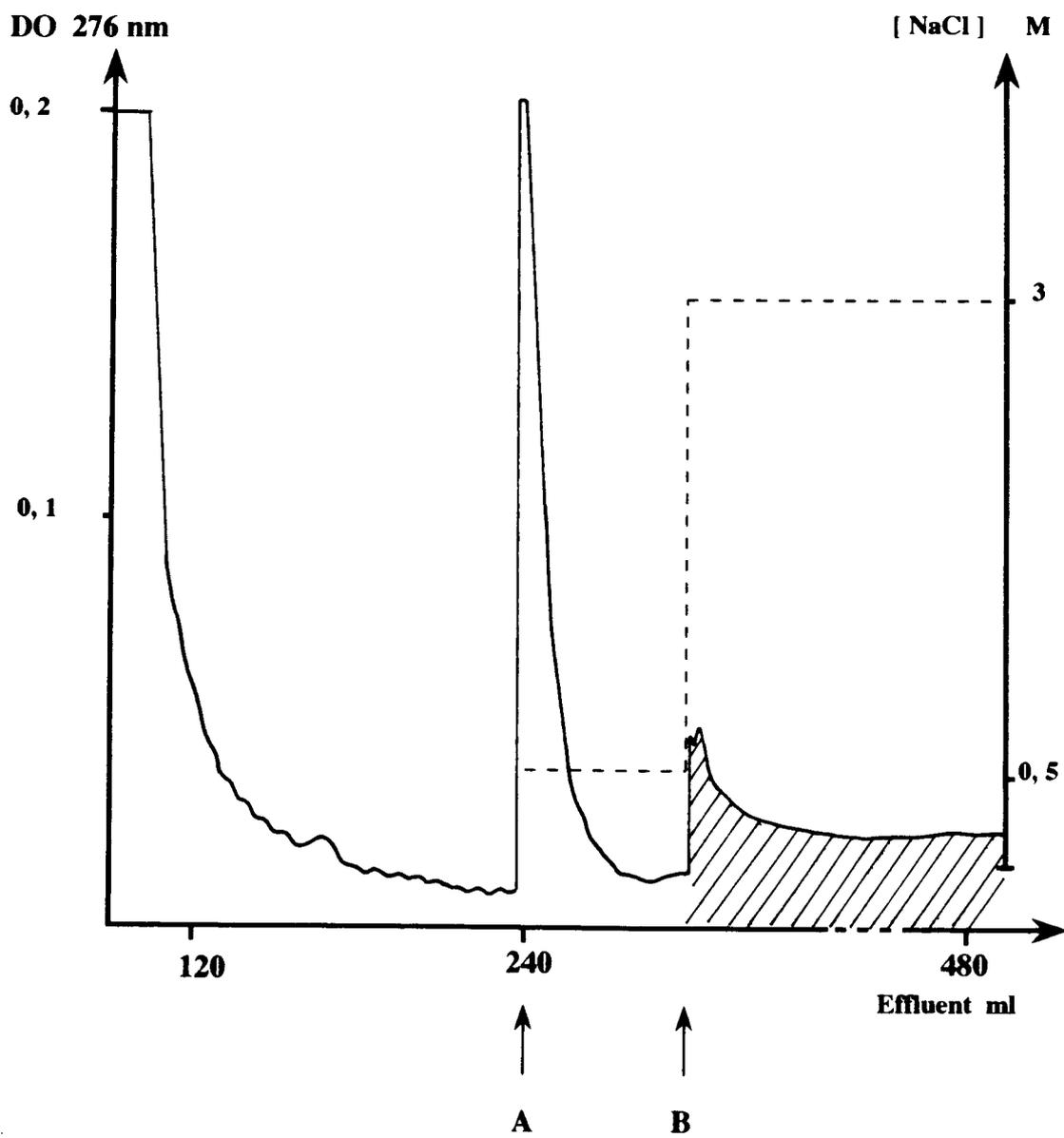
conditions l'activité ribonucléasique mesurée sur une période de deux minutes peut être considérée comme linéaire, ce qui permet ainsi une mesure précise de la vitesse initiale. La vitesse de réaction est mesurée en différence d'absorbance par minute, chaque essai étant réalisé sur deux minutes. La concentration du substrat est inférieure au Km.

B RESULTATS

1) Purification de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase

a) Chromatographie d'affinité

Le passage de l'extrait placentaire sur colonne d'affinité permet d'éliminer dans un premier temps toutes les protéines qui n'ont pas ou peu d'affinité pour la ribonucléase, en utilisant pour l'élution un tampon phosphate de potassium 45 mM, NaCl 0,5 M, pH 6,4. L'inhibiteur placentaire est ensuite élué par un tampon acétate de sodium 0,5 M pH 5, NaCl 3M, Glycérol 15% (v/v). (fig 10). Son élution lente qui se traduit par une traînée importante peut s'expliquer par la très grande affinité de l'inhibiteur pour la ribonucléase pancréatique bovine ($K_i \sim 10^{-15}$ M (57)). Cet inhibiteur est obtenu pur comme le montre l'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de SDS (fig 11)



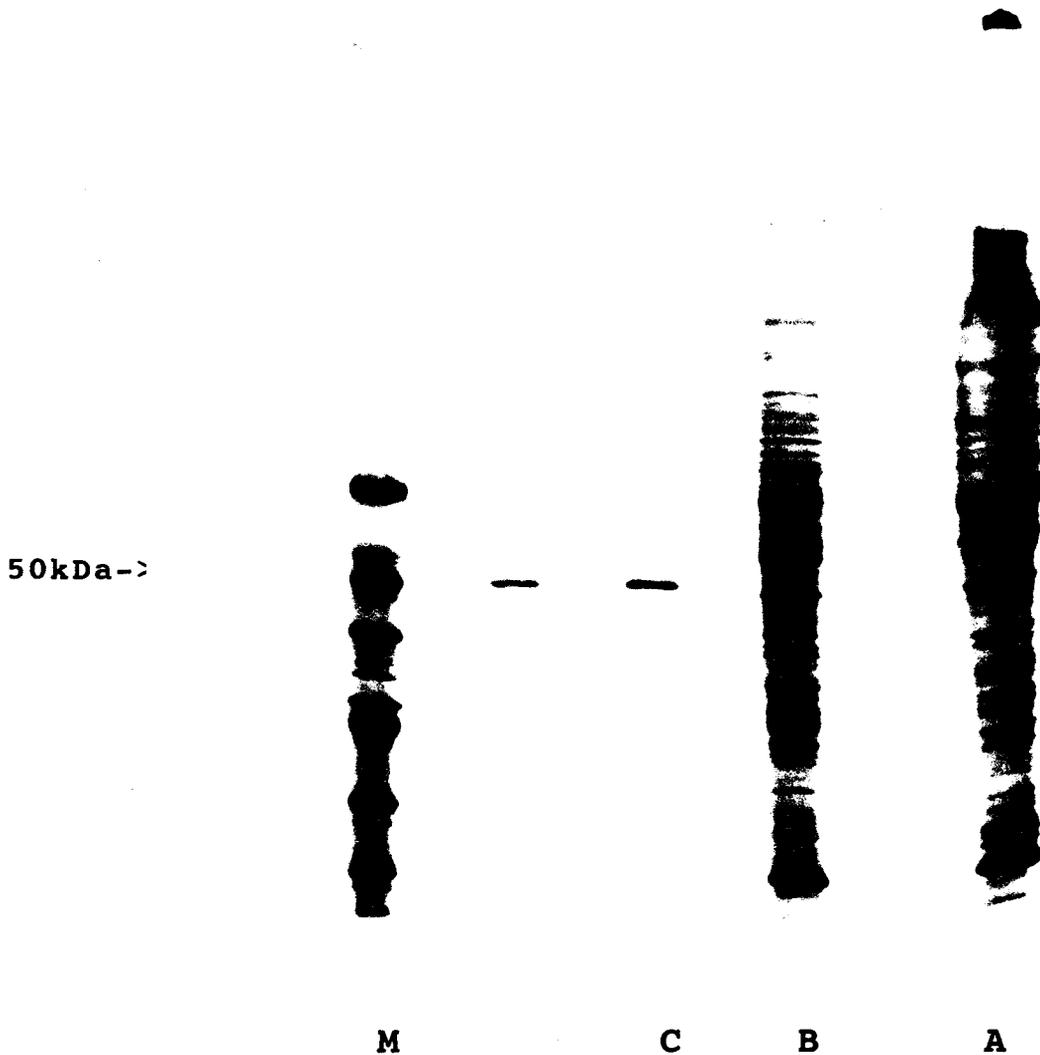


FIGURE 11

Electrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient de 5 à 15%), en présence de SDS, des fractions obtenues lors de la purification de l'inhibiteur placentaire. En **M**: marqueurs de masse moléculaire,

A : homogénat de placenta humain, **B** : fraction 35 à 60% en sulfate d'ammonium déposée sur la colonne de chromatographie d'affinité, **C** : inhibiteur placentaire de ribonucléase élué de la colonne de chromatographie d'affinité.

b) Caractérisation de l'inhibiteur.

La masse moléculaire (50 ~ kDa), estimée après électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, l'activité inhibitrice vis-à-vis de la ribonucléase pancréatique bovine, ainsi que la composition en acides aminés ont permis de montrer que la protéine ainsi isolée correspondait bien à l'inhibiteur de la ribonucléase décrit par Blackburn et coll.(54) .

2) Fragmentation de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase; analyse enzymatique des fragments obtenus après purification par CLHP

a) Coupure par l'acide acétique

La protéine contenant 47 ASX, c'est à dire acide aspartiques et (ou) asparagines, il paraissait intéressant d'utiliser l'acide acétique 0,25 N; celui ci permet une "énucléation" de l'acide aspartique en hydrolysant les liaisons peptidiques de chaque côté de cet acide aminé qui est donc libéré.

Un grand nombre de peptides était attendu (fig 12). L'hydrolysat a été déposé sur une colonne C18 μ Bondapak et la figure 13 correspondant au diagramme d'élution montre que la protéine a certainement été coupée en de nombreux points, mais les différents peptides obtenus n'ont pas été bien séparés lors de la chromatographie.

S L (D) I Q S L (D) I Q C E E L S (D) A R W A E L L P L L Q Q C Q V V R - -
 L (D) (D) C G L T E A R C (K) (D) I S S A L R V N P A L A B L N L R S N E L G (D) V G V H C V L Q G L Q T P S C (K) I Q (K) L S
 L Q N C C L T G A G C G V L S S T L R T L P T L Q E L H L S (D) N L L G (D) A G L Q L L C E G L L (D) P Q C R L E (K) L Q
 L E Y C S L S A A S C E P L A S V L R A (K) P (D) F (K) E L T V S N N (D) I N E A G V R V L C Q G L (K) (D) S P C Q L E A L (K)
 ...150...
 L E S C G V T S (D) N C R (D) L C G I V A S (K) A S L R E L A L G S N (K) L G (D) V G M A E L C P G L L H P S S R L R T L W
 I W E C G I T A (K) G C G (D) L C R V L R A (K) E S L (K) E L S L A G N E L G (D) E G A R L L C E T L L E P G C Q L E S L W
 V (K) S C S P T A A C C S H F S S V L A Q N R P L L E L Q I S N N R L E (D) A G V R E L C Q G L G Q P G S V L R V L W
 L A (D) C (D) V S (D) S S C S S L A A T L L A N H S L R R L (D) L S N N C L G (D) A G I L Q L V E S V R Q P G C L L E Q L V
 L Y (D) I Y W S E E M E (D) R L Q A L E (K) (D) (K) P S L R V I S
 ..434...437...

FIGURE 12

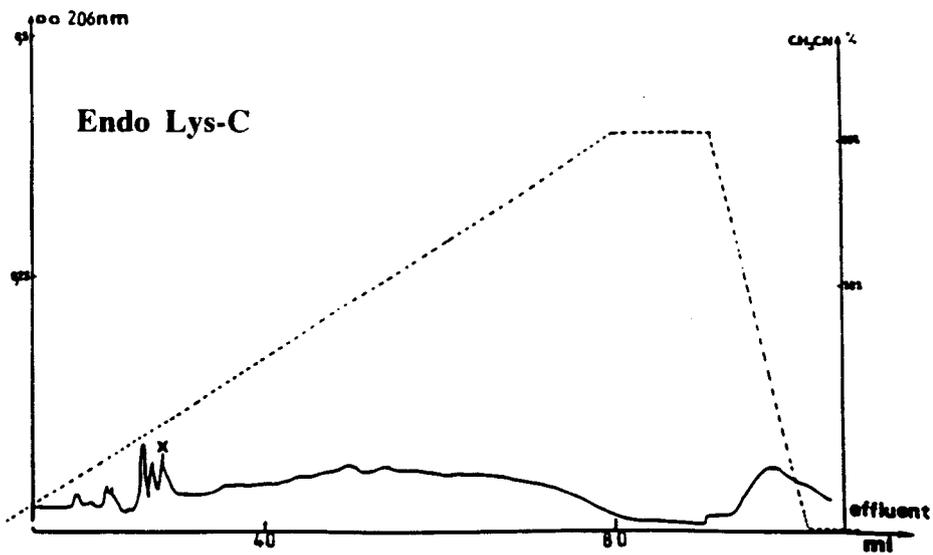
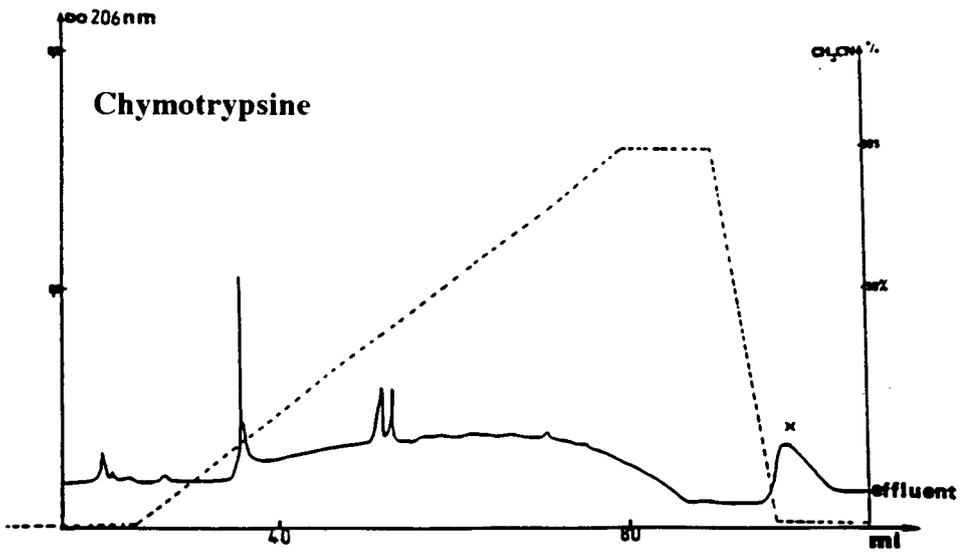
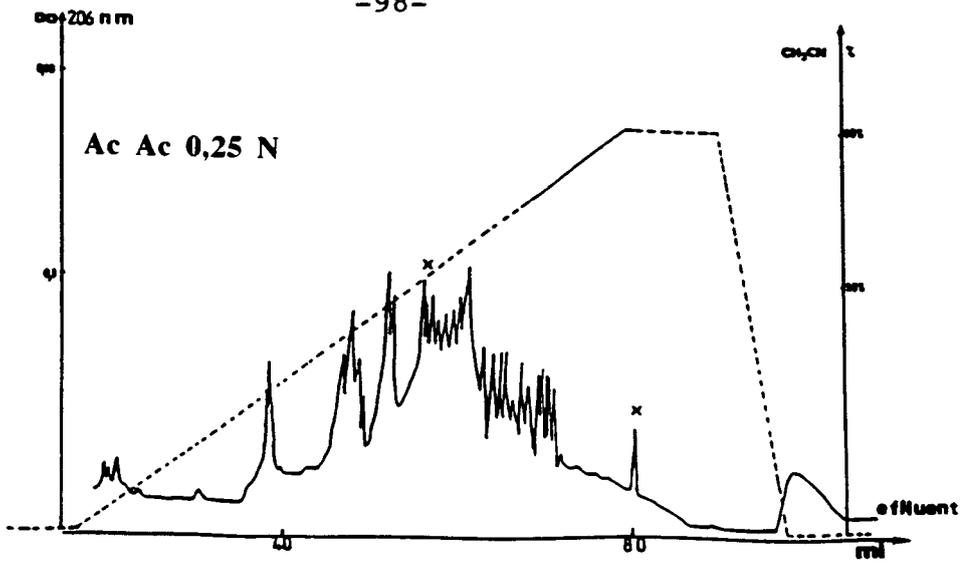
Séquence de l'inhibiteur placentaire de ribonucléase.

Position des différents résidus impliqués dans les coupures chimiques et enzymatiques utilisées.

...y.... Emplacement des résidus de tyrosine, coupés en C-terminal par la chymotrypsine.

les résidus d'acide aspartique, énucléés par l'acide acétique 0,25N, sont entourés de vert.

