

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE  
UFR DE BIOLOGIE

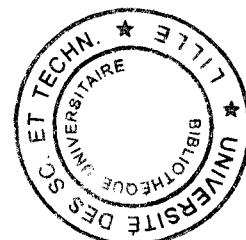
Année 1998

n° d'ordre:

# THESE

Présentée pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université en  
Sciences de la Vie et de la Santé

par



VINCENT CHOPIN

Caractérisation biochimique et moléculaire  
d'inhibiteurs de sérine-protéases  
de la sangsue *Theromyzon tessulatum*.  
Détermination de leur activité biologique

Présentée le 9 Février 1998 devant la commission d'examen:

Président : Professeur J. MALECHA

Rapporteurs : Docteur J.-L. BAERT  
Docteur L. SCHOOPS

Examinateur : Professeur M. SALZET

## **Remerciements**

Je revoie la scène du célèbre film « African Queen », où Humphrey Bogart, au fond d'un marais s'exclame : « S'il y a bien une chose que je haie au monde, ce sont les sangsues, ces petites bêtes immondes! ». Eh oui, c'est par une matinée de septembre 1993 que je suis allé voir de plus près ces créatures repoussantes qui allaient devenir mon « matériel biologique » au sein de l'équipe du Pr. Malecha que je remercie de m'avoir permis de travailler dans son laboratoire. Son aide et ses précieux conseils notamment lors de la rédaction de cette thèse furent très appréciés.(de plus je tiens à signaler que la relation ornithologue-chasseur, c'est possible!).

Je remercie les Dr. J-L Baert et L Schoofs d'avoir bien voulu accorder un peu de leur temps à la lecture de ce travail. Je suis sensible au fait qu'ils aient accepté de le juger.

Je remercie Michel Salzet d'avoir pris le risque de m'encadrer, de sa confiance et de l'indépendance qu'il m'a accordées à la paillasse, ainsi que pour son aide et ses conseils lors de la rédaction des articles. (au fait, malgré l'investissement que tu as réalisé dans un portable, il est toujours aussi difficile de te joindre).

Je remercie Claude Cocquerelle (notre Dr Green !!) d'avoir pris le temps de m'aider et de m'expliquer mes premières « manips. de Bio.Mol », pour ses conseils et ses encouragements quant à l'obtention de bandes ou de spots tant espérés, et de m'avoir supporté pendant un an dans le même bureau (et je te promets que la prochaine fois je t'emmènerai au Macumba).

Je remercie le Dr Kerckaert pour le stage que j'ai réalisé dans son laboratoire. J'y ai appris de nombreuses techniques, je lui en suis très reconnaissant. Un grand merci à Marie Paule Hildebrandt qui a eu la patience de m'expliquer et de m'initier aux phages, aux plasmides, aux bactéries etc... (tu as résisté à mes multiples questions: Pourquoi?, comment ça marche? etc... C'étaient mes premiers pas!). De plus, je remercie aussi tous les membres de l'U 124 que j'ai côtoyé (Maude, Claude, etc...). Je garderai un merveilleux souvenir de ce stage.

Je remercie les Dr. Sautière et Bullet pour la détermination de la séquence en acides aminés des différents inhibiteurs, ainsi que le Dr. Van Dorsselaer pour la spectrométrie de masse réalisée sur ces molécules.

Laurence, chère collègue d'enseignement des travaux pratiques de B.A (Typhlosolis, apodèmes sternaux, corselet!!!), je te remercie pour tes multiples

coup de main au Macintosh (Laurence, t'as 5 minutes!) et de ton dévouement lors de la dernière ligne droite de la rédaction de cette thèse. (Au fait, pourrais tu me filer un peu de ton pKS?!). De même je remercie Pierre-Eric pour ses explications de « Canvas » tout en lui précisant que je ne suis plus un handicapé du clavier (EH TOC!).

Merci à Béatrice Bocquet pour son sourire matinal, son dynamisme et pour les nombreux échanges de paillasse (De la Taq contre du marqueur de taille, une culture de lancée contre des places sur le gel de séquence etc...).

J'ai beaucoup apprécié (lors de mon état « Speed<sup>10</sup> ») l'aide de Béatrice Salzet, d'Isabel et d'Annie lors de la mise en page de cette thèse. De plus, les différents services réalisés par Annie lors de cette thèse ont été très appréciés.

Enfin, je remercie tous les membres du labo pour leur sympathie et les fous rires partager au café (mis à part les conversations sur les chats).

## **ABBREVIATIONS**

MES :	2 -(N-Morpholino) ethanesulfonic acid.
DEPC :	Diéthylpyrocarbonate.
BET :	Bromure d'éthidium.
BSA :	Serum albumin bovine.
DTT :	Dithiothréitol.
X-gal :	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside.
IPTG :	Isoproyl-β-D-thiogalactoside.
PCR :	Polymerase Chain Reaction.
RT PCR :	Retro-Transcription Polymerase Chain Reaction.
ADNc :	Acide DésoxyriboNucléotidique complémentaire.
ARN :	Acide ribonucléotidique.

**CODES DE 3 ET DE 1 LETTRES UTILISES POUR LA DENOMINATION  
DES ACIDES AMINES.**

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Acide pyroglutamique	pGlu	pQ
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Méthionine sulfoxyde	Met(O)	M(O)
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

# SOMMAIRE

	Page
<b>Introduction</b>	1
<b>Généralités</b>	6
I - Le matériel biologique	6
A - Systématique et morphologie	6
1. Les Arhynchobdelles	6
2. Les Rhynchobdelles	7
B - Theromyzon tessulatum	7
II - Les mécanismes de la coagulation	9
A - L'hémostase primaire	9
1. Les différents paramètres	9
a) La paroi vasculaire	9
b) Les plaquettes	9
c) Le facteur Willebrand	9
d) Le fibrinogène	10
2. Mise en jeu des différents paramètres	10
B - La coagulation	10
1. La voie extrinsèque	11
2. La voie intrinsèque	11
a) Activation des facteurs « contact »	11
b) La cascade enzymatique	11
c) Interaction avec l'hémostase primaire	11
d) La fibrinoformation	11
e) Les inhibiteurs physiologiques	12
3. La fibrinolyse	12
C - Les traitements cliniques	13
1. Les thrombolytiques	13
2. Les anticoagulants	13
a) Les héparines	13
b) Les coumariniques	14
c) Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaires	14

<b>III - Les anticoagulants chez les animaux hématophages</b>	<b>15</b>
<b>A - Les inhibiteurs de la thrombine</b>	<b>15</b>
1. Des sangsues	15
a) <i>Hirudo medicinalis</i>	15
b) <i>Hirudinaria manillensis</i>	17
c) <i>Haemadipsa sylvestris</i>	17
2. Des autres animaux hématophages	17
a) Les tiques	17
b) Les punaises	17
c) Les mouches	18
<b>B - Les inhibiteurs du facteur Xa</b>	<b>18</b>
1. Des sangsues	18
a) <i>Haementeria officinalis</i>	18
b) <i>Haementeria ghiliani</i>	19
2. Des autres animaux hématophages	19
a) Les tiques	19
b) Les moustiques	19
c) Les nématodes	19
<b>C - Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire</b>	<b>20</b>
1. Des sangsues	20
a) <i>Hirudo medicinalis</i>	20
b) <i>Haementeria officinalis</i>	20
c) <i>Macrobdella decora</i>	21
d) <i>Placobdella ornata</i>	21
2. Des autres animaux hématophages	21
<b>D - Les molécules intervenant dans la fibrinolyse</b>	<b>22</b>
1. Des sangsues	22
2. Des autres animaux hématophages	22
 <b>IV - Les autres inhibiteurs de protéases des sangsues</b>	<b>23</b>
<b>A - Hirudo medicinalis</b>	<b>23</b>
1. Les bdellines	23
2. Les églines	23
3. L'hirustasine	23
4. La LDTI	23
<b>B - Hirudo nipponia</b>	<b>24</b>
1. La bdelline-KL	24
2. La guamérine	24