Les résidus de Lysine, coupés en C-terminal par l'endoprotéinase Lys-C sont entourés de rouge.



Au vu de la séquence de cet inhibiteur placentaire de la ribonucléase qui a été publiée ultérieurement (57), la protéine contient 27 acides aspartiques. Certains d'entre eux étant très proches l'un de l'autre, des peptides très petits ont pu être obtenus (fig 12). L'énucléation des acides aspartiques n'a peut être pas été totale et l'allure du diagramme obtenu à la sortie de chromatographie pourrait être due à l'obtention de peptides ayant des séquences en acides aminés voisines et donc des taux de rétention très proches.

Une deuxième explication pour l'obtention de ce type de diagramme pourrait être la longueur du gradient d'acétonitrile qui a servi à faire l'élution : (0 à 80% en 80 min). En effet un gradient d'acétonitrile beaucoup plus long (0 à 40% en 3 h) a du être employé pour obtenir une séparation efficace des peptides trypsiques (voir § d). Après coupure de la protéine par l'acide acétique, certaines fractions se sont avérées actives en étant capable d'inhiber la ribonucléase. Mais compte tenu du faible pourcentage de digestion de la protéine obtenu, le pic actif élué en fin de gradient n'était pas présent en quantité suffisante pour permettre une détermination de la composition en acides aminés. Ceci aurait peut être pu nous permettre de faire une comparaison avec le peptide actif dont il sera question ultérieurement.

b) Digestion limitée par la chymotrypsine à pH 5

A pH 5 qui n'est pas le pH optimum d'activité de la chymotrypsine, seules les liaisons tyrosyles sont coupées (107). Compte tenu de la présence de trois résidus de tyrosine dans la séquence de la protéine (57), 4 peptides étaient attendus, (fig 12): peptide 1-150, peptide 151-434, peptide 435-437 et peptide 437-460.

En fait trois pics ont été obtenus lors de la chromatographie (fig 13). Aucune de ces fractions ne s'est montrée active vis-à-vis de la ribonucléase. En revanche les fractions éluées après la fin du gradient d'acétonitrile, ont montré une faible activité inhibitrice vis-à-vis de la ribonucléase.

c) Digestion par l'endoprotéinase Lys-C

Compte tenu de la composition en acides aminés de la protéine, un maximum de 18 peptides pouvaient être obtenus. La présence de 16 résidus de lysine dans la séquence de l'inhibiteur laissait prévoir l'obtention de 17 peptides, par hydrolyse de la protéine avec l'endoprotéinase Lys-C (fig 12). Le diagramme d'élution en CLHP (fig 13) ne fait apparaître que quatre peptides; l'un d'entre eux présente une activité inhibitrice vis-à-vis de la ribonucléase. Le petit nombre de fractions obtenues par rapport au nombre attendu suggère que la protéine n'a pas été digérée de façon optimale par l'endoprotéinase Lys-C.

Les difficultés rencontrées pour solubiliser la protéine dans les différents milieux utilisés pour les coupures chimiques et enzymatiques ont fait qu'un faible pourcentage de la protéine a été hydrolysé. Ceci a empêché toute étude approfondie des fractions actives obtenues.

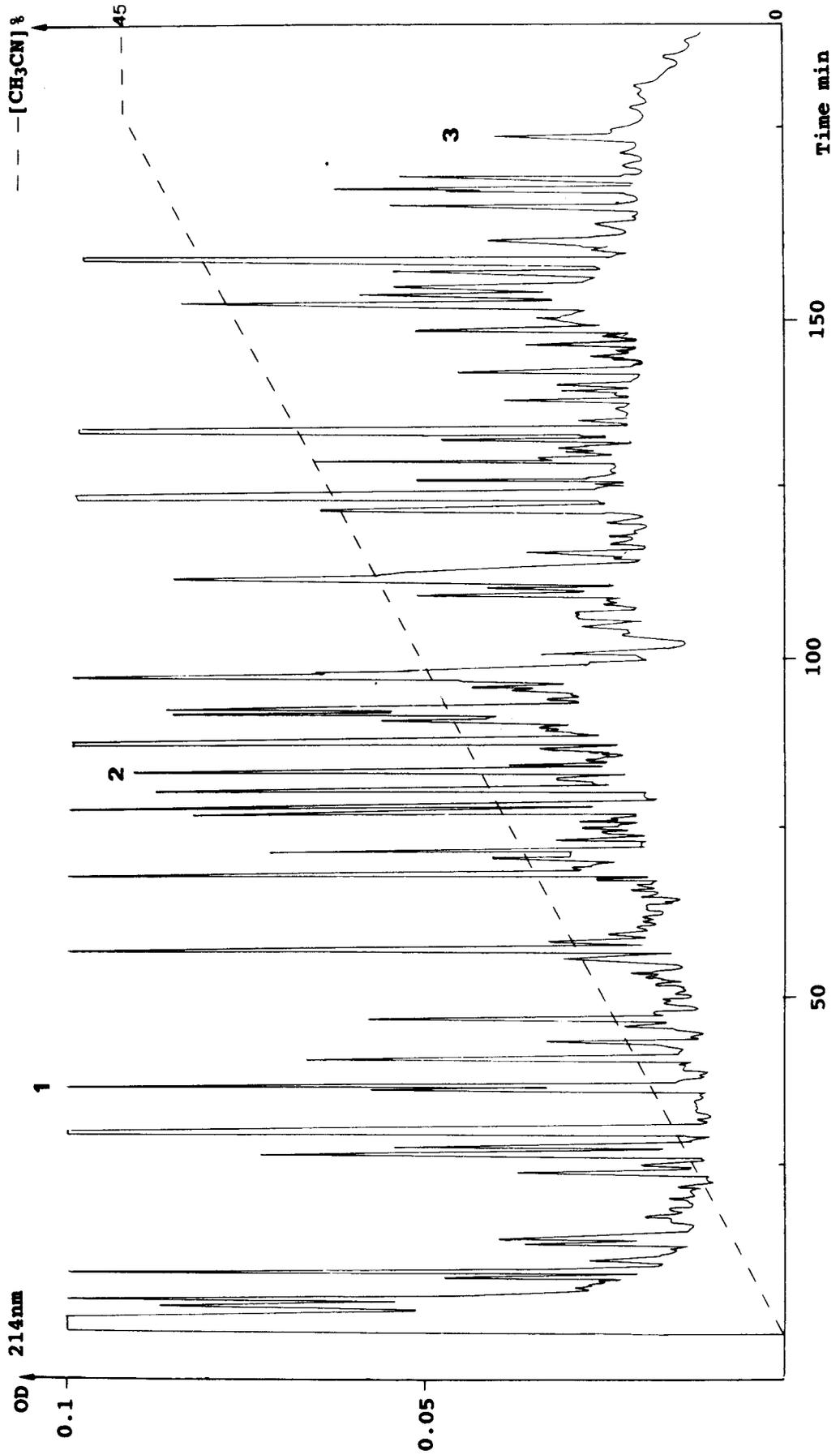
d) Digestion par la trypsine

Compte tenu du nombre de lysines et d'arginines présentes dans la protéine, cette coupure avait été évitée à priori, par crainte d'obtenir un trop grand nombre de peptides difficiles à séparer en CLHP.

Le fractionnement de l'hydrolysate tryptique par CLHP en phase inverse nous a permis d'obtenir 44 fractions (fig 14). D'après la séquence de la protéine 41 peptides étaient attendus (fig 15) Leur activité a été testée en utilisant le Poly-C comme substrat (voir "Matériels et Méthodes").

Trois fractions se sont révélées actives.

Une analyse de la composition en acides aminés de ces fractions, suggère que les fractions 1 et 2 ne sont pas pures. Toutefois la fraction 1 a une composition en acide aminé très similaire à la séquence 173-194, qui correspond à deux peptides adjacents, la coupure après l'Arginine en 187 n'ayant apparemment pas eu lieu (Tableau VI). En ce qui concerne la fraction 3 dont l'activité inhibitrice est plus importante que celle des deux autres fractions, sa composition en acide aminés laisse penser que cette fraction correspond à un peptide tryptique pur (le peptide 287-301) : (tableau VII)



SLDIQSLDIQCEELSDARWAELLPLLQQCQVVR --
 ----->----->
 LDDCGLTEARCKDISSALRVNPALAE LNLR SNELGDVGVHCVLQGLQTPSCKIQKLS
 ----->----->----->----->----->----->
 LQNCCLTGAGCGVLSSTLRTLPTLQELHLS DNLLGDAGLQLLCEGLLDPQCRLEK LQ
 ----->----->----->----->----->----->
 LEYCSLSAASCEPLASVLR AKPDFKELTVS NNDINEAGVRVLCQGLKDSPCQLEALK
 ----->----->----->----->----->----->----->
 -----173-194----->----->
 LESCGVTS DNCRDL CGIVASKASLRELALGSNKLGDVGMAELCPGLLHPSSRLRTLW
 ----->----->----->----->----->----->----->
 I WECGITAKGCGDL CRVLR AKESL KELS LAGNELGDEGARLLCETLLEPGCQLES LW
 ----->----->----->----->----->----->----->
 -----287-301----->----->
 VKSCSFTAACCSHFSSVLAQNRFLLELQISNNRLEDAGVRELCQGLGQPGSVLRVLW
 ----->----->----->----->----->----->----->
 LADCDVSDSSCSLAATLLANHSLRELDLSNNCLGDAGILQLVESVRQPGCLLEQLV
 ----->----->----->----->----->----->----->
 LYDIYWSEEMEDRLQALEKDKPSLRVIS
 ----->----->----->----->----->----->----->

FIGURE 15

Séquence de l'inhibiteur placentaire de ribonucléase.
 -> : sites potentiels de coupure de l'inhibiteur par la trypsine.
 Les peptides correspondant aux fractions 1(173-194) et 3(287-301) sont précisés.

TABLEAU VI

Composition en acides aminés de la fraction 1 isolée par CLHP en phase inverse après hydrolyse trypsique de l'inhibiteur placentaire de ribonucléase.

La composition en acides aminés du peptide de séquence 173-194, est également présentée.

FRACTION ACTIVE 1		PEPTIDE 173-194
LYS	0,9	1
ASP	2	4
THR	0,7	1
SER	2,2	1
GLU	2,8	3
GLY	2,2	2
ALA	0,7	1
VAL	0,3	3
LEU	1,6	3
ARG	1	1
CYS	non dosé	1
ILE	0	1

TABLEAU VII

Composition en acides aminés de la fraction 3 isolée par CLHP en phase inverse après hydrolyse trypsique de l'inhibiteur placentaire de ribonucléase. La composition en acides aminés du peptide de séquence 287-301 qui présente une activité inhibitrice vis-à-vis de la ribonucléase A, est également présentée. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus par mole de peptides.

FRACTION ACTIVE 3		PEPTIDE 287-301
ASP	2,5	2
SER	2,6	1
GLU	3,8	3
GLY	5,1	3
ALA	1,8	2
LEU	2,3	3
ARG	1	1

Si on représente la séquence de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase en faisant apparaître les unités répétitives qui la caractérisent (fig 16), on peut remarquer que les peptides présents dans les fractions 1 et 3, qui ont été isolées par digestion trypsique recouvrent largement deux de ces unités répétitives, et par conséquent la séquence consensus proposée. Par ailleurs, des mutants de cette protéine présentant des délétions dans la structure primaire ont été obtenus par mutagenèse dirigée, (92,93); et il semble bien que cette région de l'inhibiteur joue un rôle important dans son activité (voir discussion). Les éléments en faveur d'un rôle de ce segment de protéine dans l'activité de l'inhibiteur semblant se recouper, une étude plus approfondie du peptide présent dans la fraction n° 3 était nécessaire. Ce peptide étant de taille relativement réduite (15 acides aminés), on pouvait l'obtenir par sa synthèse chimique en grande quantité.

S L D I Q S L D I Q C E E L S D A R W A E L L P L L Q Q C Q V V R - -
 L D D C G L T E A R C K D I S A L R V N P A L A E L N L R S N E L G D V G V H C V L Q G L O T F S C K I Q K L S
 L Q N C C L T G A G C G V L S S T L R T L P T L Q E L H L S D N L L G D A G L Q L L C E G L L D P Q C R L E K L Q
 L E Y C S L S A A S C E P L A S V L R A K P D F K E L T V S N N D I N E A G V R V L C Q G L K D S P C Q L E A L K
 L E S C G V T S D N C R D L C G I V A S K A S L R E L A L G S N K L G D V G M A E L C P G L L H F S S R L R T I W
 I W E C G I T A K G C G D L C R V L R A K E S L K E L S L A G N E L G D E G A R L L C E T L L E F P G C Q L E S L W
 V K S C S F T A A C C S H F S S V L A Q N R F L L E L Q I S N N R L E D A G V R E L C Q G L G Q P G S V L R V L W
 L A D C D V S D S S C S S L A A T L L A N H S L R E L D L S N N C L G D A G I L Q L V E S V R Q P G C L L E Q L V
 L Y D I Y W S E E M E D R L Q A L E K D K P S L R V I S

L - - C - - T - A - C - - L - S - L R - - - - L - E L - L S - N - L G D A G - - - L C - G L - - P - C - L E - L -

FIGURE 16

Séquence de l'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase. Les 7 unités répétitives sont alignées. Les résidus identiques présents au moins 4 fois sur 7 dans les unités répétitives sont encadrés. La séquence consensus est également représentée. D'après Lee et Vallee (57).
 Les deux peptides de séquence 173-194 et 287-301 sont soulignés.

3) Etude cinétique d'un peptide isolé par coupure trypsique qui présente une activité inhibitrice vis-à-vis de la ribonucléase.

a) Etude du type d'inhibition.

Puisque l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase possède un K_i très faible pour la ribonucléase pancréatique bovine, il est intéressant de voir si ce peptide de 15 acides aminés possède des caractéristiques enzymatiques comparables à celles de la protéine dont il semble mimer l'activité. Si pour vérifier l'activité inhibitrice des fractions chromatographiques, l'essai enzymatique utilisant le Poly-C comme substrat est suffisant (voir "Matériels et Méthodes"), il s'avère que ce type de dosage ne permet pas une grande exactitude lorsque l'on désire mesurer des paramètres cinétiques; en effet la complexité du protocole opératoire rend l'essai peu précis si l'on veut travailler sur des temps très courts. D'autre part la digestion du substrat (le Poly-C) par la ribonucléase, implique la coupure de nombreuses liaisons phosphodiester, et ceci peut parfois fausser légèrement les résultats. Un autre substrat a donc été choisi pour étudier ce peptide (voir Matériels et méthodes); il s'agit d'un substrat comportant une seule liaison phosphodiester, le CpG dont la digestion peut être suivie en continu.

Les mesures de la vitesse de réaction en fonction de la quantité de substrat, avec et sans le peptide, permettent de tracer une courbe suivant le modèle de Lineweaver-Burk (fig17)

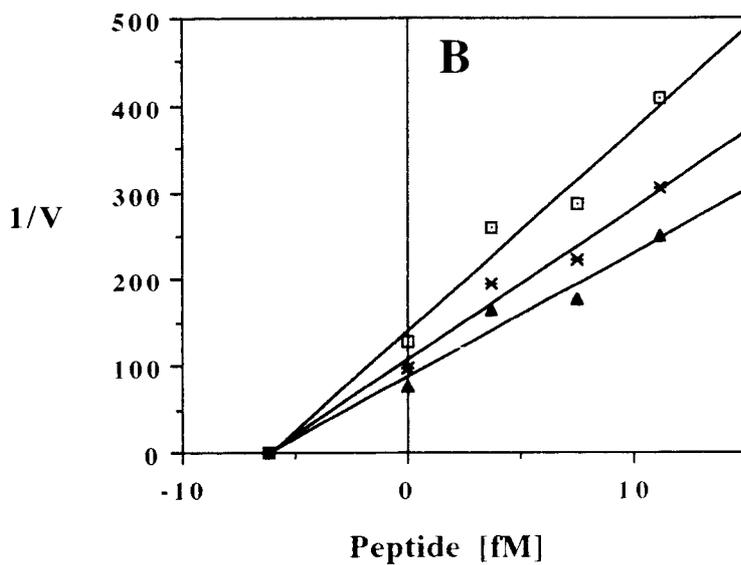
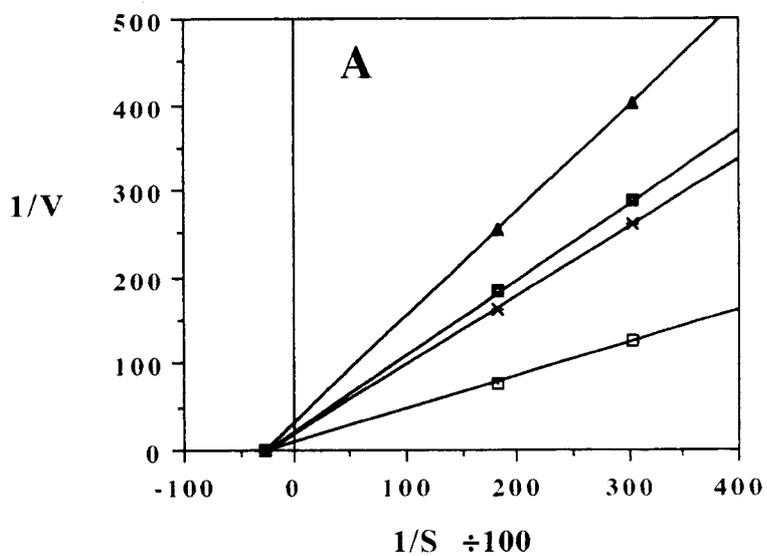


FIGURE 17

Le K_m obtenu pour ce substrat vis-à-vis de la ribonucléase pancréatique bovine est de 0.36×10^{-3} M, et ce graphique met en évidence une inhibition de type non-compétitif du peptide vis-à-vis de la ribonucléase. Une représentation de ces résultats selon le modèle de Dixon, donne un K_i pour ce peptide de 6×10^{-15} M, cette valeur est du même ordre que celle du K_i de la protéine native, puisque des dosages de "tight-binding inhibition" de la ribonucléase pancréatique bovine par l'inhibiteur placentaire ont mis en évidence un K_i de 44×10^{-15} M (59).