C - Hirudinaria manillensis	24
D - Whitmania edentula	24

## Résultats

<u>Inhibiteurs de la coagulation.</u>	26
---------------------------------------	----

<u>Article (1): Matias, I., Chopin, V., Baert, J.L., Salzet, M. et Malecha, J.</u>	27
--	----

Amino-acid-sequence determination and biological activity of Theromin: a novel thrombin inhibitor isolated from the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum* (en vue de dépôt de brevet).

<u>Article (2): Chopin, V., Salzet, M., Baert, J.L., Sautière, P., Kerckaert,</u>	43
---	----

J.P., Malecha, J.

Amino-acid-sequence determination and molecular cloning of Therostasin: a novel factor Xa inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum* (en vue de dépôt de brevet).

<u>Inhibiteurs de protéases agissant sur la matrice extracellulaire.</u>	53
--	----

<u>Article (3): Chopin, V., Bilfinger, V.T., Stefano, G.B., Matias, I.,</u>	54
---	----

Salzet, M

Amino-acid-sequence determination and biological activity of cytin, a naturally occurring specific chymotrypsin inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Eur. J. Biochem.* (1997) 209, 733-738.

<u>Article (4): Chopin, V., Stefano, G.B., Salzet, M.</u>	57
---	----

Biochemical evidence of specific trypsin-chymotrypsin inhibitors in the rhynchobdellid leech, *Theromyzon tessulatum*. *J. Enzyme Inhibition.* (1997). Sous presse.

<u>Article (5): Chopin, V., Matias, I., Stefano, G.B., Salzet, M</u>	73
Amino-acid-sequence determination and biological activity of therin, a naturally occurring specific trypsin inhibitor from the leech <i>Theromyzon tessulatum</i> . Soumis à <i>Eur. J. Biochem.</i>	
<u>Article (6): Chopin, V., Stefano, G.B., Salzet, M.</u>	86
Amino-acid-sequence determination and biological activity of tessulin, a naturally occurring trypsin-chymotrypsin inhibitor isolated from the leech <i>Theromyzon tessulatum</i> . Soumis à <i>Eur. J. Biochem.</i>	
<u>Résultats récents</u>	105
<b>Discussion et conclusion</b>	107
<b>Méthodes</b>	113
I - Méthodes biochimiques	113
A - Préparation du matériel	113
B - Tests chromogéniques	113
1. L'activité inhibitrice	113
2. Détermination de la constante d'inhibition	114
C - Méthodes chromatographiques	114
1. Chromatographie de gel filtration	114
2. Chromatographie d'échange d'ions	114
3. Chromatographie liquide à haute performance	115
D - Dosage des protéines	115
E - Electrophorèse	115
1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	115
2. Révélation	116
a) Bleu de Coomassie	116
b) Nitrate d'argent	116
.. Détermination de la masse moléculaire des protéines en SDS-page	116

4. Electrophorèse capillaire	116
F - Caractérisation biochimique	117
1. Composition en acides aminés	117
2. Réduction et pyridyléthylation	117
3. Microséquençage	117
4. Digestion enzymatique	117
5. Spectrométrie de masse	118
 II - Méthodes de biologie moléculaire	118
A - Extraction des ARN totaux	118
1. Précautions indispensables	118
2. Extraction des ARN totaux	118
B - Amplification enzymatique par la réaction de PCR	119
1. RT-PCR	119
a) Synthèse des ADNc	119
b) Amplification enzymatique par PCR	120
c) Vérification de l'amplification	120
C - Clonage des produits de PCR	121
1. Purification de l'ADN d'intérêt	121
2. Ligation des produits de PCR	121
3. Transformation bactérienne	122
a) Bactéries compétentes	122
b) Transformation par un plasmide	122
4. Sélection des colonies et vérification du clonage	122
D - Préparation de l'ADN plasmidique	123
E - Séquençage	123
F - Criblage d'une banque d'ADN complémentaire	123
1. Marquage avec un radio-isotope de sondes doubles brins	124
2. Etalement et repérage des clones	124
3. Hybridation par une sonde double brins homologue	124
4. Lavages	124
5. Isolement des clones	125
6. Extraction de l'ADN phagique	125
G - Sous clonage des inserts	126
1. Préparation du vecteur	126
a) digestion enzymatique	126
b) Déphosphorilation	126
2. Préparation de l'insert	126

**Annexe**

127

**Bibliographie**

130

L'utilisation des sanguins dans un but thérapeutique a connu des fortunes diverses au cours de l'histoire de la médecine (Malecha, 1990). Utilisées déjà il y a trois mille ans en Asie pour les saignées locales, les sanguins vont devenir d'un emploi systématique avec Pline l'Ancien (23 à 79 après J-C) qui conseille leur utilisation dans le traitement des phlébites et des hémorroïdes. Au XVII<sup>e</sup> et XVIII<sup>e</sup> siècle, son emploi a disparu car la saignée triomphe et ne laisse à la sangsue qu'une part modeste. C'est vers le début du XIX<sup>e</sup> siècle que la sangsue a connu l'apogée de son utilisation quand Broussais (1772-1838) en délimite les indications et démontre que le traitement à l'aide de sanguins est plus efficace que la saignée. A l'époque, les sanguins sont utilisées en grande quantité; pas moins de 45 millions de sanguins sont importées en France en 1829. Pasteur mit fin à cet engouement car la sangsue est apparue comme un remarquable vecteur de germes (Henriot *et al.*, 1990).

Si quelques médecins français utilisent encore les sanguins, disponibles dans certaines pharmacies, le dernier centre d'hirudiniculture français à Audenge (Gironde), consacre sa production aux chirurgiens plasticiens et à l'industrie pharmaceutique. En effet, certains chirurgiens se sont intéressés à l'application locale des sanguins pour pallier les difficultés du rétablissement du retour veineux dans le cas des greffes reconstructives (doigt, oreille...). Par leur effet de succion, les sanguins favorisent l'anastomose des capillaires entre les faces d'une blessure lorsque la suture est techniquement impossible. Les hyaluronidases et les collagénases « ouvrent le tissu » et la circulation capillaire est maintenue par évacuation du sang et l'injection d'anticoagulants, d'agents anti-agrégants et de substances vasodilatatrices (Eldor *et al.*, 1996).

Cet arsenal de substances qui préviennent la coagulation du sang est d'une importance vitale pour ces sanguins hématophages puisque sans elles, le sang ingéré coagulerait et rendrait tout déplacement impossible.