La méthode de détermination de ce K_i est différente de celle utilisée dans le cadre de cette thèse. En effet les dosages enzymatiques présentés ici doivent être considérés comme faisant partie d'une étude préliminaire de l'activité de ce peptide, car paradoxalement l'interprétation des résultats doit être modulée en fonction de leur contenu. Le K_i trouvé est très faible par rapport au K_m , et dans le cas de liaison très fortes de l'inhibiteur (tight-binding inhibition) la représentation selon Lineweaver-Burk aboutit toujours à la détermination d'un type d'inhibition non-compétitif (61,62) (voir discussion).

b) Réversibilité de l'interaction peptide/ ribonucléase.

Lors des dosages successifs il est apparu qu'en présence du peptide, la réaction enzymatique continuait à se dérouler lentement (fig 18 A). Ceci montre que le peptide inhibe la ribonucléase en freinant la réaction plutôt qu'en la

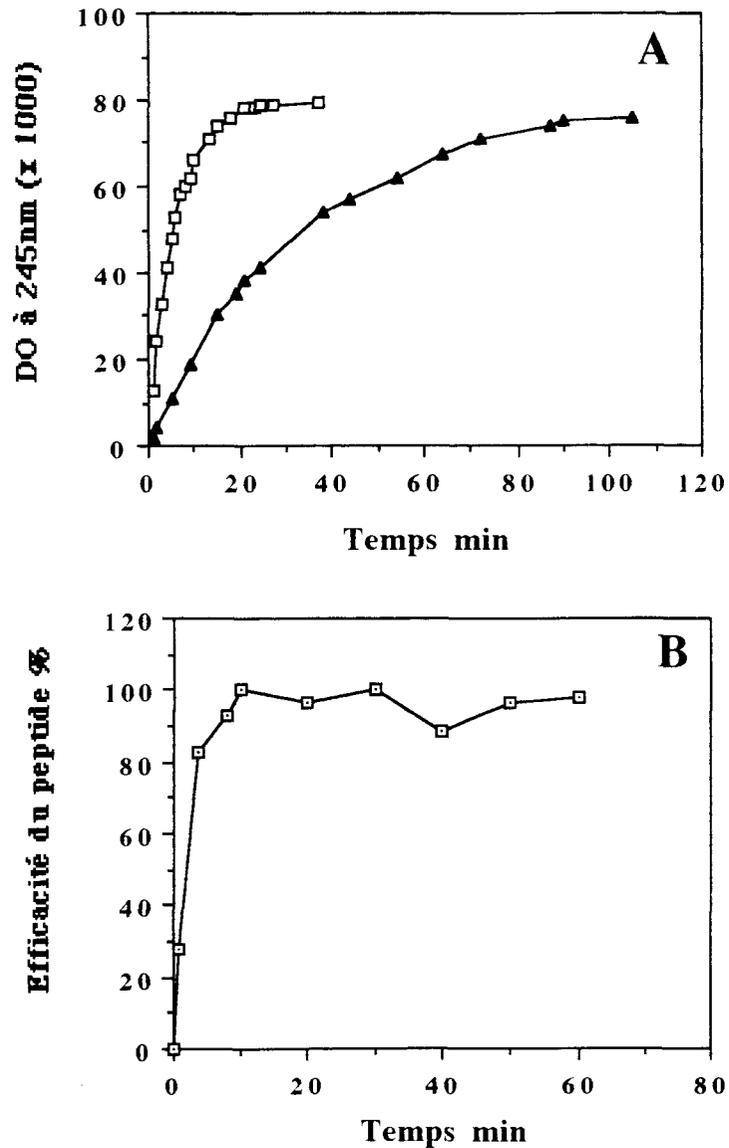


FIGURE 18

A : réversibilité de inhibition exercée par le peptide sur la ribonucléase. L'expérience est effectuée comme décrit dans Matériels et Méthodes. La réaction est réalisée sans peptide (□), et avec $3,7 \times 10^{-15}$ M de peptide (▲).

B : Effet du temps de préincubation. La réaction est réalisée comme décrit dans Matériels et Méthodes, mais la ribonucléase a été préincubée différentes durées.

bloquant totalement. Dans des conditions standard, la ribonucléase préincubée avec le peptide perd 70% de son activité. Sur ce diagramme on voit qu'il faut à la ribonucléase préincubée en présence du peptide, environ trois fois plus de temps pour atteindre son plateau d'activité. Ceci semble donc en accord avec le pourcentage d'inhibition. En effet si la ribonucléase est trois fois moins active, il lui faudra trois fois plus de temps pour libérer la même quantité de produit. Il a été vérifié que l'activité de l'enzyme reste constante au cours de la réaction.

c) Influence du temps de préincubation

Il a été démontré pour la protéine intacte qu'un temps de préincubation avec la ribonucléase était nécessaire (54). Il était donc intéressant de voir si pour un segment plus petit, la qualité de l'inhibition pouvait être influencée par cette préincubation avant tout dosage de l'activité. Le peptide a donc été préincubé avec la ribonucléase pendant des temps croissants, une minute étant le temps minimum techniquement réalisable (fig 18 B). Sur ce diagramme l'efficacité du peptide est représentée en ordonnée, 100% d'efficacité représente donc le maximum d'activité inhibitrice du peptide que l'on puisse obtenir, c'est à dire environ 70% d'inhibition. On note que le peptide requiert environ 8 à 10 minutes de préincubation pour être actif à 100%, mais qu'un temps de mise en contact plus long

n'améliore pas la qualité de l'inhibition. Ceci est à mettre en relation avec le type d'inhibition du peptide.

Si les premières études cinétiques sur le PRI lui avaient attribué une inhibition de type non-compétitive (59), des études plus récentes utilisant d'autres techniques de dosage ont fait apparaître une inhibition compétitive. (voir discussion).

d) Influence du pH

Nous avons utilisé pour cette étude un tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7 dans une zone de pH comprise entre pH 5,3 et pH 9, et la réaction réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, avec ou sans peptide en faisant varier seulement le pH. La solution Tris-HCl n'ayant plus d'effet tampon en deça de pH 5,3, aucun autre tampon n'a été choisi pour des valeurs plus basses de pH sachant que d'une part le pic d'activité de la ribonucléase était atteint, et que d'autre part, un changement de tampon aurait fait intervenir des paramètres différents de ceux étudiés ici.

Comme on peut le voir sur la figure 19 A, le pH optimum d'activité de la ribonucléase dans les conditions utilisées ici est de 5,7. Dans les conditions standard, la réaction s'effectue à pH 7. Ainsi la ribonucléase n'étant pas dans des conditions optimales, la réaction peut être linéaire pendant les deux premières minutes. La vitesse de réaction est calculée à partir des droites obtenues lors du dosage au spectrophotomètre en continu.

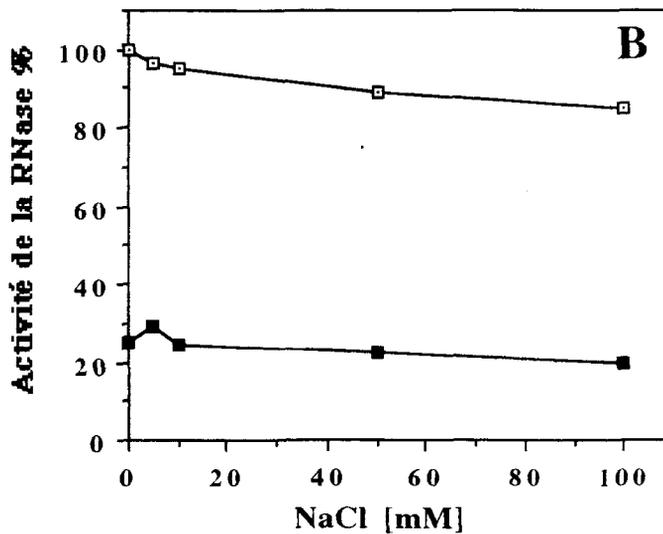
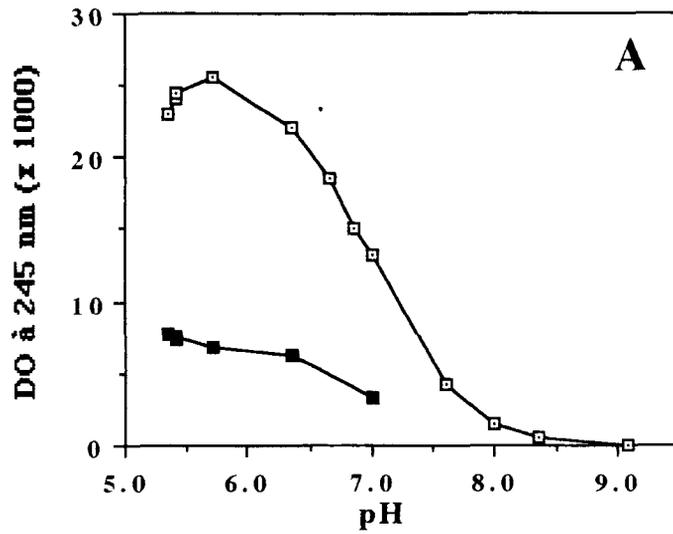


Figure 19

A : Influence du pH sur l'activité de la ribonucléase, et sur l'action du peptide sur l'enzyme.

B : Influence de la concentration en NaCl sur l'activité de la ribonucléase et du peptide.

Les conditions d'incubation sont précisées dans "Matériels et Méthodes". Réactions réalisées sans peptide (□), en présence de peptide (■).

L'activité de la ribonucléase croît entre pH 5,3 et pH 5,9, puis décroît jusqu'à atteindre une valeur nulle à pH 9. En présence du peptide l'activité de l'enzyme semble suivre une légère décroissance au fur et à mesure de l'augmentation de pH, indiquant que l'interaction entre le peptide et la ribonucléase ne semble pas modifiée par une variation du pH du tampon.

Une variation du pH de 5,5 à 8,5 a déjà été rapportée comme ne modifiant presque pas l'effet inhibiteur de la protéine intacte sur la ribonucléase (86). Sur ce point, le peptide se comporterait de manière identique à la protéine native lors de variations de pH. (L'influence de la concentration en NaCl qui est représentée sur cette figure 19 est précisée au § f).

e) Effet de certains ions divalents

La réaction d'inhibition est réalisée dans des conditions standard, en présence de différents ions divalents : le calcium (CaCl_2), le manganèse (MnCl_2), le magnésium (MgCl_2), le zinc (ZnCl_2) et le cuivre (CuSO_4).

Le cuivre semble inhiber la ribonucléase, mais ceci n'a pu être étudié de façon approfondie, car la solution de sulfate de cuivre interfère avec l'essai utilisé et peut fausser l'interprétation des résultats. Toutefois il a déjà été démontré (111) que le cuivre, de par son affinité pour les groupes imidazole, inhibe la ribonucléase, ceci pour des concentrations similaires à celles utilisées ici. L'effet du

cuivre sur les interactions entre le peptide et la ribonucléase n'a donc pu être étudié.

Les résultats concernant l'effet du calcium et du manganèse sont présentés sur un même graphique, car ils jouent un rôle similaire (fig 20 A). Aux concentrations utilisées ici (0 à 30 mM), le calcium et le manganèse n'affectent pas beaucoup l'activité de la ribonucléase; bien qu'à 30 mM on observe néanmoins en présence de manganèse environ 35% d'inhibition. Il est intéressant ici, de voir qu'en présence de ces ions, l'action inhibitrice du peptide vis-à-vis de la ribonucléase est considérablement réduite. On constate même une augmentation de l'activité de la ribonucléase en présence du peptide, lorsque sont ajoutées des concentrations faibles (5 mM) de calcium ou de manganèse. L'inclinaison de l'activité de l'enzyme en présence du peptide, notée lors de l'augmentation de la concentration des ions Ca^{++} et Mn^{++} , ne fait que suivre le fléchissement de l'activité de la ribonucléase seule en présence de concentrations croissantes de ces mêmes ions.

Les effets du magnésium et du zinc sur les interactions entre l'inhibiteur et la ribonucléase étant similaires, ils ont été représentés sur un même diagramme (fig 20 B). Le magnésium n'altère l'activité de la ribonucléase, et lorsque la réaction est effectuée en présence du peptide, ce dernier inhibe normalement l'enzyme, sans être influencé par la présence de magnésium.

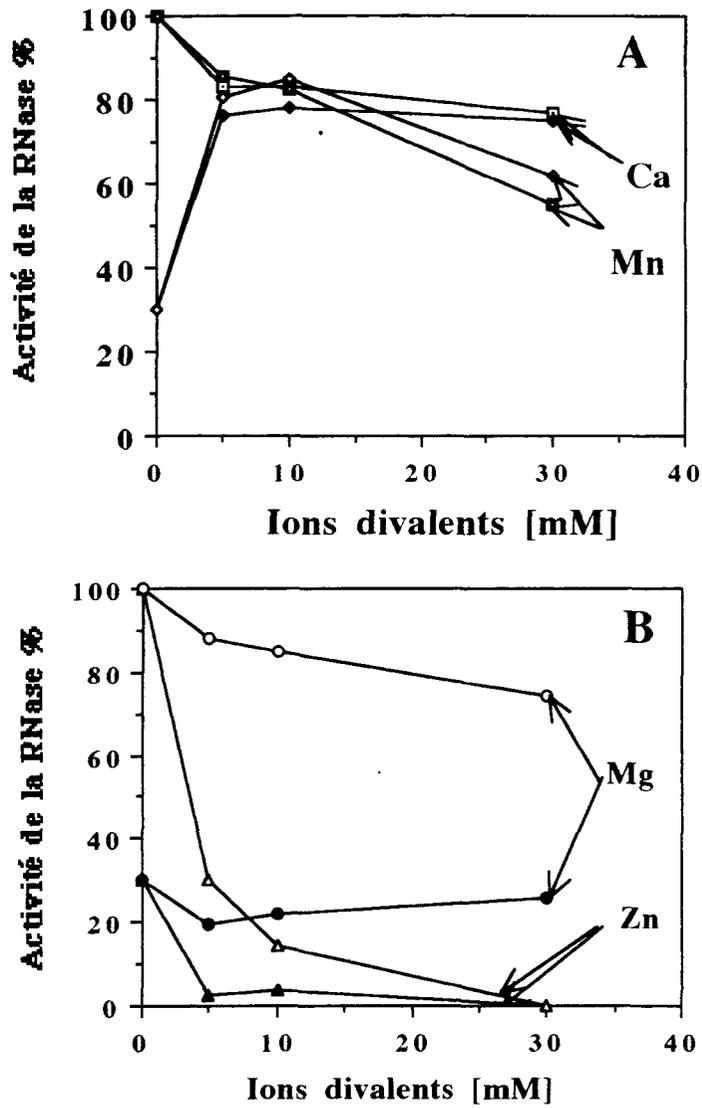


Figure 20

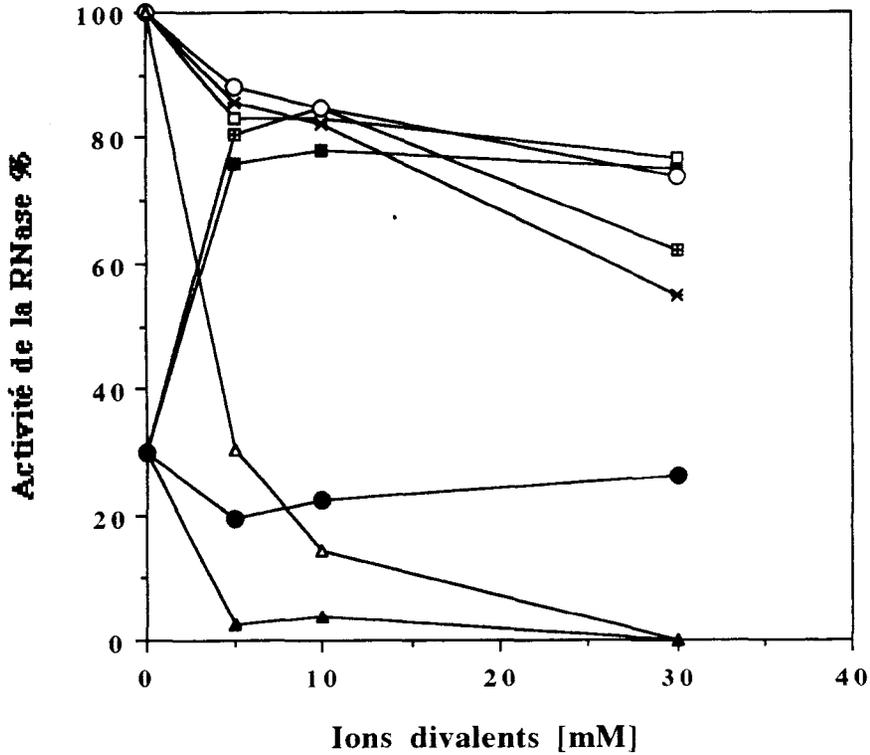
Influence de la concentration en ions divalents sur l'activité de la ribonucléase, (avec ou sans le peptide) dans les conditions précisées dans "Matériels et Méthodes". Les concentrations des ions divalents correspondent aux concentrations finales.