L'extraction de ces substances actives s'est avéré être un enjeu médical important. Cependant les recherches se sont souvent heurtées aux très faibles quantités présentes chez chaque animal. De plus certaines espèces ne sont pas disponibles en grand nombre. Actuellement, l'isolement et la caractérisation d'inhibiteurs de protéases chez les animaux hématophages se sont développés grâce aux progrès des techniques de purification des protéines et de clonage de l'ADN complémentaire. La production de ces protéines sous forme recombinée permet l'obtention de grandes quantités de substances actives permettant ainsi les investigations cliniques en vue d'une application thérapeutique rapide. De plus, ces protéines représentent un enjeu économique important. En effet, plusieurs inhibiteurs de la coagulation ou de la réponse immunitaire issues de sanguins hématophages font l'objet de la part de

différentes firmes pharmaceutiques de nombreuses études menées dans le plus grand secret (Sawyer, 1991).

L'une des premières applications envisagée est l'utilisation de leurs propriétés anticoagulantes dans la prévention des thromboses. En effet la thrombose, c'est-à-dire la formation d'un caillot dans un vaisseau sanguin, freine ou arrête la circulation du sang et l'irrigation des tissus. Elle est à l'origine de beaucoup de maladies cardio-vasculaires, premières causes de mortalité dans les pays industrialisés. Les thromboses artérielles peuvent être gravissimes lorqu'elles touchent des organes vitaux tels que les poumons (embolie pulmonaire), les reins (infarctus rénal), le cerveau (accident cérébrovasculaire), ou le cœur (infarctus du myocarde). Ces pathologies touchent environ cent vingt mille personnes chaque année en France et plus d'un million aux Etats Unis (Van de Werf *et al.*, 1991). La formation d'un thrombus est liée à 4 principaux protagonistes: 1) la lésion d'un vaisseau sanguin, 2) l'activation des plaquettes, 3) l'activation de la cascade de la coagulation, 4) une insuffisance de la capacité fibrinolytique. L'un des « challenges » de la médecine est de prévenir ces maladies cardio-vasculaires grâce à l'utilisation d'agents antithrombotiques et/ou thrombolytiques. Les agents thrombolytiques utilisés en médecine d'urgence, visent à dissoudre le caillot sanguin par l'activation du système fibrinolytique. Les activateurs du plasminogène sont actuellement utilisés mais ils entraînent de nombreuses complications, dont la plus fréquente et la plus redoutable est l'hémorragie. Il peut également apparaître des projections emboliques distales responsables d'aggravations transitoires ainsi que des traumatismes artériels (Joffre *et al.*, 1993).

Pour pallier ces problèmes, il vaut mieux opter pour la prévention en faisant appel à des agents antithrombotiques. Actuellement en milieu hospitalier, l'héparine est l'agent anticoagulant le plus utilisé. Pourtant l'héparine présente certains inconvénients, en effet elle nécessite la présence d'un cofacteur, elle est inefficace lorsque la thrombine, l'enzyme clef de la cascade de la coagulation, est liée à la fibrine, elle est inhibée par le facteur 4 plaquettaire, et elle peut induire une thrombopénie (Weitz *et Hirsh*, 1993). Ceci a donc incité la recherche d'autres agents antithrombotiques à partir de diverses sources naturelles. Parmi celles-ci, les animaux hématophages sont en tête de liste puisque la première molécule isolée fut l'hirudine. Les hirudines sont un groupe de polypeptides homologes extraits des glandes salivaires la sangsue *Hirudo medicinalis* (Markwardt *et al.*, 1967) et sécrétés lors de la morsure. Ces molécules ont une affinité forte et spécifique envers la thrombine et sont de ce fait de puissants anticoagulants. Elles inhibent la thrombine liée au caillot de fibrine et l'agrégation des plaquettes induite par la thrombine. Des hirudines recombinantes sont maintenant produites et leurs propriétés ont dans un premier temps été démontrées et

comparées à l'héparine dans différents types de pathologies expérimentales chez le chien et le cochon (Cannon *et* Braunwald, 1995). Actuellement, de nombreux essais cliniques de phase III sont réalisés avec l'hirudine qui est comparée à l'héparine dans le cas des thromboses veineuses profondes, des syndromes coronaires et comme adjuvant à la thrombolyse lors de l'infarctus du myocarde (Wallis, 1996). Les résultats obtenus à partir de ces essais pilotes montrent des avantages prometteurs sur les agents antithrombotiques couramment utilisés (Wallis, 1996). Mais du fait de sa demi-vie courte (inférieure à 1 heure par voie intraveineuse), l'hirudine ne peut avoir que des applications limitées et uniquement en milieu hospitalier. De plus, un inconvénient majeur à son utilisation est l'absence d'un antagoniste (Samama *et* Acar, 1993). La recherche d'autres molécules antithrombotiques reste donc d'actualité. Dans ces circonstances, il nous ait paru tout à fait intéressant de voir si notre modèle, la sangsue *Theromyzon tessulatum*, possède elle aussi un inhibiteur de la thrombine différent de l'hirudine compte tenu que *T.tessulatum* est une sangsue à trompe au contraire d'*H.medicinalis* qui est une sangsue à mâchoires. De plus notre modèle est un parasite des oiseaux aquatiques tandis qu'*H. medicinalis* parasite les mammifères.

Parmi les substances anticoagulantes utilisées par les animaux hématophages, se trouvent de nombreux inhibiteurs du facteur Xa. Le facteur Xa a une position importante dans la cascade de la coagulation puisqu'il se trouve au point de convergence de la voie intrinsèque et de la voie extrinsèque. L'avantage théorique des inhibiteurs du facteur Xa sur l'hirudine est lié au fait que leur utilisation n'empêche pas la production d'une petite quantité de thrombine qui est suffisante pour prévenir les risques hémorragiques. L'inhibition du facteur Xa pourrait donc devenir un nouveau principe prometteur du traitement antithrombotique. Chez la sangsue rynchobdelle *Haementeria officinalis*, un inhibiteur du facteur Xa nommé antistasine a été isolé (Tuszynski *et al.*, 1987). Cette molécule possède en plus une activité antimétastasique. En effet, administrée par voie intraveineuse à une souris le même jour qu'à l'inoculation de cellule cancéreuse, l'antistasine réduit le nombre et la taille des métastases pulmonaires. Les cellules tumorales possèdent une activité procoagulante qui peut activer directement le facteur Xa (Falanga *et* Gordon, 1985), et la formation des caillots de fibrine permet la séquestration des cellules tumorales logeant dans le lit vasculaire (Wood, 1974). La fibrine va protéger ces cellules tumorales par la formation d'une couverture imperméable au système immunitaire (Gorelik *et al.*, 1982). De ce fait l'antistasine, par son action inhibitrice sur le facteur Xa, empêche la formation de fibrine et prévient la formation de métastases. Dans ce contexte, compte tenu que *T.tessulatum* est également une sangsue rynchobdelle

comme *H.officinalis*, on pouvait supposer l'existence chez elle d'un inhibiteur du facteur Xa.

Parallèlement à la recherche d'anticoagulants chez les Hirudinées, s'est développée la recherche d'inhibiteurs de protéases agissant à la fois sur la matrice extracellulaire et sur la modulation de la réaction inflammatoire. En effet, ces dernières années il est devenu évident que les protéases jouent un rôle crucial dans de nombreuses pathologies telles que l'emphysème, l'arthrite, l'invasion tumorale, certaines infections et les maladies dégénératives (Roose *et Van Noorden.*, 1991). Du fait de la reconnaissance plus ou moins spécifique par les protéines d'une séquence définie d'acides aminés, il est possible d'inhiber ces enzymes lorsqu'elles sont impliquées dans un processus pathologique sans toucher à l'activité d'autres protéases. Par exemple, dans le cas de l'emphysème, la découverte d'une déficience en  $\alpha 1$  antitrypsine a offert de nouvelles perspectives dans la compréhension de cette maladie caractérisée par un élargissement et une destruction des alvéoles pulmonaires, résultant du déséquilibre entre les protéases pulmonaires et l'activité antiprotéase (Wulfsberg *et al.*, 1991).

Ces inhibiteurs de protéases connaissent depuis quelques années une utilisation thérapeutique importante. En cardiologie, lors de circulations extracorporelles, un inhibiteur de serine protéases, l'aprotinine, est utilisé en vue de diminuer la réaction inflammatoire pouvant entraîner un choc opératoire (Royston, 1996). L'aprotinine, isolée chez différentes espèces telles que l'anémone de mer, certains serpents et crustacés (Fritz *et al.*, 1983), correspond à un inhibiteur polyvalent de serine protéases impliquées dans les processus de l'inflammation et de l'hémostase.

La recherche d'agents anti-inflammatoires représente donc un enjeu économique important. Dans ce contexte, les sangsues hématophages correspondent à une source particulièrement intéressante de ce type d'inhibiteurs. En effet ces molécules sont utilisées par les sangsues pour se défendre contre les enzymes leucocytaires. Chez *H.medicina'is*, trois inhibiteurs polyvalents de la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et la cathepsine G ont été caractérisés, il s'agit des bdellines (Fritz *et al.*, 1969), de l'église (Seemüller *et al.*, 1977), et de l'hirustasine (Söllner *et al.*, 1994). La recherche de telles molécules chez *T.tessulatum* a également été l'une de nos priorités.

Notre travail, loin d'être exhaustif, démontre la présence de plusieurs molécules inhibitrices de protéases chez une même espèce *T.tessulatum*. Ces molécules ont été caractérisées biochimiquement et leurs activités biologiques ont été précisées. Pour certaines d'entre elles l'ADNc a été obtenu. De plus, nous avons essayé de comprendre

l'intérêt pour la sangsue d'utiliser conjointement tant de substances actives dont certaines redondantes pour une fonction très simple au premier abord: le repas de sang.

Les résultats sont présentés dans cette thèse sous la forme de publications, soit déjà éditées, soit soumises ou soit prêtes à être soumises lorsque les brevets concernant les molécules découvertes seront déposés. Ils sont précédés d'une présentation du matériel biologique, d'un rappel des mécanismes mis en jeu lors de la coagulation sanguine, de la description des inhibiteurs de protéases isolés chez les animaux hématophages et des premiers résultats obtenus avec ces inhibiteurs.

# I LE MATERIEL BIOLOGIQUE.

## A) SYSTEMATIQUE ET MORPHOLOGIE.

La classe des Hirudinées fait partie de l'embranchement des Annélides et est étroitement apparentée aux Oligochètes. Elle comporte 4 sous-classes d'après la révision de Sawyer (1986) :

- Agriodrilides avec une seule espèce endémique du lac Baïkal.

- Branchiobdellides: ce sont des espèces parasites des crustacés d'eau douce.

Ces deux sous-classes sont souvent rattachées aux Oligochètes (Harant et Grassé, 1959).

- Acanthobdellides: il s'agit d'un groupe de sangsues primitives, parasites permanents des poissons d'eau douce dans les régions boréales (Scandinavie et Sibérie). Elles sont considérées comme un groupe charnière entre les Oligochètes et les Hirudinées.

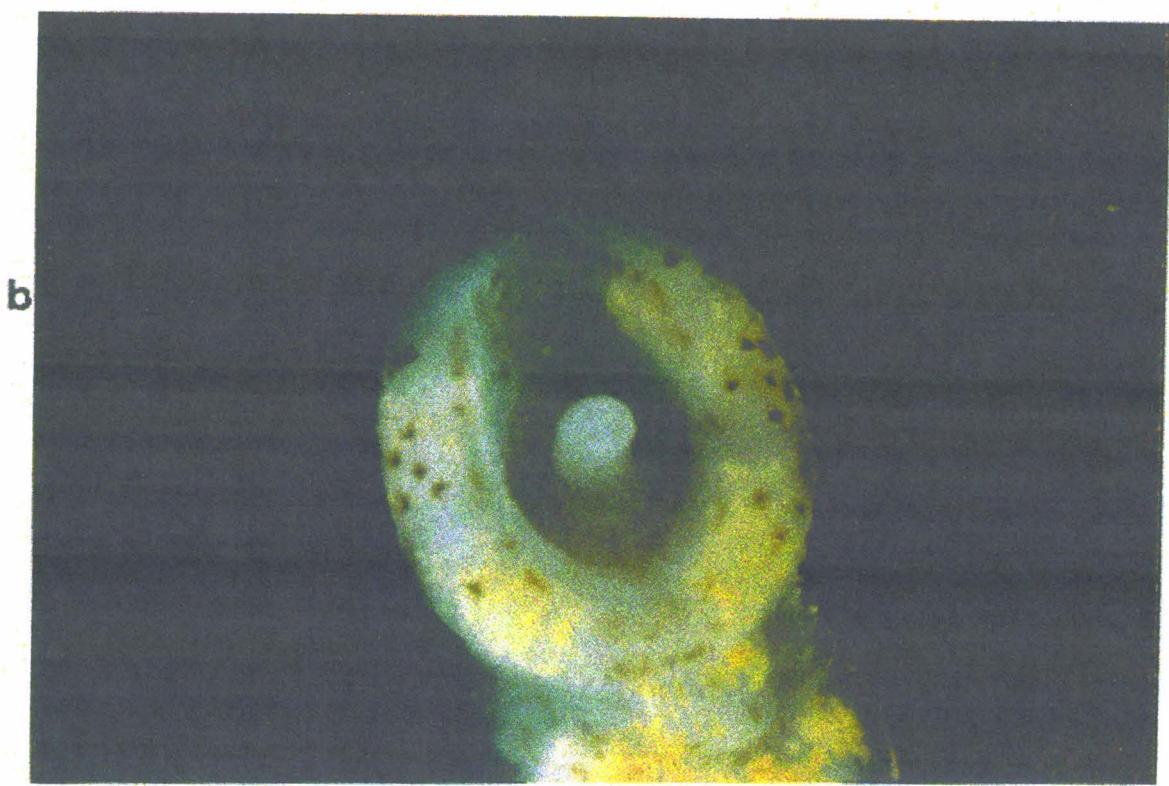
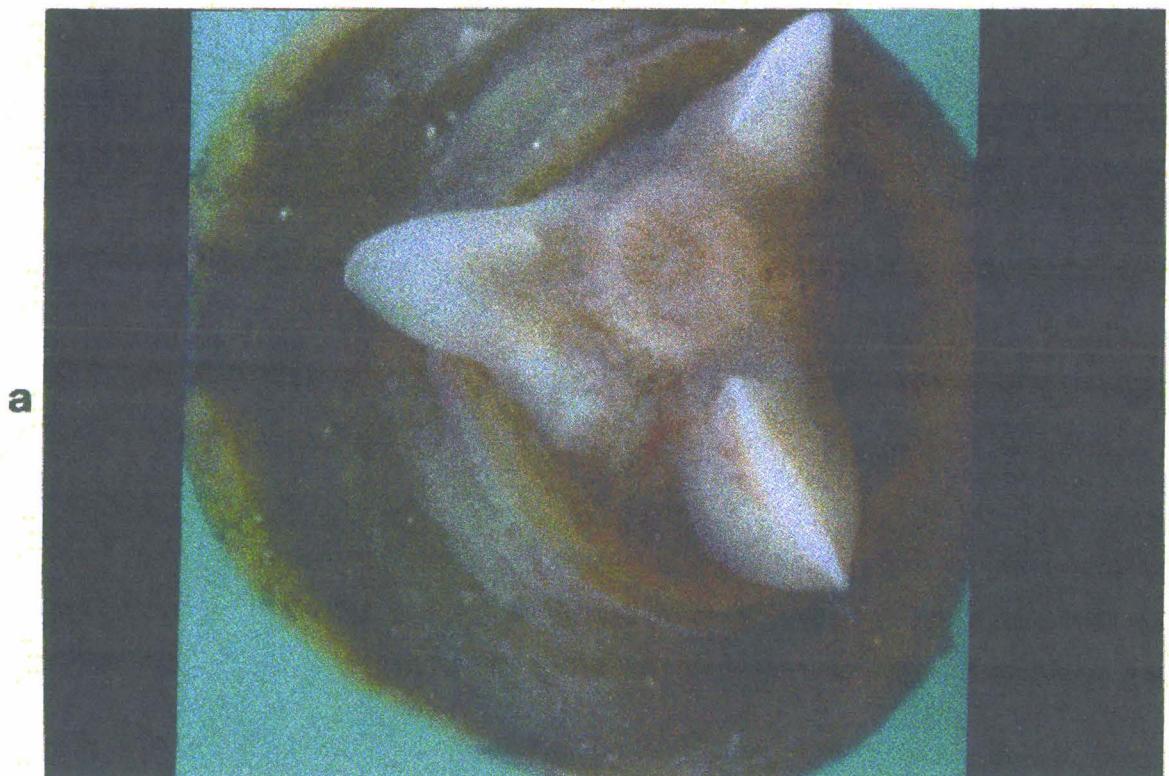
- Euhirudinées: ce sont les sangsues vraies. Elles se subdivisent en deux ordres : les Rhynchobdelles et les Arhynchobdelles, qui se différencient par le mécanisme de prélèvement de leur nourriture.