A : en présence de calcium et de manganèse : Ca^{2+} (\square), Mn^{2+} (\times), Ca^{2+} + peptide (\blacksquare), Mn^{2+} + peptide (\blackcross).

B : en présence de magnésium et de Zinc Mg^{2+} (\circ), Zn^{2+} (Δ), Mg^{2+} + peptide (\bullet), Zn^{2+} + peptide (\blacktriangle)

Par contre, l'addition de zinc, aux concentrations utilisées ici (entre 5 et 30 mM), provoque une nette inhibition de l'activité ribonucléasique. L'addition du peptide au milieu réactionnel réduit considérablement l'activité de l'enzyme, mais comme la présence de zinc avait déjà ramené cette activité en dessous de 30%, il est difficile de voir si l'inhibiteur atteint sa pleine efficacité. Toutefois, il est évident que la présence de magnésium ou de zinc n'empêche pas le peptide de jouer son rôle d'inhibiteur vis-à-vis de la ribonucléase.

Dans la figure 21, sont représentés les effets de tous les ions divalents étudiés. On peut ainsi facilement noter l'effet du calcium et du manganèse qui protègent la ribonucléase de l'action inhibitrice du peptide, alors que le zinc et le magnésium ne semblent pas interférer dans l'action du peptide sur l'enzyme. Ces résultats s'appliquent au type de substrat employé (CpG), et dans les conditions de pH et de salinité qui sont utilisées ici. En effet il a déjà été rapporté que l'effet de ces ions divalents pouvait varier selon le type de substrat et d'essai utilisé pour le dosage de l'activité ribonucléasique (112).



	Mn	Mg	Ca	Zn
Activité RNasique , en présence des ions.	stable	stable	stable	FAIBLIT
Action inhibitrice du peptide, en présence des ions.	FAIBLIT	stable	FAIBLIT	stable

FIGURE 21

Influence de la concentration en différents ions divalents sur l'activité de la ribonucléase et du peptide. Les réactions sont réalisées comme précisé dans "Materiels et Méthodes". Les concentrations en ions divalents Ca^{2+} (□), Mn^{2+} (×) Mg^{2+} (○) and Zn^{2+} (Δ) sont les concentrations finales, dans le milieu de réaction. Sont également représentés : Ca^{2+} + peptide (■), Mn^{2+} + peptide (◻), Mg^{2+} + peptide (●), Zn^{2+} + peptide (▲) .

f) Influence de la force ionique

Les modifications de l'interaction entre le peptide inhibiteur et la ribonucléase observée en présence d'ions divalents peuvent être liés à une modification de la force ionique. Il est intéressant d'étudier l'action de la force ionique en se plaçant dans une échelle de valeurs qui recouvre celles employées lors de l'étude de l'influence de ces ions. Comme ces ions divalents ont été ajoutés au milieu de réaction à des concentrations variant de 5 à 30 mM, il faut que les concentrations de NaCl atteignent au moins le triple pour égaler les forces ioniques. Les concentrations utilisées varient ici de 0 à 100 mM (fig 19 B page 114). Sur ce diagramme, il apparaît que l'activité de la ribonucléase n'est pas beaucoup influencée par l'addition de ces concentrations de NaCl. De même le peptide inhibiteur agit normalement sans être gêné par la présence de NaCl. Les deux courbes montrent un léger fléchissement qui serait peut-être lié à une baisse de l'activité de la ribonucléase en présence de NaCl. Des études similaires effectuées sur l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase, ont montré que l'inhibition n'était pas affectée par la présence de NaCl jusqu'à 0,6 M (55). Sur ce point le peptide présente des caractéristiques comparables à celles de la protéine native.

4) Obtention, en plusieurs fragments, du gène de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase

a) Réaction polymérasique en chaîne.(Pcr)

Le gène de l'inhibiteur placentaire avait été cloné par deux équipes (56,57). Mais comme il n'a pas été possible d'obtenir le clone, l'utilisation de la PCR sur une banque d'ADN complémentaires aux ARN de placentas humains a été envisagée (Clontech, vecteur de colonage = λ gt11). Le but étant d'obtenir le gène de la protéine pour pouvoir étudier les caractéristiques des protéines obtenues par mutagenèse dirigée.

Le gène de la protéine a été obtenu en plusieurs fragments. La fig 8 présentée dans "matériels et Méthodes" permet de localiser les différentes sondes utilisées, qui viennent s'apparier lors du dédoublement de la double hélice d'ADN au cours de l'élévation de température à 94 °C intervenant dans la réaction polymérasique en chaîne. La séquence désoxyribonucléique du gène de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase étant connue, chaque sonde est choisie de manière à présenter une complémentarité parfaite avec une séquence unique de l'ADN que l'on cherche à sortir de la banque d'ADNc. Six sondes ont été synthétisées, et associées lors de la réaction en chaîne par la polymérase, utilisant les cycles de température et les temps d'extension précisés dans Matériels et Méthodes au chapitre III. Comme on peut le noter sur la figure 22 A, de nombreuses bandes apparaissent après utilisation de la PCR.

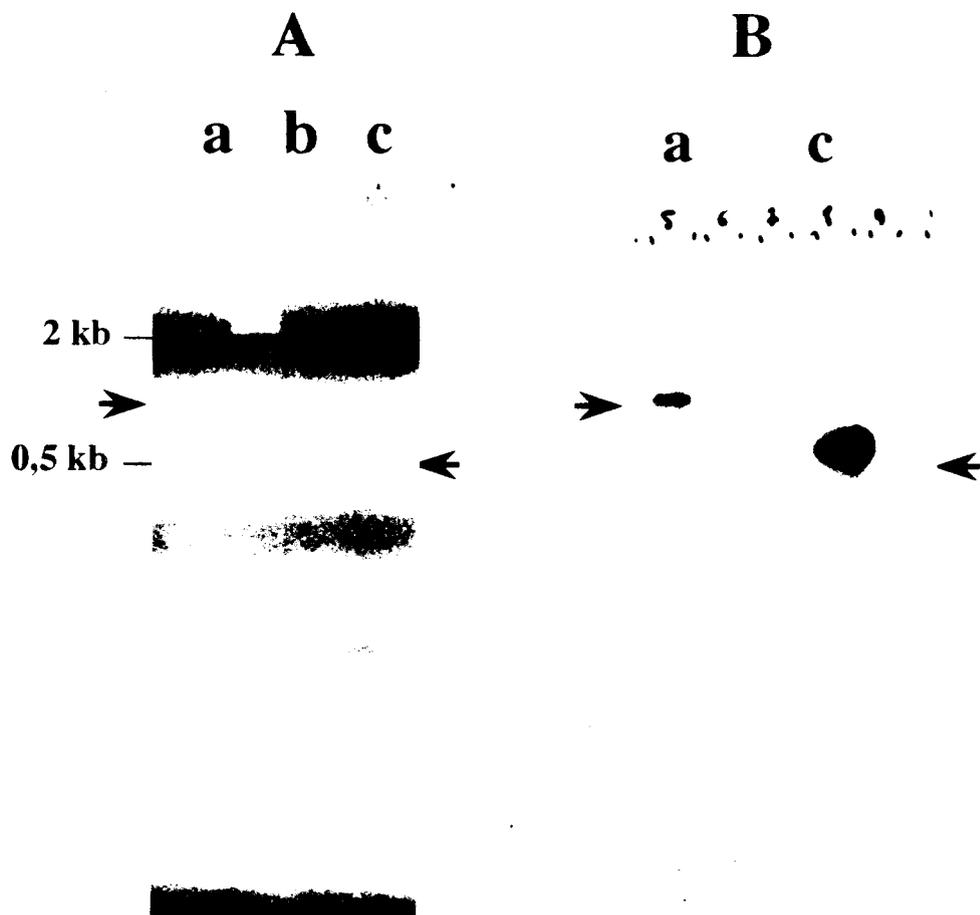


FIGURE 22

A : produits de Pcr déposés en gel d'agarose 1,5 %, en **a** bande de 1000 paires de bases obtenue avec les sondes 7 + 9 en **b** le marqueur a été déposé (0,5 kb et 2 kb sont repérés) en **c** bande de 500 paires de bases obtenue avec les sondes 8 + 6

B : Southern-blot de ce gel. La sonde interne 3 a été marquée au ^{32}P (voir figure 8 page 83).

Certains fragments ont une taille correspondant à ce qui est attendu :

Un fragment de 1000 pb entre les sondes 7 et 9 et un fragment de 500 pb entre les sondes 8 et 6 ont été obtenus. mais compte tenu du grand nombre de gènes qui sont présents dans la banque d'ADNc obtenue à partir des ARN de placenta humain (un million de clones différents ayant inséré en moyenne chacun 1800 pb), il se pouvait que certaines sondes synthétisées présentent des affinités pour des séquences qui n'appartenaient pas au gène du PRI recherché ici. De ce fait, la conformité de la taille des fragments obtenus à la taille attendue, n'était pas suffisante pour vérifier les produits synthétisés par la méthode de la PCR.

Une deuxième vérification s'est avérée nécessaire. La sonde n°3 qui peut s'hybrider avec la partie centrale du gène a servi de contrôle lors des "Southern blot". Si cette sonde marquée au ^{32}P s'hybride avec les produits obtenus, elle donne une première confirmation qu'une partie de l'ADN du PRI a été synthétisée par la polymérase. La figure 22 B correspond au "Southern blot" du gel présenté en 22 A. Deux bandes s'hybrident avec les sondes, elles correspondent à des fragments de taille attendue, lors de l'amplification de l'ADN situé entre les sondes 7 + 9 , et 8 + 6 au cours de la réaction polymérasique en chaîne.

L'idée initiale étant d'essayer d'obtenir le gène en entier d'autres sondes ont été utilisées pour obtenir les parties 5' et 3' terminales du gène; pour cela, des sondes s'hybridant avec l'ADN phagique ont été associées aux sondes

internes (fig 23). Les produits obtenus par PCR sont présentés dans la figure 24 A.

Comme on peut le noter, cette fois les bandes obtenues sont diffuses. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans la banque d'ADNc utilisée, toute une série de séquences, correspondant au gène, raccourci à différents degrés aux extrémités ont été insérées, en même temps que la séquence complète du gène du PRI. Le contrôle en "southern blot" a été effectué en utilisant comme sondes internes, les sondes 7 et 9 qui recouvrent les fragments attendus pour les essais faits en utilisant (F + 1) et (R + 2), respectivement (fig 24 B). F et R étant deux sondes de 17 nucléotides s'hybridant avec le gène du phage λ gt11 dans lequel la banque d'ADNc était clonée. Les sondes 7 et 9 semblent s'hybrider avec de nombreuses bandes, ceci corrobore l'idée que de nombreux fragments correspondant aux différentes longueurs de parties terminales du gène étaient insérés dans la banque d'ADNc.

Ainsi, le gène de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase est amplifié, en trois fragments. Les fragments 5' et 3' terminaux ont été purifiés par excision des bandes intéressantes à partir d'un gel préparatif.

L'étude des fragments obtenus par coupure tryptique de la protéine, a fait apparaître un peptide intéressant à cause de son activité inhibitrice vis-à-vis de la ribonucléase. La séquence nucléotidique codant pour ce peptide est située dans la portion de gène qui a été obtenu par la méthode d'amplification de gène avec les sondes

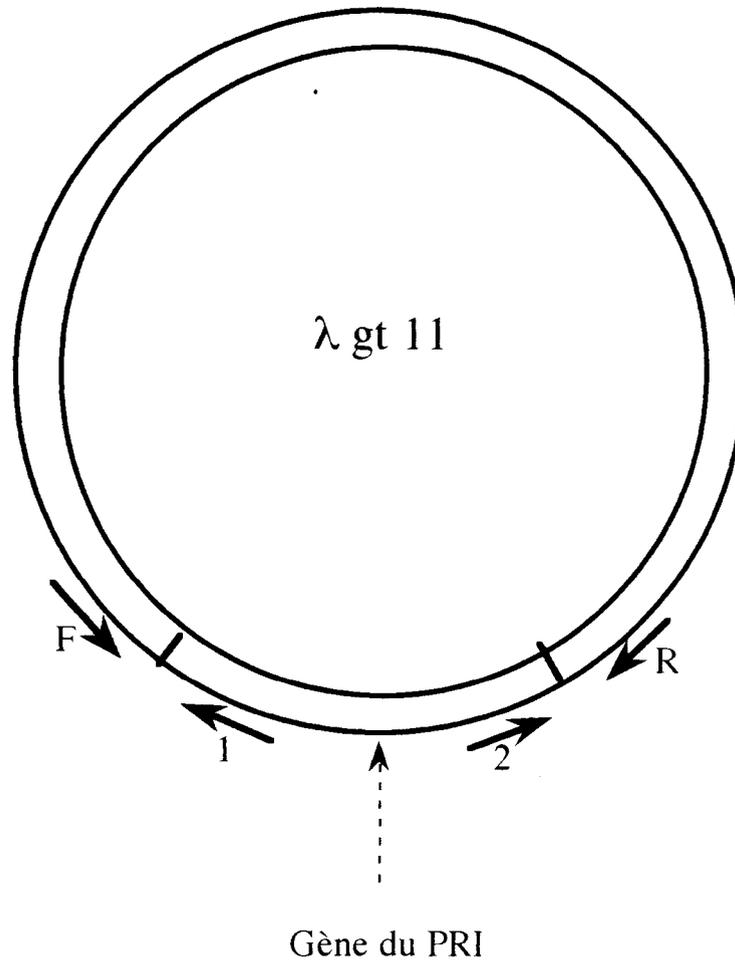


FIGURE 23

Position des sondes 1 et 2 sur le gène de l'inhibiteur placentaire de ribonucléase (PRI), inséré dans le vecteur λ gt11.

La région d'hybridation des sondes F et R sur le vecteur λ gt11 est également représentée .

Ces sondes ont été utilisées pour obtenir les fragments 5' et 3'-Terminaux du gène de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase

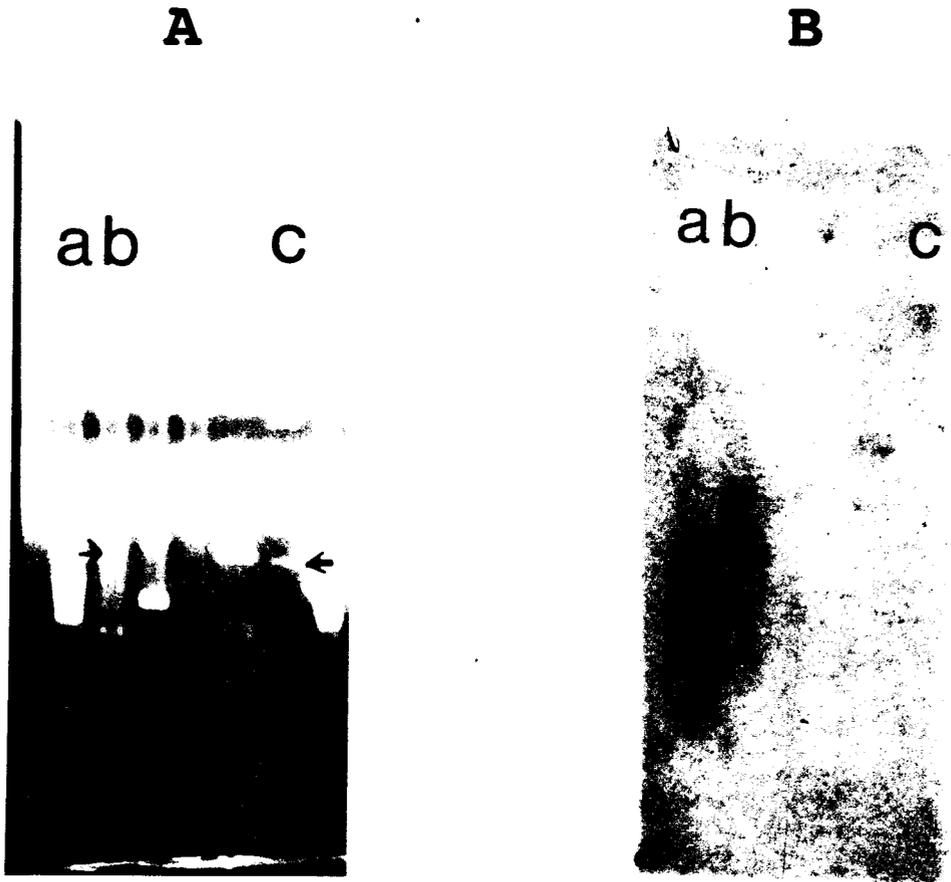


FIGURE 24

- A** : produits de Pcr déposés en gel d'agarose 1,5 %, en **a** bandes obtenues avec les sondes 1 + R en **b** bandes obtenues avec les sondes 2 + R en **c** marqueurs de taille de l'ADN (<- = 500pb)
- B** : Southern-blot de ce gel. Les sondes internes 7 et 9 utilisées pour la détection ont été marquées au ^{32}P (voir fig 8 page 83).