### 1) LES ARHYNCHOBDELLES.

Dans le sous ordre des Hirudiniformes qui comprend les sangsues hématophages comme la sangsue *Hirudo medicinalis*, la partie antérieure du tube digestif est pourvue de trois mâchoires ayant la forme d'un demi-cercle et portant des dents tranchantes capables d'inciser la peau de l'hôte. Au niveau de ces mâchoires aboutissent les longs conduits des cellules salivaires qui sont dispersées dans le mésenchyme de la partie antérieure de la sangsue sans former de glandes salivaires bien individualisées. Après sa fixation sur l'hôte, la présence de stimulants alimentaires efficaces entraîne la mise en action des mâchoires qui agissent par des mouvements de va-et-vient pour donner naissance à trois incisions linéaires, équidistantes et disposées en étoile (Fig.1a).

Après la morsure, la sangsue pompe le sang par des contractions rythmiques et péristaltiques de son pharynx musculeux. Le temps d'alimentation est en général de 20 à 40 minutes, et ces sangsues peuvent ingérer 8 fois leur propre poids en sang. La moitié du poids est perdue en une semaine par concentration du sang ingéré et excrétion de l'eau et des ions en excès, ce qui restaure l'essentiel de la mobilité de la sangsue. Cette mobilité, indispensable à la survie de l'animal, est également maintenue par le fait que le sang ingéré est rendu incoagulable grâce aux sécrétions des glandes salivaires.

La digestion qui se déroule pendant 6 à 12 mois, se fait grâce à l'activité des bactéries symbiotiques du genre *Aeromonas*, la sangsue étant pratiquement dépourvue de suc digestifs.



**Figure 1 :** (a) Mâchoires d'*Hirudo medicinalis* (Arhynchobdelle) vues de face.  
(b) Ventouse antérieure et proboscis de la sanguisue *Piscicola geometra* (Rhynchobdelle).

## 2) LES RHYNCHOBDELLES.

L'espèce la mieux connue est *Haementeria ghiliani*, sangsue géante de la Guyane Française, pouvant atteindre 50 cm de long.

Son tube digestif antérieur comprend le proboscis ou trompe, l'oesophage, et deux paires de glandes salivaires qui se différencient par leur position, leur taille et leur cytologie.

Le mécanisme de pénétration du proboscis n'est pas encore complètement compris. Son allongement doit se faire par la pression hydrostatique dans le sinus coelomique médian qui abrite le complexe du proboscis. La pénétration pourrait s'effectuer à l'aide d'enzymes protéolytiques. La rétraction se ferait par raccourcissement des muscles rétracteurs ainsi que des muscles longitudinaux du proboscis. De plus, il semblerait que les mouvements spécifiques de la partie antérieure du corps soient aussi impliqués (Fig.1b).

Le passage du sang lors du repas se fait probablement par les vagues péristaltiques passant le long du proboscis, de la partie antérieure vers la partie postérieure et résultant des contractions des muscles circulaires et radiaux de la trompe.

La sangsue peut se nourrir pendant plus de deux heures durant lesquelles des vagues ondulantes et constantes vont de la partie antérieure à la partie postérieure.

## B) THEROMYZON TESSULATUM.

Parasite des oiseaux aquatiques, cette sangsue Rhynchobdelle Glossiphoniidée prélève du sang en s'introduisant dans les fosses nasales. Adulte, elle atteint une masse variant de 150 mg à plus d'1 g. Elle se reproduit une fois au cours de sa vie puis meurt (Wilkialis, 1970; Wilkialis et Davies, 1980a, b).

Les grandes étapes de la vie de *T. tessulatum* ont été définies en prenant comme repères les repas de sang (Malecha, 1983), lesquels sont généralement au nombre de trois (Fig.2). Les prises de nourriture définissent quatre stades (stade 0 : de l'éclosion au premier repas, stades 1, 2 et 3 : respectivement après les premier, deuxième et troisième repas). A l'issue du troisième repas, la croissance de cette sangsue se caractérise par une augmentation de masse considérable due à une importante rétention d'eau (Fig.2) et par une dégénérescence des glandes salivaires. Cependant, si le poids atteint après le troisième repas est inférieur à 150 mg, un repas supplémentaire peut être nécessaire, le cycle s'étendant alors sur deux ans (Wilkialis et Davies, 1980a). Le stade 3 est très long et peut durer un an. Il a été subdivisé en prenant en compte les différentes étapes de la reproduction (Figs 2 et 3). L'évolution de la spermatogenèse définit les stades 3A et 3B, celle de l'ovogenèse les stades 3C et 3D (Malecha *et al.*, 1989). La couvaison des cocons caractérise le stade 3E qui est séparé du stade 3D par la ponte d'œufs riches en vitellus. Le transport des sangsues néonates jusqu'à leur premier repas définit le stade 3F qui peut durer plus de 5 mois, jusqu'à ce que le parent trouve un hôte favorable pour les jeunes sangsues qu'il porte. L'adulte meurt quelques jours après leur départ (Wilkialis et Davies, 1980b).

*T. tessulatum* (Fig.4) est élevée au laboratoire, ce qui nous permet de disposer tout au long de l'année d'animaux à différents stades physiologiques. Ainsi, notre étude

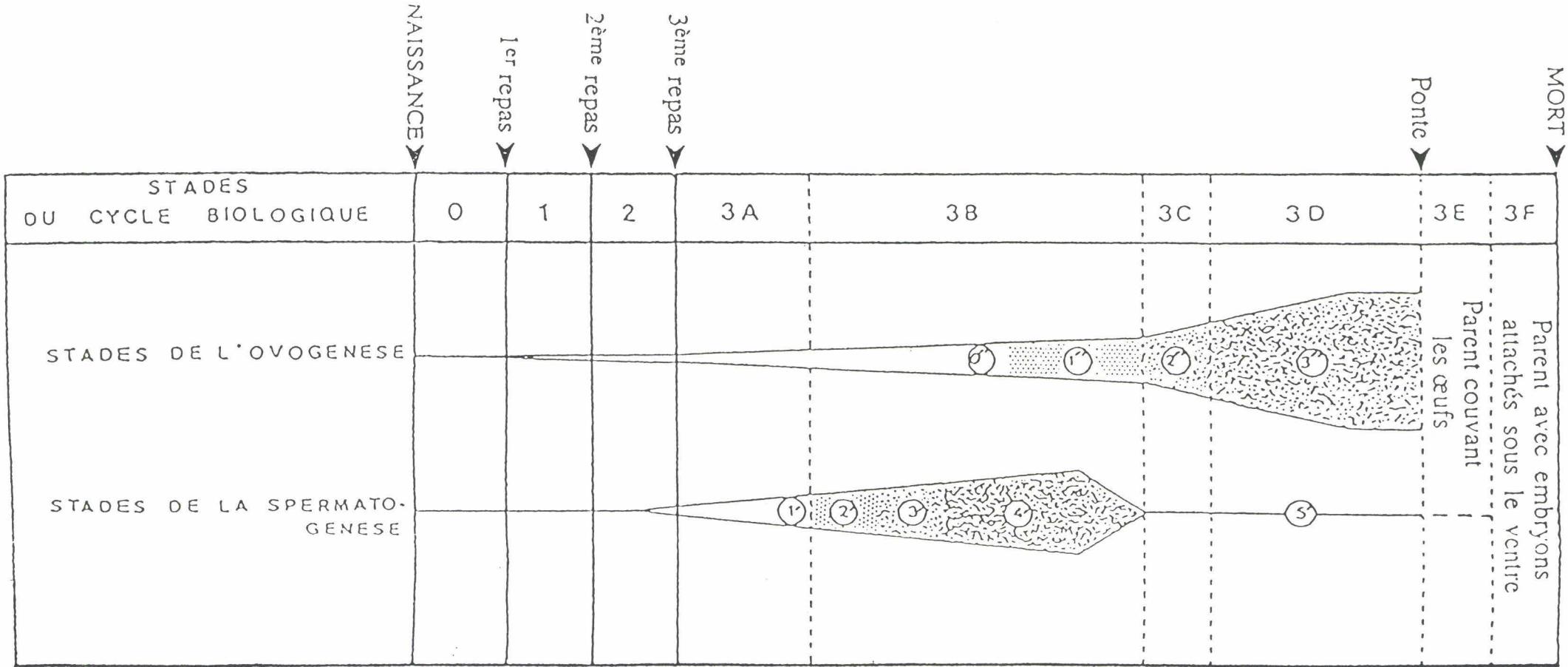
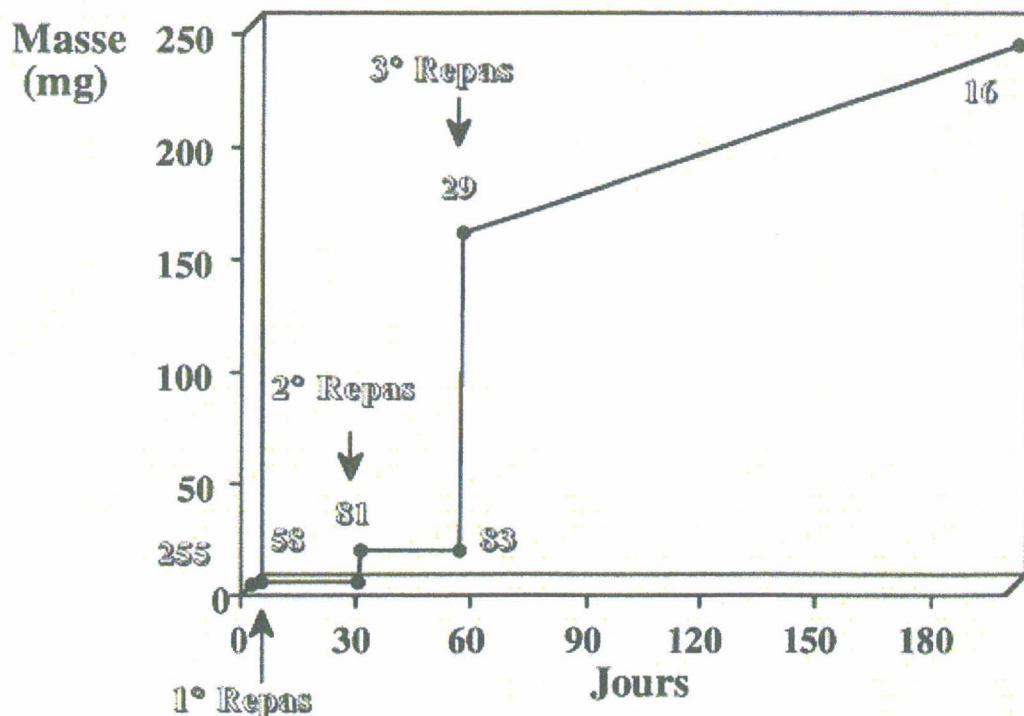


Figure 3- Représentation schématique du cycle biologique de *T. tessulatum* (d'après Malecha et al., 1989).  
 Les stades de l'ovogenèse (0"--->3") et les stades de la spermatogenèse (1'--->5'), ont été définis précisément par Malecha et al., ( 1989). Il n'est pas tenu compte, dans ce schéma, de la durée des différents stades.

(purification d'inhibiteurs de protéases) est réalisé sur des *T.tessulatum* au stade 2 à jeun, stade correspondant au maximum d'inhibiteurs de la coagulation libérés par les glandes salivaires.



**Figure 2:** Croissance pondérale de *T. tessulatum* maintenues à la température du laboratoire et au rythme nyctheméral normal. Les chiffres en relief représentent les effectifs ayant servi à l'établissement de la masse moyenne (d'après Malecha, 1979).