8 + 6. Dans le but de pouvoir étudier l'influence de mutations sur l'activité de ce peptide, une vérification de sa séquence a été effectuée.

b) Clonage d'un fragment de 500 paires de bases.

La séquence nucléotidique qui a été synthétisée par la polymérase entre les sondes 6 et 8 a une longueur de 528 pb. Afin de séquencer ce fragment d'ADN, il importait de le placer dans un vecteur qui permette de l'avoir en quantité suffisante. Le vecteur utilisé était le pBS+/- . Une digestion par l'enzyme de restriction SmaI a permis d'obtenir une ouverture du vecteur avec des bouts francs. Le fragment de 528 pb a été traité par la Klenow de manière à obtenir également des bouts francs; en effet les produits obtenus par la méthode de PCR, ne sont pas à bouts francs. La séquence du fragment inséré a été vérifiée par la méthode de Sanger. Environ 200 bases ont pu être lues clairement sur le gel, et la séquence de celles-ci correspond sans ambiguïté au fragment de gène attendu.

c) Sous clonage et tentative d'expression de ce fragment

Le fragment de 500 pb obtenu était intéressant, car il possédait la séquence codant pour le peptide actif (inhibant la ribonucléase). Il importait de le placer dans un vecteur pour permettre l'expression de la protéine codée en quantité suffisante, pour tester son activité vis-à-vis de la ribonucléase. Ce paragraphe présente l'ébauche de ce

travail, car des expériences complémentaires n'ont pu être réalisées dans le cadre de cette thèse.

Le fragment de 528 pb, ainsi que le vecteur pGEX ont été coupés par les enzymes de restriction Bam H₁ et Eco R₁, ainsi la séquence provenant du gène de PRI a été insérée en phase de lecture dans le vecteur pGEX.

Le succès de l'insertion du vecteur dans des bactéries de souche TG2 a été vérifiée par analyse de l'ADN phagique par lyse alcaline (108).

Le nouveau plasmide recombinant obtenu qui correspond au vecteur pGEX, flanqué du fragment de 528 pb a été inséré dans des bactéries, l'induction par l'IPTG a été réalisée. L'élution de la colonne d'affinité a été réalisée par la glutathione.

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, n'a pas permis de mettre en évidence la présence de la protéine attendue liée à la séquence reconnue par la thrombine. D'autres essais doivent être tentés.

C DISCUSSION

A partir d'une fraction de l'extrait placentaire précipité au sulfate d'ammonium (35-60%), l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase a été obtenu pur en une seule étape par chromatographie d'affinité. L'étude de l'action de cette protéine vis-à-vis de la ribonucléase avait été effectuée en observant l'interaction de cette protéine avec la ribonucléase modifiée (85-87), mais au moment où ces coupures enzymatiques ont été envisagées, aucun travail concernant des modifications de l'inhibiteur par coupure ou

mutagénèse n'étaient parus, sa séquence n'était d'ailleurs pas encore publiée (57). Il paraissait donc intéressant d'identifier la (ou les) région(s) de la protéine impliquée(s) dans l'interaction de l'inhibiteur avec la ribonucléase.

C'est donc dans le but de trouver un fragment de la protéine qui serait responsable de l'activité inhibitrice que les coupures chimiques et enzymatiques ont été envisagées. Les coupures enzymatiques par l'endoprotéinase Lys-C et la chymotrypsine ont été choisies car elles permettaient d'obtenir un faible nombre de peptides.

En raison du faible nombre de résidus de lysine dans la protéine (54), l'hydrolyse de la protéine par l'endoprotéinase Lys-C devait libérer 17 peptides. Or, sur le diagramme de CLHP en phase inverse seulement quatre pics apparaissent. Les fractions correspondantes ont été testées, et l'une d'entre-elles s'est avérée capable d'inhiber l'activité de la ribonucléase A.

Le peptide tryptique dont il sera question plus loin, et qui possède une activité inhibitrice correspond à la séquence 287-301. Parmi les peptides qui pouvaient être obtenus par action de cette endoprotéinase-Lys-C, il en existe deux qui recouvrent assez précisément cette séquence : le peptide 283-320, et le peptide 287-320 (fig 25).

S L D I Q S L D I Q C E E L S D A R W A E L L P L L Q Q C Q V V R - -
 -8- 16-
 L D C C G L T E A R C K D I S S A L R V N P A L A E L N L R S N E L G D V G V H C V L Q G L Q T P S C K I Q K L S
 -35/36- 46- 69- 86- 89-
 L Q N C C L T G A G C G V L S S T L R T L P T L Q E L H L S D N L L G D A G L Q L L C E G L L D P Q C R L E K L Q
 -121- 126- 138- 146-
 L E Y C S L S A A S C E P L A S V L R A K P D F K E L T V S N N D I N E A G V R V L C Q G L K D S P C Q L E A L K
 -168- 170- 172- 194- 204-
 L E S C G V T S D N C R D L C G I V A S K A S L R E L A L G S N K L G D V G M A E L C P G L L H P S S R L R T L W
 -213- 217- 225- 237-
 I W E C G I T A K G C G D L C R V L R A K E S L K E L S L A G N E L G D E G A R L L C E T L L E P G C Q L E S L W
 -274- 282- 286- 297-
 V K S C S F T A A C C S H F S S V L A Q N R R F L L E L Q I S N N R L E D A G V R E L C Q G L G Q P G S V L R V L W
 -320- 354-
 L A D C D V S D S S L A A T L L A N H S L R E L D L S N N C L G D A G I L Q L V E S V R Q P G C L L E Q L V
 -378- 380- 383- 403- 411-
 L Y D I Y W S E E M E D R L Q A L E K D K P S L R V I S
 -435- 444- 452- 453- 453-

FIGURE 25

Séquence de l'inhibiteur placentaire de ribonucléase.

Position des différents résidus impliqués dans les coupures chimiques et enzymatiques utilisées.

----D---- Emplacement des résidus d'acide aspartique, énucléés par l'acide acétique 0,25N.

.....K..... Emplacement des résidus de Lysine, coupés en C-terminal par l'endoprotéinase Lys-C.

La séquence du peptide de 15 acides aminés inhibant la ribonucléase est soulignée (287-301).

Le temps d'élution de cette fraction inhibitrice obtenue après hydrolyse de la protéine par l'endoprotéinase Lyc-C, est beaucoup plus court, que celui du peptide tryptique de 15 acides aminés. Le rapprochement entre ces fractions est à envisager avec certaines restrictions. Toutefois, il est possible que deux peptides de séquence très voisine aient des temps d'élution différents pour deux chromatographies distinctes.

Dans des conditions d'hydrolyse limitée décrite par Ohe et coll., la chymotrypsine ne coupe que les liaisons tyrosyles (107). Comme la protéine ne contient que 3 tyrosines (57), 4 fragments étaient attendus. Aucune des trois fractions obtenues par CLHP en phase inverse, éluée au cours du gradient d'acétonitrile ne s'est révélée active vis-à-vis de la ribonucléase A. La position de ces tyrosines dans la protéine n'était peut être pas idéale : Deux d'entre elles sont situées en région C-terminale à trois résidus d'intervalle (fig 12 page 97).

Pour les hydrolysats obtenus par digestion de l'inhibiteur par l'acide acétique, la chymotrypsine et l'endoprotéinase Lys-C, un pic très large a été obtenu en fin de d'élution lors de la CLHP en phase inverse (fig 13 page 98). Mais seul le pic obtenu après hydrolyse par la chymotrypsine a montré une activité inhibitrice vis-à-vis de la ribonucléase. On ne peut pas exclure que cette fraction ne corresponde pas à de la protéine native. Cette hydrolyse

chymotrypsique est d'ailleurs la seule à ne pas avoir permis l'élution de fractions actives au cours du gradient d'acétonitrile.

En ce qui concerne la coupure par l'acide acétique, la composition en acides aminés de la protéine ne permettait pas de connaître le nombre exact d'acides aspartiques, mais on pouvait déjà s'attendre à un nombre assez élevé, cette protéine ayant un pHi acide. En fait la séquence publiée ultérieurement a montré que cette protéine contenait 27 résidus d'acide aspartique. On observe d'ailleurs sur le diagramme de CLHP en phase inverse que de nombreux peptides ont certainement été produits par cette hydrolyse, et n'ont pu être séparés correctement. Deux fractions ont montré une capacité d'inhibition vis-à-vis de la ribonucléase A. Ce dosage a impliqué l'utilisation d'une grande partie des fractions obtenues, car celles ci ne contenaient que très peu de peptide en raison de la faible solubilité de la protéine dans l'acide acétique 0,25 N.

Il faut aussi prendre en compte la structure primaire de cette protéine. Le PRI est une protéine formée d'unités répétitives, on observe effectivement certains peptides produits par cette coupure à l'acide acétique qui présentent 41% d'homologie de séquence comme le peptide 355-377, et le peptide 412-434 ou même parfois 54% comme entre le peptide 127-137 et le peptide 355-377 (fig 25 page 130). Il est probable que des peptides présentant des homologies, aient des temps de rétention voisins sur la colonne de

chromatographie, ce qui peut se traduire par ce type de diagramme très compact.

La coupure par la trypsine n'avait pas été utilisée à priori, non pas en raison du nombre élevé de peptides attendu, mais plutôt en raison des risques de contamination par la chymotrypsine. L'activité de cette chymotrypsine peut être détruite par addition de Tosyl phenylalanyl chlorométhane (TPCK), mais cette substance chimique risquait d'influencer les essais ultérieurs de dosages de l'activité inhibitrice des peptides obtenus. En effet, il était très important de pouvoir conserver l'activité inhibitrice éventuelle des peptides obtenus, après hydrolyse et séparation en CLHP en phase inverse.

Les auteurs qui ont publié la séquence nucléotidique du gène de cette protéine avaient utilisé la trypsine pour hydrolyser la protéine et en confirmer la séquence primaire. Ils avaient purifié l'enzyme par chromatographie afin d'éliminer la chymotrypsine contaminante (57).

Lorsque cette hydrolyse trypsique a été réalisée dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé la trypsine purifiée par affinité (Merck). Après hydrolyse par la trypsine, 44 fractions ont été obtenues, et chacune d'entre-elles a été testée pour sa capacité à inhiber la ribonucléase A.

Trois fractions se sont révélées actives.

Si la coupure par la trypsine avait été complète 41 peptides auraient été obtenus; l'obtention de 44 fractions

est peut être due au fait que certaines d'entre elles sont issues de peptides incomplètement coupés. C'est ce qui semble s'être passé pour le peptide présent dans la fraction 1, puisque sa composition en acides aminés est très voisine de celle du peptide 173-194 correspondant à deux peptides tryptiques adjacents non hydrolysés.

Mais c'est surtout la fraction 3 qui a été l'objet d'une attention particulière, car cette fraction était beaucoup plus active que les deux autres. Cette fraction correspond au peptide de séquence 287-301, et recouvre assez précisément une partie de la séquence consensus proposée par l'équipe de Vallee qui avait publié la structure primaire de cet inhibiteur placentaire de la ribonucléase (PRI) (57)(fig 26 (et également fig 16 page 107)).

Lee et coll. avaient remarqué que cette protéine comportait 7 unités répétitives internes composées de 57 acides aminés et ayant 39% d'homologie entre-elles (57). Ultérieurement, alors que nous avons ébauché la caractérisation de ce peptide actif de 15 acides aminés, cette même équipe a étudié par mutagenèse dirigée, l'effet de la délétion de certaines de ces unités sur la capacité de liaison ou d'inhibition de ces mutants obtenus (92,93) (figure 27).

A E L - L S - N - L G D A G - - - L C - G L -

B ²⁸⁷ E L S L A G N E L G D E G A R ³⁰¹

C ¹⁷³ E L T V S N N D I N E A G V R V L C Q G L K ¹⁹⁴

FIGURE 26

Comparaison de la séquence en acides aminés des peptides inhibiteurs isolés après hydrolyse trypsique du PRI, avec la région de la séquence consensus du PRI correspondante.

A : séquence consensus (173-194) de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase (d'après Lee et Coll.(57)).

B : séquence du peptide trypsique de 15 acides aminés qui a été étudié cinétiquement dans le cadre de cette thèse. (fraction CPLH n°3)

C : séquence du peptide 173-194 correspondant à deux peptides tryptiques adjacents non hydrolysés (fraction CPLH n°1)

En B et C, les acides aminés présents dans la séquence consensus sont soulignés.

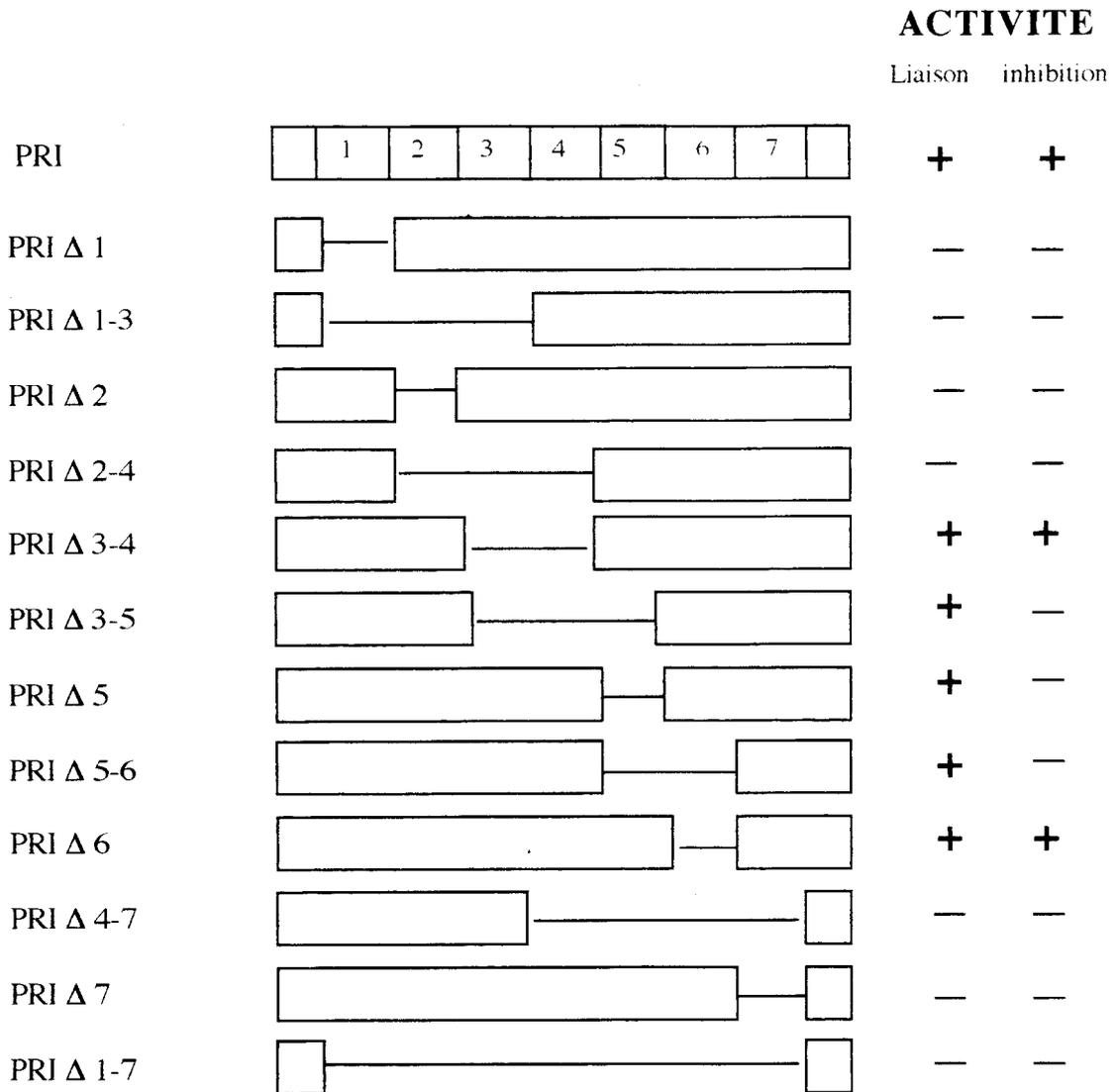


FIGURE 27

Schéma des différents mutants de l'inhibiteur placentaire de ribonucléase obtenus par mutagenèse dirigée. Leur capacité de liaison et d'inhibition sur la ribonucléase A est figuré par un (+). D'après Lee et Vallee (92).