**Figure 4 :** *T.tessulatum* transportant les sanguines néonates.

## **II) LES MECANISMES DE LA COAGULATION.**

Les données de ce chapitre résument les mécanismes intervenant dans la formation du caillot sanguin, et nécessaires à la compréhension du mode d'action des molécules que nous avons isolées. Elles sont tirées à partir de Leroy *et al* (1994).

### **A) L'HEMOSTASE PRIMAIRE.**

#### **1) LES DIFFERENTS PARAMETRES.**

##### **A) LA PAROI VASCULAIRE.**

La paroi vasculaire comporte trois tuniques: l'intima, la média et l'aventice. L'intima, composée de l'endothélium et du sous-endothélium, joue un rôle important. L'endothélium qui tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins est une surface thromborésistante qui prévient toute activation des plaquettes et de la coagulation grâce à la synthèse ou l'expression de nombreuses molécules, notamment de prostacyclines puissamment antiagrégantes, d'héparanes sulfates proches de l'héparine qui activent l'antithrombine III, et de la thrombomoduline, récepteur endothérial de la thrombine qui, lorsqu'elle y est fixée, peut activer la protéine C, inhibiteur de la coagulation.

Le sous-endothélium est une surface thrombogène composée de collagène, de microfibrilles et du facteur de Willebrand. Sa mise à nu lors d'une lésion endothéliale entraîne une activation des plaquettes.

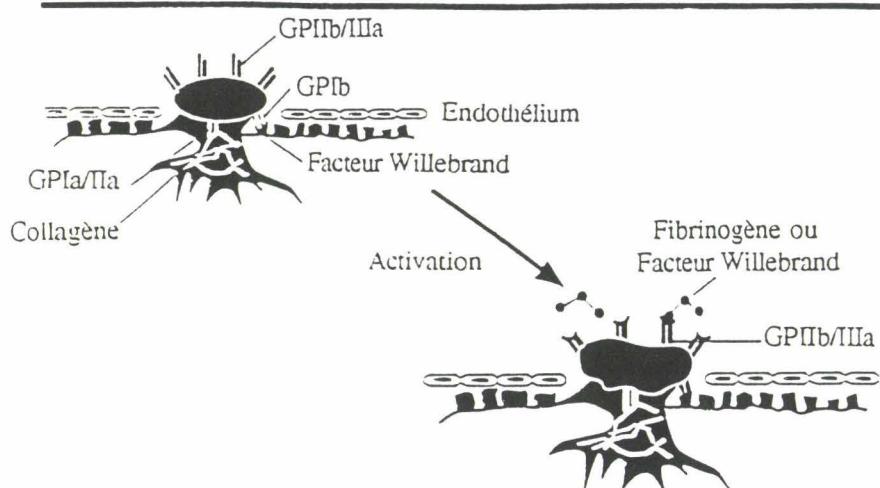
##### **B) LES PLAQUETTES.**

Les plaquettes produites par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes médullaires vont circuler dans le secteur vasculaire pendant une durée de 8 à 10 jours, puis elles seront détruites au niveau de la rate par les macrophages spléniques. Les plaquettes, annulées, et sous forme de disque à l'état de repos, sont délimitées par une membrane plasmique qui est composée de phospholipides et de glycoprotéines dont certaines sont essentielles pour les fonctions d'adhésion et d'agrégation (GPII/bIIIa, GPIb).

##### **C) LE FACTEUR WILLEBRAND.**

Le facteur Willebrand est une glycoprotéine plasmatique synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Dans l'hémostase primaire, le facteur Willebrand permet l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium par l'intermédiaire de la glycoprotéine Ib de la membrane plaquettaire. Dans le sang circulant, le facteur Willebrand est étroitement associé au facteur VIII, auquel il paraît servir de protéine porteuse.

## ADHESION ET ACTIVATION



## AGREGATION

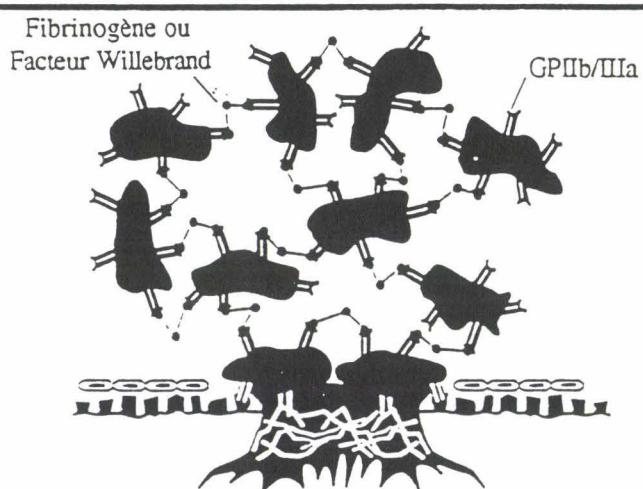


Figure 5 : Schéma de l'adhésion, de l'activation et de l'agrégation des plaques d'après Coller, B.S. (1995).

#### D) LE FIBRINOGENE.

Le fibrinogène (facteur I de la coagulation) est une glycoprotéine plasmatique synthétisée par le foie. Elle est composée de trois chaînes polypeptidiques ( $A\alpha$ ,  $B\beta$ ,  $\gamma$ ) réunies entre elles par des ponts disulfures.

#### 2) MISE EN JEU DES DIFFERENTS PARAMETRES.

Suite à une lésion vasculaire, s'observent une réaction de vasoconstriction et une baisse de la pression sanguine. Le sous-endothélium thrombogène mis à nu par cette lésion vasculaire va permettre l'adhésion des plaquettes sanguines grâce en particulier au facteur Willebrand qui joue le rôle de "colle" entre le collagène du sous endothélium d'une part et la glycoprotéine Ib de la membrane plaquettaire d'autre part. Les plaquettes sont ainsi amarrées à la paroi vasculaire (Fig.5). Cette adhésion est suivie de l'activation plaquettaire. Les plaquettes deviennent sphériques et émettent des pseudopodes. Les granules denses et les granules alpha se concentrent au milieu des plaquettes, puis relarguent à l'extérieur leur composés. A partir du pool de phospholipides plaquettaires, l'acide arachidonique est métabolisé en thromboxane A2, puissant vasoconstricteur et inducteur de l'agrégation plaquettaire. Le facteur 3 plaquettaire (FP3) devient "disponible" et sera le siège et le support de l'activation de la coagulation endogène.

Enfin, la libération par les plaquettes de substances comme l'ADP, le thromboxane A2 entraîne le recrutement *in situ* des plaquettes circulantes qui s'accollent alors aux premières fixées. Le fibrinogène se fixe sur la membrane plaquettaire par l'intermédiaire du complexe glycoprotéinique IIb/IIIa (Fig.5) pour former avec le calcium des ponts intraplaquettaires permettant ainsi la formation de l'agrégat. Celui-ci sera consolidé par la rétraction des plaquettes et l'apparition du réseau de fibrine résultant de la transformation du fibrinogène en fibrine stable grâce aux mécanismes de la coagulation plasmatique qui interviennent de façon concomitante et synergique avec l'hémostase primaire.