Le peptide inhibiteur, correspondant à la séquence 287-301, est inclus dans la séquence 258-314 appelée unité 5.

Il semble que les deux unités 3 et 4 ne soient pas essentielles pour la capacité de liaison ou d'inhibition de la protéine. Il en est de même pour l'unité 6. En revanche, il semble bien que la séquence de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase comprise dans l'unité 5 intervienne seulement dans le mécanisme d'inhibition, et non pas dans le mécanisme de liaison de la protéine.

Dans le même travail, des expériences complémentaires ont montré que la protéine avait besoin de ses segments N- et C-terminaux pour être capable de se lier et d'inhiber la ribonucléase. Il se pourrait donc que la protéine ou certains mutants, correspondant au PRI amputé d'un ou plusieurs segments, ne soient capables d'inhiber la ribonucléase que si les 30 acides aminés N- et C-terminaux sont présents. Ces séquences N- et C-terminales forceraient peut être la protéine à adopter une conformation optimale pour son activité. Les auteurs n'ont fait aucune étude sur les unités prises séparément.

Par contre, pour l'inhibiteur de la ribonucléase isolé du foie de porc (protéine ayant 78% d'homologie de séquence avec l'inhibiteur placentaire), les 90 acides aminés N-terminaux ne sont pas essentiels pour son activité (97) (fig 28).

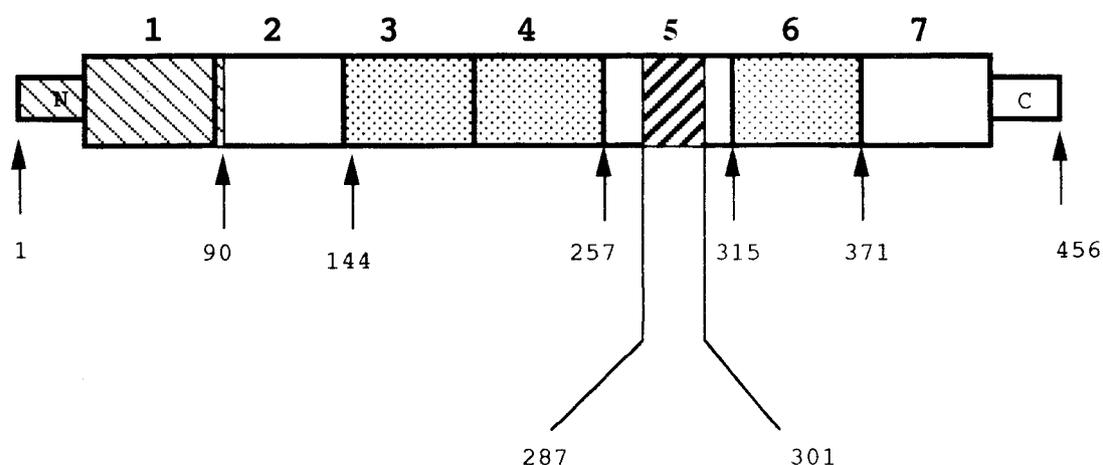


FIGURE 28

Localisation du peptide de 15 acides aminés dans l'inhibiteur de la ribonucléase. La séquence de l'inhibiteur intact (PRI) est représentée avec ses 7 unités répétitives internes.

: Localisation du peptide de séquence 287-301, étudié dans le cadre de cette thèse.

Emplacement des segments qui ont été retirés à l'inhibiteur de la ribonucléase sans altérer ses capacités d'inhibition.

 : Résidus 1-90 (ou 93) retirés à l'inhibiteur de la ribonucléase isolé de foie de porc (RI) (97)

 : Résidus 144-257 ou 315-371 retirés du PRI
(92,93)

Cet inhibiteur de la ribonucléase isolé du foie de porc, possède de nombreux points d'homologie avec l'inhibiteur humain; en effet l'homologie de séquence est très forte, cette protéine est constituée d'unités répétitives ayant une séquence consensus voisine de celle proposée pour l'inhibiteur placentaire humain, et ses propriétés enzymatiques sont similaires à celles du PRI (95,96).

Hofsteenge et coll.(97), ont identifié à partir de leurs travaux et de ceux de l'équipe de Vallee (57,92,93) deux zones de la protéine où pourrait résider l'activité inhibitrice (fig 28 page 138).

Le peptide de 15 acides aminés étudié ici se situe dans une de ces régions clés.

L'autre fraction active (fraction 1) obtenue par coupure tryptique du PRI, a une composition en acides aminés proche de la séquence 173-194, mais elle n'a pas été étudiée plus précisément à cause de son hétérogénéité et de son activité inhibitrice vis-à-vis de la ribonucléase A, beaucoup moins importante.

Les deux peptides présents dans la fraction 1 (séquence 173-194) et dans la fraction 3 (séquence 287-301), présentent 50% d'homologie avec la séquence consensus correspondante (fig 16 page 107 et fig 26 page 135).

L'inhibiteur de la ribonucléase est formée par la répétition d'unités ayant des séquences voisines. Il est possible qu'un petit nombre d'unités (voire une seule) soit responsable de l'activité de la protéine. Ainsi la délétion

de certaines d'entre-elles, en particulier de celle qui recouvre la séquence du peptide étudié dans le cadre de cette thèse, impliquerait la perte d'activité de la protéine mutante ainsi obtenue.

D'autres recherches (56) ont considéré la protéine comme formée de 8 unités répétitives disposées en tandem, chaque unité répétitive possédant une séquence consensus dupliquée. Il a pu ainsi être recensé un certain nombre de protéines riches en Leucine, qui contiennent des unités répétitives de 24 acides aminés très homologues à la séquence consensus caractérisée. (GPIb, LRG, PG40, AdCyc, PGII, Chao et Toll (voir introduction, et fig 2 page 30)).

Ces protéines, sont très souvent liées à la membrane.

De ce fait, le PRI paraît unique car ce serait la première protéine cytoplasmique à posséder de telles unités répétitives. Les études effectuées par Roth avaient en effet montré qu'il n'existait quasiment pas d'activité inhibitrice de la ribonucléase liée aux membranes (38). Blackburn avait trouvé que cet inhibiteur placentaire de la ribonucléase possédait 11 ponts disulfure (55); mais ultérieurement l'équipe de Vallee a mis en évidence qu'aucune des cystéines n'était sous forme de pont disulfure, ce qui se traduirait selon Torchinskii par une localisation intracytoplasmique de la protéine (113).

Un autre élément concernant l'originalité de cette protéine est qu'elle se lie avec la ribonucléase (et également l'angiogénine) dans un rapport stœchiométrique 1/1 (54, 91). Certains inhibiteurs de protéases, possédant deux

unités répétitives, sont capables de se lier à deux molécules de protéases; parfois il peut même s'agir de deux protéases différentes, comme par exemple, le lima bean trypsin inhibitor qui peut se lier simultanément à la trypsine et à la chymotrypsine (114). Cependant, il a été démontré que cet inhibiteur placentaire de la ribonucléase ne se liait qu'à une molécule de ribonucléase ou d'angiogénine à la fois, mais ne se liait jamais sur les deux molécules en même temps (91).

La leucine représente 20% des résidus d'acides aminés présents dans la protéine, et 76% des résidus de leucine sont conservés à l'intérieur des unités répétitives. Dans une hypothèse récente (95), ces leucines élaboreraient un échafaudage structurel constant, les résidus plus polaires intermédiaires formant des boucles qui détermineraient des interactions protéine/protéine très spécifiques.

Il est donc possible d'envisager qu'un peptide de 15 acides aminés comme celui qui est étudié ici ne soit pas confronté au problème du positionnement par rapport à la ribonucléase du fait de sa petite taille.

La détermination des paramètres de l'activité inhibitrice de ce peptide vis-à-vis de la ribonucléase A, suggère que celui-ci agit de façon non compétitive par rapport au substrat; le peptide viendrait donc se loger ailleurs que sur le site actif de la ribonucléase.

Ce type d'inhibition non-compétitif est identique à celui qui avait été initialement attribué à l'inhibiteur

placentaire de la ribonucléase. En effet lorsque Blackburn et coll. ont purifié et caractérisé cette protéine en 1977 (54), les études cinétiques utilisant la représentation selon Lineweaver-Burk, avaient permis de lui attribuer un type d'inhibition non-compétitive, avec un K_i de 3×10^{-10} M.

Leurs résultats ont été confirmés par les études d'interaction de l'inhibiteur avec la ribonucléase A ayant subi des modifications chimiques spécifiques de certains acides aminés.

En effet, en 1979 Blackburn et Jailkhani (85) ont pu démontrer que la liaison entre la ribonucléase et son inhibiteur n'impliquait ni les résidus du site actif de l'enzyme, ni les résidus auxiliaires. De plus, il apparaissait que l'inhibiteur n'interagissait pas avec les vingt acides aminés N-terminaux de la ribonucléase (voir introduction).

En utilisant un analogue de substrat, Blackburn et Gavilanes (87) ont pu montrer également que les régions de contact avec la ribonucléase, pour le substrat et l'inhibiteur n'étaient pas identiques comme attendu pour un inhibiteur non-compétitif, mais se recouvraient partiellement(87) .

Turner et coll.(60) travaillant sur l'inhibiteur de la ribonucléase isolé de la thyroïde, et du foie de porc, ont voulu rechercher si l'inhibition de la ribonucléase n'était pas mieux décrite en "tight-binding" plutôt qu'en cinétique de Michaelis-Menten. Ils rappelaient qu'avec ce type de cinétique, lorsque le K_m est très grand par rapport au K_i ,

la représentation suivant Lineweaver-Burk indique invariablement une inhibition non-compétitive, même lorsque ce n'est pas le cas (61,62,115,116). Actuellement cet inhibiteur de la ribonucléase est classé et étudié comme un "slow tight-binding " inhibiteur, son K_i obtenu par les expériences d'association-dissociation, de l'ordre de 10^{-15} M, étant beaucoup plus bas que les valeurs trouvées initialement (59,62,117).

Les résultats présentés ici permettent une approche de la caractérisation de la cinétique d'un peptide obtenu après digestion trypsique de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase. Les méthodes de dosages utilisées (Poly-C) pour détecter les fractions chromatographiques capables d'inhiber la ribonucléase, ont été employées initialement pour effectuer l'étude cinétique de ce peptide. Mais elles se sont avérées peu précises pour calculer les valeurs de K_m et de K_i . Elles ont toutefois permis de déterminer la quantité de peptide nécessaire pour inhiber la ribonucléase.

C'est donc en ramenant la concentration du peptide à des valeurs de l'ordre de la femto mole que l'inhibition s'est avérée efficace et reproductible. Ultérieurement, c'est la dégradation du CpG qui a été suivie en continu au spectrophotomètre.

L'addition du peptide n'a jamais permis d'atteindre 100% d'inhibition de la ribonucléase. Ce peptide agirait donc comme un inhibiteur non-compétitif, ne se fixant pas sur le site actif de la ribonucléase, mais sur une zone proche dans

l'espace, gênant ainsi la fixation du substrat et ralentissant la réaction sans la bloquer complètement.

Le K_i de 6×10^{-15} M obtenu, est du même ordre que celui de l'inhibiteur natif obtenu par Lee et coll. (44×10^{-15} M (59)). Ce K_i est beaucoup plus bas que le K_m ($0,36 \times 10^{-3}$ M) ce qui suggère que le peptide se comporte plutôt comme un "tight-binding" inhibiteur. Mais cette étude doit être considérée comme préliminaire, car la représentation du diagramme de Lineweaver-Burk suggère toujours un type d'inhibition non-compétitive lorsque que le K_i est très faible par rapport au K_m . Il faudrait compléter cette étude en utilisant les méthodes d'association-dissociation pour permettre de trancher entre inhibition compétitive et non-compétitive.

Ensuite l'interaction entre le peptide de 15 acides aminés et la ribonucléase A en présence d'ions divalents a été réalisée en appréciant l'effet du zinc, du magnésium, du calcium et du manganèse.

L'action inhibitrice du zinc sur la ribonucléase est bien connue (118), bien qu'il ait été démontré récemment qu'à des concentrations plus faibles que celles utilisées ici, cet ion soit capable de jouer le rôle de catalyseur vis-à-vis de cette enzyme (119). A des concentrations variant entre 5 et 30 mM, le zinc n'empêche pas le peptide d'inhiber la ribonucléase.

Il a été rapporté que le magnésium et le calcium, n'avaient aucun effet sur l'activité de la ribonucléase lorsque le substrat est de faible poids moléculaire (89), c'est ce que l'on observe avec le substrat utilisé ici, qui est un dinucléotide (CpG).

Le magnésium est le seul ion à avoir été étudié pour son action sur le complexe PRI-ribonucléase (50), les résultats présentés ici montrent que la présence de magnésium, n'empêche pas le peptide d'inhiber la ribonucléase.

En revanche il est intéressant de noter qu'en présence de calcium et de manganèse, le peptide n'agit plus sur la ribonucléase; ces ions peuvent intervenir sur le peptide lui-même, ou sur le substrat, ou même sur le complexe enzyme-substrat-peptide dans l'hypothèse d'une inhibition non-compétitive (120).

L'addition de NaCl a été effectuée pour vérifier si la force ionique intervenait; ce sont donc des concentrations en NaCl inférieures ou égales à 0,1 M qui ont été utilisées. L'action du peptide sur la ribonucléase n'est pas modifiée par la présence de NaCl à ces concentrations, cela se vérifie également pour l'inhibiteur natif lorsqu'il est étudié par des techniques de cinétiques classiques (50); toutefois lorsque le PRI est étudié par des techniques d'association-dissociation, une sensibilité de l'activité de la protéine à la présence de NaCl est notée (59).

Parallèlement, l'effet du pH a été étudié dans une zone correspondant à l'effet tampon de la solution utilisée. Il résulte de ces expériences que l'activité de la ribonucléase

est fortement diminuée au delà de pH 7. Par contre, il ne semble pas que les variations de pH aient une influence significative sur les interactions du peptide avec la ribonucléase. Il faut noter toutefois que Gribnau et coll. (50) ont observé, que l'action de l'inhibiteur dans son intégralité sur la ribonucléase était fortement influencée par le pH.

Enfin, pour avoir une activité inhibitrice le peptide nécessite, comme la protéine native, un temps de préincubation avec la ribonucléase avant que l'enzyme ne soit mise en contact avec le substrat (50,54,91)

Lorsque l'obtention du gène de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase a été envisagée, c'était dans le but de faire s'exprimer ce gène, et ultérieurement d'étudier l'action de mutagenèse dirigée sur celui-ci. Tout d'abord la technique de l'amplification de gènes a permis d'obtenir un fragment central du gène, et alors que ces expériences étaient en cours pour obtenir les fragment 5' et 3' terminaux, les travaux menés parallèlement sur la protéine ont permis d'isoler par coupure tryptique un peptide actif de 15 acides aminés. Les fragments 5' et 3' terminaux ont été obtenus, mais le fragment de gène central de 500 pb (fig 8 page 83) cloné initialement et qui avait été séquencé, comportait la séquence nucléotidique codant pour ce peptide. Dès lors il semblait intéressant de pouvoir sous cloner ce fragment dans un système qui permette de l'obtenir en grande

quantité, et éventuellement d'envisager son étude par mutagenèse.

Les travaux de mutagenèse effectués sur cette protéine ont été réalisés par l'équipe de Vallee. Les auteurs qui avaient d'abord effectué une délétion ou une intervention systématique de fragments de la protéine (92), s'étaient ensuite intéressés plus particulièrement à deux mutants actifs appelés PRI Δ 3-4 et PRI Δ 6 (93) (voir figure 27 page 136). Ces mutants avaient en commun une séquence centrale, recouvrant le peptide actif de 15 acides aminés caractérisé dans le cadre de cette thèse; cette région étant codée par la séquence insérée dans le vecteur pGEX, il eut été intéressant de pouvoir effectuer des mutations très ponctuelles sur cette région de la protéine où semble résider son activité.

D CONCLUSION

La purification de l'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase a été réalisée en une seule étape de chromatographie.

La digestion de cette protéine par la trypsine, suivie d'une purification des peptides obtenus par CLHP, a permis d'obtenir trois fractions actives. L'une de ces fractions a une composition en acides aminés correspondant à un peptide tryptique de 15 résidus recouvrant la séquence 287-301 de l'inhibiteur natif.

La séquence de ce peptide recouvre une région de la séquence consensus de la protéine.

Un peptide synthétique de 15 acides aminés, (de séquence identique à celui isolé après hydrolyse tryptique), a été caractérisé cinétiquement. Un type d'inhibition non-compétitif, et un K_i de 6×10^{-15} M vis-à-vis de la ribonucléase pancréatique bovine A ont pu lui être attribués. Ce type d'inhibition est identique à celui obtenu pour la protéine native lorsque son étude avait été envisagée de manière similaire par Blackburn et coll.(54).

Le K_i obtenu ainsi que les principales caractéristiques cinétiques de ce peptide, le rendent tout à fait comparable à la protéine native (l'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase).

Enfin, un fragment du gène de l'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase prélevé dans une banque d'ADNc, a été sous-cloné dans un système (vecteur pGEX). Ce fragment

de gène qui a été séquencé, possède la séquence nucléotidique, codant pour le peptide trypsique de 15 acides aminés qui est capable d'inhiber la ribonucléase A.

PERSPECTIVES

En ce qui concerne les études effectuées sur les cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer, si aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre l'activité de la ribonucléase alcaline et le degré de démence des malades, une grande hétérogénéité des résultats est apparue. Ceci laisserait penser que la théorie d'une altération de l'inhibiteur de la ribonucléase lors de cette maladie ne peut être écartée.

-Il serait donc intéressant de pouvoir effectuer des dosages similaires sur des cerveaux sains; en effet les dosages que nous avons réalisés ont montré que le cervelet ne pouvait pas être utilisé comme contrôle, puisque il existait des variations importantes au sein des groupes de patients. De plus, contrairement à ce qui avait été montré initialement, le cervelet porterait également des marqueurs de la maladie.

-Par ailleurs le dosage de l'activité ribonucléasique pourra être envisagé dans le liquide céphalo-rachidien, ainsi que dans le sérum de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. En effet, certains marqueurs de la maladie sont présents dans d'autres tissus que le cerveau (121,122).

En ce qui concerne l'étude du peptide tryptique de 15 acides aminés, une étude plus approfondie de son mode d'action sur la ribonucléase est à envisager

- une étude à l'aide d'agents pontants pourrait permettre de déterminer le site de fixation du peptide sur la ribonucléase A.

- Il serait également intéressant de tester si l'anticorps anti-PRI est capable de bloquer l'action du peptide.

- Le fragment de gène, comportant la séquence codant pour le peptide de 15 acides aminés, qui a été sous-cloné dans le vecteur pGEX, devra être exprimé et testé pour son éventuelle activité inhibitrice sur la ribonucléase A. Si une activité inhibitrice est décelée, une étude de l'action de modifications par mutagenèse dirigée pourra être envisagée.

- Il pourra aussi être envisagé la synthèse de peptides comportant des modifications par rapport au peptide de 15 acides aminés qui a fait l'objet d'une étude cinétique. Par exemple un peptide de 13 acides aminés, correspondant au peptide étudié, amputé des deux acides aminés C-terminaux (alanine et arginine) se rapprocherait plus encore de la portion de séquence consensus recouverte.

- Enfin, la caractérisation enzymatique du peptide doit être complétée. En effet l'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase a récemment été décrit comme un "slow tight-binding inhibitor"; si le peptide de 15 acides aminés se comporte comme la protéine native, les techniques enzymatiques d'association-dissociation permettront de déterminer plus précisément le type d'inhibition qui caractérise ce peptide :(non-compétitif ou compétitif).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - KIDD, M. (1963).

Paired Helical filament in electron microscopy of Alzheimer's disease.

Nature., 197, 192-193.

2 - TERRY, D. (1963).

The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 22, 629-642.

3 - GLENNER, G.G., and WONG, C.W. (1984). Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 885-890.

4 - KATZMAN, R. (1986).

Alzheimer's disease.

N. Engl. J. Med., 314, 964-973.

5 - GUELFY, J.D. (1989)

DSM III. Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux. Traduction française Masson ed.

6 - BLESSED, G., TOMLINSON, B.E., ROTH, M. (1968).

The association between quantitative measures of dementia and of senile changes in the cerebral grey matter of elderly subjects.

Br. J. Psychiatry 114, 797-811.

7 - DUYCKAERTS, C., HAUW, J.-J., PIETTE, F., RAINARD, C., POULAIN, V., BERTHAUX, P. and ESCOUROLLE, R. (1986)

Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length.

Acta. Neuropathol. (Berl.), 66, 72-74.

8 - BOWEN,D., SMITH,C.B., WHITE,P. and DAVIDSON,A.N. (1976)
Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in
senile dementia and other abiotrophies.

Brain, 99, 459-495.

9 - PERL,D.P. and PENDLEBURY,W.W. (1987)

Neuropathology of Alzheimer's disease and related dementias
in psychopharmacology : the third generation of progress. Ed
by H.Y. Meltzer, Raven press N.Y., 87 ,881-885.

10 - DUYCKAERTS,C., HAUW,J-J., BASTENAIRE,F., PIETTE,F.,
POULAIN,C., RAINSARD,V., JAVOY-AGID,F. and BERTHAUX,P.
(1986)

Laminar distribution of neocortical senile plaques in senile
dementia of the Alzheimer type.

Acta Neuropathol. (Berl) 70, 249-256.

11 - HAUW,J-J., VIGNOLO,P., DUYCKAERTS,C., BECK,H.,
FORETTE,F., HENRY,J-F., LAURENT,M., PIETTE,F., SACHET,A. et
BERTHAUX,P. (1986)

Etude neuropathologique de 12 centenaires : La fréquence de
la démence sénile de type Alzheimer n'est pas
particulièrement élevée dans ce groupe de personnes très
âgées.

Rev. Neurol. (Paris) 142, 107-115.

12 - OLIVIER,C. and HOLLAND,A.J. (1986).

Down's syndrome and Alzheimer's disease : a review.

Psychol. Med., 16, 307-322.

13 - GOLDGABER,D., LERMAN,M.I., MC BRIDE,O.W., SAFIOTI,U.
and GADJUSEK,D.C.(1987)

Characterization and chromosomal localization of cDNA
encoding brain amyloid of Alzheimer's disease.

Science,235,877-880.

14 - KANG, J., LEMAIRE, H.G., UNTERKAECK, A., SALBAUM, J.M., MASTERS, C.L. GRZESCHIK, K.H., MULTHAUP, G. BEYREUTHER, K. and MULLER-HILL, B. (1987)

The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles cell-surface receptor.

Nature, 325, 733-736.

15 - ROBAKIS, N.K., WISIEWSKI, H.M., JENKINS, E.C., DEVINE-GAGE, E.A., HONCK, G.E. Jr., YAO, X.L., RAMAKRISHNA, N., WOLF, G., SILVERMAN, W.P. and BRAUN, W.T. (1984)

Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaque of people with Alzheimer's disease and Down syndrome. Lancet.i 384.

16 - TANZI, R.E., GUSELLA, J.F., WATKINS, P.C., BRINS, G.A.P., StGEORGE HYSLOP, T., VAN KEUREN, M.L., PATERSON, D., PAGAN, S., KURNIT, D.M. and NEVE, R.L. (1987)

Amyloid beta protein gene : cDNA, mRNA, distribution and genetic linkage near the Alzheimer's locus.

Science, 235, 880-884.

17 - St GEORGE-HYSLOP, P.H., TANZI, R.E., POLINSKY, R.J., NEVE, R.L., POLLEN, D., DRACHMAN, D., GROWDON, J., CUPPLES, L.A., NEE, L., MYERS, R.H., O'SULLIVAN, D., WATKINS, P.C., AMOS, J.A., DEUTSCH, C.K., BODFISH, J.W., KINSBOURNE, M., FELDMAN, R.G., BRUNI, A., AMADUCCI, L., FONCIN, J-F. and GUSELLA, J.F. (1987).

Absence of genetic linkage of chromosome 21 genes in familial and sporadic Alzheimer's disease.

Science, 238, 664-666.

18 - TANZI, R.E., BIRD, E.D., LATT, S.A. and NEVE, R.L. (1987)

The amyloid β protein gene is not duplicated in brains from patients with Alzheimer's disease.

Science, 238, 666-669.

19 - BERMAN PODLISNY, M., LEE, G. and SELKOE, D.J. (1987)

Gene dosage of the amyloid β precursor protein in Alzheimer's disease.

Science, 238, 669-671.

20 - SCHELLENBERG, G.D., BIRD, T.D., WIJSMAN, E.M., MOORE, D.K., BOEHNKE, M., BRYANT, E.M., LAMPE, T.H., NOCHLIN, D., SUMI, S.M., DEEB, S.S., BEYREUTHER, K. and MARTIN, G.M. (1988).

Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease.

Science, 241, 1507-1510.

21 - St GEORGE-HYSLOP, P.H., HAINES, J.L., FARRER, L.A., POLINSKI, R., Van BROEKOVEN, C., GOATE, A., CRAPPER McLACHLAN, D.R., ORR, R., BRUNI, A.C., SORBI, S., FONCIN, J-F., POLLEN, D., CANTU, J-M., TUPLER, R., VOSKRESENKAYA, N., MAYEUX, R., GROWDON, J., FRIED, V.A., MYERS, R.H., NEE, L., BACKHOVEN, H., MARTIN, J-J., ROSSOR, M., OWEN, M.J., MULLAN, M., PERCY, M.E., KARLINSKY, H., RICH, S., HESTON, L., MONTESI, M., MORTILLA, M., NACMIAS, N., GUSELLA, J.F., HARDY, J.A. and other members of the FAD Collaborative Study group. (1990).

Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder.

Nature, 347, 194-197.

22 - GOATE, A., CHARTIER-HARLIN, M-C., MULLAN, M., BROWN, J., CRAWFORD, F., FIDANI, L., GIUFFRA, L., HAYNES, A., IRVING, N., JAMES, L., MANT, R., NEWTON, P., ROOKE, K., ROQUES, P., TALBOT, C., PERICAK-VANCE, M., ROSES, A., WILLIAMSON, R., ROSSOR, M., OWEN, M. and HARDY, J. (1991)

Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease.

Nature, 349, 704-706.

23 - MANN, D.M.A., NEARY, D., YATES, P.O., LINCOLN, J., SNOWDEN, J.S. and STANWORTH, P. (1981)

Alteration in protein synthesis of nerve cells in Alzheimer's disease.

J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 44, 97-102.

24 - SAJDEL-SULKOVSKA, E.M., COUGHLIN, J.F., STATON, D.M. and MAROTTA, A. (1983)

In vitro protein synthesis by messenger RNA from the Alzheimer's disease brain.

dans : Branbury Report 15 : Biological aspect of alzheimer's disease, ed by Katzman, R. New York ; Cold Spring Harbor press, 193-200.

25 - SAJDEL-SULKOWSKA, E.M., MAROTTA, C.A (1984)

Alzheimer's diseased brain: alteration in RNA levels and in a Ribonuclease-Inhibitor complex.

Science, 225, 947-949.

26 - BUSTANY, P., HENRY, J.F. and SARGENT, T. (1983)

Positron Emission Tomographie of the brain, pp 208-217.

Springer Verlag, Berlin.

27 - GUILLEMETTE, J.G., WONG, L., CRAPPER Mc LACHLAN, D.R. and LEWIS, P.N. (1986).

Characterization of Mesenger RNA from the cerebral cortex of control and Alzeimer-afflicted brain.

J. Neurochem., 47, 987-997.

28 - MORRISON, M.R., PARDUE, S., MASHHOFF, K., GRIFFIN, W.S.T., WHITE, C.L., GILBERT, J. and ROSES, A.D. (1987).

Brain messenger RNA level and ribonuclease activity in Alzheimer's disease.

Biochem Soc Trans, 15, 133-134.

29 - MASCHHOFF, K., WHITE, C.L., JENNING, L.W., MORRISON-BOGORAD, M.R (1989).

Ribonuclease activities and distribution in Alzheimer's and control brains

J. Neurochem. 52, 1071-1078.

30 - ZAIN, B.S., SALIM, M., CHOU, W-G., SAJDEL-SULKOVSKA, E. M., MAJOCHA, R.E. and MAROTTA, C.A. (1988)

Molecular cloning of amyloid cDNA derived from mRNA of the Alzheimer disease brain : coding and noncoding regions of the fetal precursor mRNA are expressed in the cortex

Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 85, 929-933.

31 - MAROTTA, C, MAJOCHA, R.E., COUGHLIN, J.F., MANZ, H.J., DAVIES, P., VENTOSA-MICHELMAN, M., CHOU, W-G, ZAIN, B.S. and SAJDEL-SULKOVSKA, E. (1986)

Transcriptional and translational regulatory mechanism during normal aging of the mammalian brain and in Alzheimer's disease.

Swaab, D.F., Fliers, E., Mirmiran, M, Van Gool, W.A. and Van Haaren, F. (ed)

Progress in Brain Research, 70, 303-320.

32 - SAJDEL-SULKOVSKA, E. MANZ, H., BURNSIDE, E. and MAROTTA, C. (1989)

RNA Synthesis in distinct regions of postmortem Alzheimer brain in Twentieth annual meeting of American Society for Neurochemistry, 107.

33 - MAJOCHA, R.E., SAJDEL-SULKOWSKA, E.M, RODENRYS, A., VENTOSA-MICHELMAN, M. and MAROTTA, C.A. (1987).

Loss of alkaline ribonuclease inhibitor protein associated with Alzheimer neuronal degeneration.

Soc. Neurosci. Abstr., 13, 819.

34 - JONES, L.M., and KNOWLER, T. (1989)

Role of ribonuclease and ribonuclease inhibitor activities in Alzheimer's disease.

J. Neurochem., 53, 1341-1344.

35 - LANGSTROM, N.S., ANDERSON, J.P., LINDROS, H.G., WINBLAD, B. and WALLACE, W.C. (1989)

Alzheimer's disease-associated reduction of polysomal mRNA translation.

Molec. Brain Res., 5, 259-269.

36 - SHORTMAN, K. (1961)

Studies on cellular inhibitors of ribonuclease, I.. The assay of the ribonuclease inhibitor system and the purification of the inhibitor from rat liver.

Biochim. Biophys. Acta, 51, 37-49.

37 - ROTH, J.S. (1958)

Ribonucleases. VII. Partial purification and characterization of a ribonuclease inhibitor in rat liver supernatant fractions.

J. Biol. Chem., 231, 1085-1095.

38 - ROTH, J.S. (1956) Ribonuclease V. Studies on the properties and distribution of ribonuclease inhibitor in the rat.

Biochim. Biophys. Acta 21, 34-43.

39 - BLACKBURN, P. and MOORE, S. (1982)

Pancreatic ribonuclease

The Enzymes, vol XV, pp 317-433.

40 - BLOEMENDAL, H and JANSEN, K. (1988)

Detection of RNase inhibitor from different species and organs.

Biochim. Biophys. Acta, 966, 117-121.

- 41 - BURTON, L.E., BLACKBURN, P and MOORE, S. (1980)
Ribonuclease from bovine brain.
Int. J. Peptide Protein Res. 16, 359-364.
- 42 - BURTON, L.E., FUCCI, N.P. (1982)
Ribonuclease inhibitor from the liver of five mammalian species.
Int. J. Peptide Protein Res., 19, 372-379.
- 43 - PIROTTE, M. et DESREUX, U. (1952)
Distribution de la ribonucléase dans les extraits de granules cellulaires du foie.
Bull. Soc. Chim. Belge, 61, 1396-1401.
- 44 - KRAFT, N. and SHORTMAN, K. (1970)
The phylogeny of the ribonuclease-ribonuclease inhibitor system : its distribution in tissues and its response during leukemogenesis and aging.
Austr. J. Biol. Sci., 23, 175-184
- 45 - MALICKA-BLASKIEWICZ, M and KUBICZ, A. (1981)
The RNase-RNase inhibitor system in the liver of the frog *Rana esculenta*; subcellular distribution and differential binding of inhibitor with multiple RNases.
Acta Physiol. Pol., 317-326.
- 46 - DIJKSTRA, J., TOUW, J., HALSELMA, I., GRUBER, M. and AB, G. (1978)
Estadiol-induced synthesis of vitellogenin : IV. The isolation of non-degraded polysomes from avian liver using an endogenous ribonuclease inhibitor.
Biophys. Biochim. Acta, 521, 363-373.
- 47 - SHORTMAN, K. (1962)
Studies on cellular inhibitors of ribonuclease II. Some property of the inhibitor from rat liver.
Biochim. Biophys. Acta, 55, 88-96.

- 48 - GRIBNAU, A.A.M., SCHOENMAKERS, J.G.G. and BLOEMENDAL, H. (1969)
Purification of rat liver RNase inhibitor and its effect on polyribosome integrity.
Arch Biochem Biophys, 130, 48-52.
- 49 - GRIBNAU, A.A.M., SCHOENMAKERS, J.G.G., VAN KRAAIKAMP, M. and BLOEMENDAL, H. (1970)
High purification of the RNase inhibitor from rat liver by affinity chromatography
Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 1064-1068.
- 50 - GRIBNAU, A.A.M., SCHOENMAKERS, J.G.G., VAN KRAAIKAMP, M., HILAK, M. and BLOEMENDAL, H. (1970).
Further studies on the ribonuclease inhibitor from rat liver: stability and other properties.
Biochim. Biophys. Acta, 224, 55-62.
- 51 - TAKAHASHI, Y., MASE, K. and SUZUKI, K. (1970)
Purification and characterisation of RNase inhibitor from pig cerebral cortex.
J. Neurochem. 17, 1433-1440.
- 52 - TAKAHASHI, Y., MASE, K. and SUZUKI, K. (1967)
Purification of ribonuclease inhibitor from pig cerebral cortex.
Separatum Experimentia, 25, 525.
- 53 - BRODY, S. (1957).
Ribonuclease activity and cellular growth.
Biophys. Biochim. Acta, 24, 502-506.
- 54 - BLACKBURN, P., WILSON, G. and MOORE, S. (1977)
Ribonuclease inhibitor from human placenta purification and properties.
J. Biol. Chem. 252, 5904-5910.

55 - BLACKBURN,P.(1979)

Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay.

J. Biol. Chem.,254, 24, 12484-12487.

56 - SCHNEIDER,R., SCHNEIDER-SCHERZER,E., THURNHER,M., AUER,B. and SCHWEIGER,M. (1988)

The primary structure of human ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI) disclose a novel highly diversified protein superfamily with a common repetitive module.

EMBO J ,7,4151-4156.

57 - LEE,F.S, FOX,E.A., ZHOU,H.M., STRYDOM,D.J., and VALLEE,B.L. (1988)

Primary structure of human placental ribonuclease inhibitor
Biochemistry ,27, 8545-8553.

58 - LEE,F.S., AULD,D.S.and VALLEE,B.L. (1989)

Tryptophane fluorescence as a probe of placental ribonuclease inhibitor binding to angiogenin.

Biochemistry , 28, 219-224.

59 - LEE,F.S, SHAPIRO,S. and VALLEE,B. L.(1989)

Tight binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor.

Biochemistry, 28, 225-230.

60 - TURNER,P.,LEREA,K. M. and KULL,F.J. (1983)

The ribonuclease inhibitors from porcine thyroid and liver are slow, tight-binding inhibitors of bovine pancreatic ribonuclease A.

Biochem. Biophys. Res. Commun.,114,1154-1160.

61 - MORRISON,J.F. (1982)

The slow binding and slow tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions.

Trends Biochem. 7, 102-105.

62 - MORRISON, J.F. and WALSH, C.T. (1988)

The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors

Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 61, 201-301.

63 - LOPEZ, J.A., CHUNG, D.W., FUJIKAWA, K., HAGEN, F.S. and ROTH, G.J (1988)

The α and β chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucine-rich amino sequence.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2135-2139.

64 - TAKAHASHI, N., TAKAHASHI, Y. and PUTNAM, F.W. (1985).

Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich alpha-glycoprotein of human serum.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 1906-1910.

65 - KRUSIUS, T. and RUOSLAHTI, E. (1986)

Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7683-7687.

66 - KATAOKA, T., BROEK, D. and WIGLER, M. (1985)

DNA sequence and characterization of the cerevisiae gene encoding adenylate cyclase.

Cell, 43, 493-505.

67 - DAY, A., McQUILLAN, C.I., TERMINE, J.D. and YOUNG, M.R. (1987)

Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for small proteoglycan II of bovine bone.

BIOCHEM. J., 248, 801-805.

68 - REINKE, R., KRANTZ, D.E., YEN, D., and ZIPURSKY, S.L. (1988)
Chaoptin, a cell surface glycoprotein required for
drosophila photoreceptor cell morphogenesis, contains a
repeat motif found in yeast and human.
Cell, 52, 291-301.

69 - HASHIMOTO, C., HUDSON, K.L. and ANDERSON, K.V. (1988)
The toll gene of drosophila, required for dorso-ventral
embryonic polarity, appears to encode a transmembrane
protein.
Cell, 52, 269-279.

70 - BOGUSKI, M.S., ELSHOUBAGY, N., TAYLOR, J.M. and
GORDON, J.I. (1984)
Rat apolipoprotein A-IV contains 13 tandem repetitions of a
22 amino-acid segment with amphipathic helical potential.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5021-5025

71 - BEINTEMA, J.J., SCHULLER, C., IRIE, M. and CARSANA, A.
(1988)
Molecular evolution of the ribonuclease superfamily.
Prog. biophys. molec. biol., 51, 165-192.

72 - JONES, W. (1904) Uber das enzym der Thymudruse. Z.
Physiol. Chem., 41, 101-108.

73 - ROTH, J.S. (1963)
Ribonuclease activity and cancer : a review.
Cancer Res., 23, 637-666.

74 - ROTH, J.S. (1967)
Some observations on the assay and the properties of
ribonuclease in normal and tumor tissues. in : Methods in
cancer research, vol 3, chapter V, H Busch, Academic Press,
153-242.

- 75 - LAWFORD, G.R., LANGFORD, P. and SCHACHTER, H. (1966)
The inhibition of rat liver polyribosome breakdown in the presence of liver supernatant.
J. Biol. Chem., 241, 1835-1839.
- 76 - GAUTHIER, D. and VEN MURTHY, M.R. (1987)
Efficacy of RNase inhibitors during brain polysome isolation.
Neurochem. Res., 12, 335-339.
- 77 - SCHEELE, G. and BLACKBURN, P. (1979)
Role of mammalian RNase inhibitor in cell-free protein synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4898-4902.
- 78 - EICHLER, D.C., TATAR, T.F. and LASATER, L.S. (1981)
Effect of human placental inhibitor in cell-free ribosomal RNA synthesis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 396-403.
- 79 - KRAFT, N. and SHORTMAN, K. (1970)
A suggested control function for the animal tissue Ribonuclease-Ribonuclease inhibitor system, based on studies of isolated cells and phytohaemagglutinin-transformed lymphocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 217, 164-175.
- 80 - FOMINAYA, J.M., GARCIA-SEGURA, J.M. and GAVILANES, J.G. (1988)
Ribonuclease-RNAase inhibitor complex from rat testis. Purification of the RNAase inhibitor.
Biochim. Biophys. Acta, 954, 216-223.
- 81 - BREWER, E.N., FOSTER, L.B. and SELLS, B.H. (1969)
A possible role for ribonuclease in the regulation of protein synthesis in normal and hypophysectomized rats.
J. Biol. Chem., 244, 1389-1392.

82 - QUIRIN-STRICKER,C., GROSS,M. and MANDEL,P.(1968)
Influence d'une carence en protéines sur l'activité des
ribonucléases et sur celles de leur inhibiteur dans le foie
de rat.

Biochim. Biophys. Acta, 159, 75-80.

83 - ZAN-KOWALCZEWSKA, M and ROTH, J.S. (1975)
On the similarity between ribonuclease inhibitor and β -
estradiol receptor protein

Biochem. Biophys. Res. Commun.,65,833-837.

84 - ALBERGINA, M., and GIUFRRIDA STELLA , A. M. (1988)
Age related changes of ribonuclease activities in various
regions of the rat central nervous system.

J. Neurochem., 51, 21-24.

85 - BLACKBURN,P. and JAILKHANI,B.J. (1979)
Ribonuclease inhibitor from human placenta : interaction
with derivatives of ribonuclease A.

J. Biol. Chem. 254, 12488-12493.

86 - BLACKBURN,P. and GAVILLANES,J.G. (1980)
The role of lysine-41 of Ribonuclease A in the interaction
with Rnase inhibitor from human placenta.

J. Biol. Chem. 255, 10959-10965.

87 - BLACKBURN,P. and GAVILANES,J.G. (1982)
Identification of lysine residues in the binding domain of
ribonuclease A for the RNase inhibitor from human placenta.

J. Biol. Chem. 257, 316-321.

88 - FETT,J.W., STRYDOM,D.J., LOBB,R.R., ALDERMAN,E.M.,
LEMUEL BETHUNE,J., RIORDAN,J.F. and VALLEE,B.L. (1985)
Isolation and characterization of angiogenin,an angiogenic
protein from human carcinoma cells.

Biochemistry,24,5480-5486.

89 - STRYDOM, D.J., FETT, J.W., LOBB, R.R., ALDERMAN, E.M., LEMUEL BETHUNE, J., RIORDAN, J.F. and VALLEE, B.L.(1985). Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin. Biochemistry, 24, 5486-5494.

90 - KURACHI, K., DAVIE, E.W., STRYDOM, D.J., RIORDAN, J.F., and VALLEE, B.L. (1985) Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor. Biochemistry, 24, 5494-5499.

91 - SHAPIRO, R. and VALLEE, B.L. (1987) Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. Biochemistry, 84, 2238-2241.

92 - LEE, F.S and VALLEE, B.L (1990) Modular mutagenesis of human placental ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1879-1883.

93 - LEE, F. S. and VALLEE, B.L. (1990) Kinetic characterization of two active mutant of placental ribonuclease inhibitor that lack internal repeats. Biochemistry, 29, 6633-6638.

94 - BOND, M.D. and VALLEE, B.L. (1990) Replacement of residues 8-22 of angiogenin with 7-21 of RNase A selectively affects protein synthesis inhibition and angiogenesis. Biochemistry, 29, 3341-3349.

95 - HOFSTEENGE, J., KIEFFER, B., MATTHIES, R., HEMMINGS, B.A. and STONE, S. R. (1988) Amino acid sequence of the ribonuclease inhibitor from porcine liver reveals the presence of leucine-rich repeats. Biochemistry, 27, 8537-8544.

- 96 - VINCENTINI, A.M., KIEFFER, B., MATTHIES, R., MEYHACK, B., HEMMING, B.A., STONE, S.R. and HOFSTEENGE, J. (1990)
Protein chemical and kinetic characterization of recombinant porcine ribonuclease inhibitor expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochemistry, 29, 8827-8834.
- 97 - HOFSTEENGE, J., VINCENTINI, A. and STONE, S.R. (1991)
Purification and characterization of truncated ribonuclease inhibitor.
Biochem. J. 275, 541-543.
- 98 - SHAPIRO, R. and VALLEE, B.L. (1991)
Interaction of human placental ribonuclease with placental ribonuclease inhibitor.
Biochemistry, 30, 2246-2255.
- 99 - HAMMAN, K.J., BARKER, R.L., LOEGERING, D.A., PEASE, L.R. and GLEICH, G.J. (1989)
Sequence of human eosinophil-derived neurotoxin cDNA : identity of deduced amino acid sequence with human nonsecretory ribonucleases.
Gene, 83, 161-167.
- 100 - BEINTEMA, J.J., HOFSTEENGE, J., IWAMA, M., MORITA, T., OHGI, K., IRIE, M., SUGIYAMA, R.H., SCHIEVEN, G.L., DEKKER, C.A., and GLITZ, D.G. (1988).
Amino acid sequence of the nonsecretory ribonuclease of human urine.
Biochemistry, 27, 4530-4538.
- 101 - ALLINQUANT, B. MUSSENGER, C. and SCHULLER, E. (1984)
Intrathecal origin of CSF ribonuclease.
Acta. Neurol. Scand. 70, 12-19.

- 102 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J. (1951)
Protein measurement with folin phenol reagent.
J. Bio. Chem., 193, 265-275.
- 103 - TOWBIN, H., STAEBELIN, T. and GORDON, J. (1979).
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 4350-4354.
- 104 - STERNBERGER, L.A. (1979)
Immunochemistry. Wiley, New-York, pp 104-169.
- 105 - YASUNA, H and GOTO, S. (1986)
Activation of latent RNase by antibodies against rat liver RNase inhibitor.
Biochim. Biophys. Acta, 874, 220-226.
- 106 - LAEMMLI, U.K . (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680-6854.
- 107 - OHE, Y., HAYASHI, M. and IWAI, K. (1979)
Human spleen histone H2B.
J Biochem. (Tokyo), 615-624.
- 108 - MANIATIS, T., FRITSCH, E, F. and SAMBROOK, J. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 109 - DAVIS (1981)
Molecular biology methods. A handbook. Freeman pub.

- 110 - GUAN,K.L and DIXON,J.E.(1991).
Eukaryotic proteins expressed in E.Coli : an improved
Thrombin cleavage and purification procedure of fusion
proteins with Glutathione S-transferase.
Anal. Biochem., 192, 262-267
- 111 - CRESTFIELD,A.M., STEIN,W.H. and MOORE,S. (1963)
Properties and conformation of the histidine residues at the
active site of ribonuclease.
J. Biol. Chem, 238,7, 2421-2428.
- 112 - RICHARDS,F.M. and WICKOFF,H.W.(1971)
The Enzymes, 3rd. ed., Vol IV, p.647.
- 113 - TORCHINSKII,Y.M.(1974)
Sulfhydryl and disulfide groups of proteins (Dixon, H.B.F.,
Transl.) pp 212-214, Plenum, New York.
- 114 - KRAHN,J. and STEVENS,F.C. (1970).
Lima bean Trypsin inhibitor. Limited proteolysis by Trypsin
and Chymotrypsin.
Biochemistry 9, 2646-2652.
- 115 - GREEN,N.M (1953)
Competition among trypsin inhibitors
J. Biol. Chem.205, 535-542
- 116 - GREEN,M.N. and WORK,E. (1953)
Pancreatic trypsin inhibitor. _ 2.Reaction with trypsin.
Biochem. J. 54, 347-354.
- 117 - FOMINAYA,J.M., GARCIA-SEGURA,J.M., FERRERAS,M. and
GAVILANES,J.G.(1988)
Theoretical treatment of tight-binding inhibition of an
enzyme.
Ribonuclease inhibitor as special case..
Biochem. J. 253, 517-522 .

118 - BRESLOW, E. and GIROTTI, A.W. (1966)
The interaction of ribonuclease with metal ions
Studies of cupric and zinc ions and the effect of cytidylic
acid.

J. Biol. Chem., 241,23,5651-5660.

119 - BRESLOW, R., DEENG-LIH HUANG, and ANSLYN, E. (1989)
On the mechanism of action of ribonucleases : dinucleotide
cleavage catalysed by imidazole and Zn ++

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86,1746-1750.

120 - ALGER, T.D. (1970)

Copper(II) and manganese (II) effects on ribonuclease A
activity.

Biochemistry 9, 3248

121 - GHISO, J. TAGLIAVINI F., TIMMERS W.F., FRANGIONE B.
(1989).

Alzheimer's disease amyloid precursor protein is present
in senile plaques and cerebrospinal fluid.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 163 430-437.

122 - JOACHIM C.L., MORI H., SELKOE D.J. (1989)

Amyloid β -protein deposition in tissues other than brain in
Alzheimer's disease.

Nature, 341,226-230.

123 - CHO SUNGWOO. and JOSHI, J.G. (1989)

Ribonuclease from pig brain : purification,
characterisation, and direct spectrophotometric assay.

Anal. biochem., 176,175-179.



Résumé

L'étude de 29 cerveaux provenant de patients décédés de la maladie d'Alzheimer, n'a pas fait apparaître de corrélation significative entre le degré de détérioration mentale des malades et l'activité de l'inhibiteur de la ribonucléase alcaline cérébrale, dans le cortex et le cervelet. Un anticorps dirigé contre l'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase n'a pu permettre de déceler l'inhibiteur cérébral dans ces mêmes cerveaux.

Parallèlement, la recherche d'un fragment de l'inhibiteur placentaire humain de la ribonucléase, responsable de son activité a été réalisée. A partir d'un extrait placentaire, précipité au sulfate d'ammonium, l'inhibiteur a été purifié en une seule étape de chromatographie d'affinité en modifiant un protocole. L'hydrolyse trypsique de cette protéine a permis d'isoler après CLHP en phase inverse, trois fractions capables d'inhiber la ribonucléase pancréatique bovine A. La composition en acides aminés de ces fractions a révélé que l'une d'entre-elles correspondait à un peptide trypsique de 15 acides aminés de séquence ELSLAGNELGDEGAR, une deuxième fraction correspondait à deux peptides adjacents non hydrolysés par la trypsine. Le peptide de 15 acides aminés a été synthétisé, et caractérisé cinétiquement. Il possède un K_i de 6×10^{-15} M, et les techniques enzymatiques utilisées ont permis de lui attribuer un type d'inhibition non-compétitif. En de nombreux points, ce peptide se comporte comme l'inhibiteur placentaire natif.

Par ailleurs un fragment du gène a été isolé d'une banque d'ADNc à l'aide de la technique de la Pcr. Ce fragment de 500 pb a été séquencé, il possède la séquence codant pour le peptide de 15 acides aminés étudié cinétiquement. Cette région du gène de l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase a donc été sous-clonée dans un système qui permettra de la faire s'exprimer sous forme d'une protéine de fusion.