#### B) LA COAGULATION.

La coagulation est le passage du sang de l'état liquide à celui de "gel" par transformation, sous l'action de la thrombine, du fibrinogène soluble en un réseau de fibrine insoluble qui constitue la trame du caillot. Le système de la coagulation est classiquement divisé en deux voies faisant intervenir:

- des facteurs de la coagulation; protéines plasmatiques ayant une activité d'enzymes (sérines protéases) ou de coenzymes dont la synthèse hépatique est pour certains d'entre eux vitamine K dépendante. Ils circulent à l'état inactif et à faible concentration.

- du calcium qui est nécessaire à de nombreuses réactions.
- un support biologique phospholipidique.

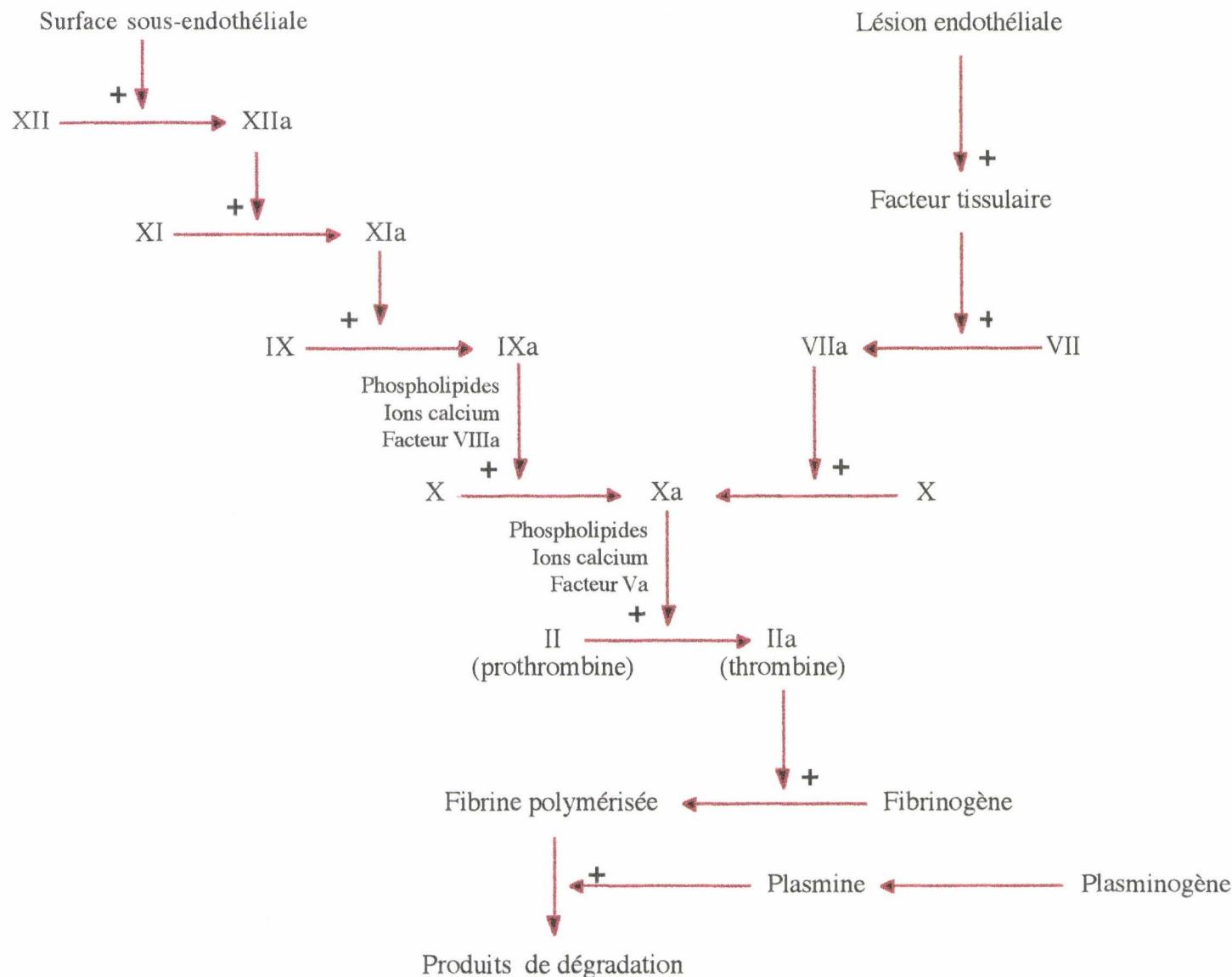


Figure 6 : La cascade de la coagulation.

## 1) LA VOIE EXTRINSEQUE (Fig.6).

Cette voie possède une cinétique très rapide: quelques secondes. Le facteur VII (proconvertine) se fixe sur la partie phospholipidique de la thromboplastine cellulaire libérée lors d'une lésion cellulaire en présence de calcium. Le facteur VII ainsi activé agit alors sur le facteur X. Le facteur X activé forme en présence de phospholipides et de calcium un complexe enzymatique appelé "prothrombinase" capable de cliver la prothrombine en plusieurs fragments dont l'un est la thrombine.

## 2) LA VOIE INTRINSEQUE.

### A) ACTIVATION DES FACTEURS "CONTACT".

L'induction de la voie intrinsèque se fait par les surfaces non endothérialisés (sous-endothélium, athérome, prothèse) et met en jeu quatre facteurs : la prékallicréine, le facteur XII, le facteur XI et le kininogène de haut poids moléculaire jouant un rôle dans le transport et la fixation du facteur XI et de la prékallicréine.

### B) LA CASCADE ENZYMATIQUE (Fig.6).

La cascade enzymatique de la voie intrinsèque est de cinétique plus lente que celle de la voie extrinsèque. Le facteur XI activé agit enzymatiquement sur le facteur IX. Le facteur IX ainsi activé se fixe sur un phospholipide permettant la constitution d'un complexe avec le facteur VIII. Ce complexe active alors le facteur X également fixé sur le phospholipide d'origine plaquettaire (FP3). A partir de cette étape, les deux voies se rejoignent. Le facteur X activé en présence du facteur V, tous les deux fixés sur le phospholipide, coupe la prothrombine en plusieurs fragments dont l'un est la thrombine. De plus la thrombine ainsi formée va amplifier le phénomène de la coagulation en activant les facteurs V et VIII, accroissant ainsi les cinétiques enzymatiques.

### C) INTERACTION AVEC L'HEMOSTASE PRIMAIRE.

Les plaquettes activées notamment par les premières traces de thrombine subissent des remaniements membranaires (flip-flop) faisant apparaître des récepteurs pour certains facteurs de la coagulation (Va-Xa), et le facteur plaquettaire phospholipidique devient disponible. Ceci est indispensable au développement de la voie intrinsèque.

### D) LA FIBRINOFORMATION.

Le fibrinogène est composé de 3 paires de chaînes ( $A\alpha$ ,  $B\beta$ ,  $\gamma$ ) réunies entre elles par des ponts disulfures. La thrombine coupe les peptides A et B de

petits poids moléculaires situés en bout des chaînes A $\alpha$  et B $\beta$ . La coupure des fibrinopeptides modifie la charge des monomères de fibrine qui polymérisent spontanément. Le premier polymère lié par des ponts hydrogènes est instable et nécessite l'action du facteur XIII (activé par la thrombine en présence de calcium) créant des liaisons covalentes permettant ainsi de stabiliser la fibrine.

#### E) LES INHIBITEURS PHYSIOLOGIQUES.

L'inhibiteur le plus anciennement connu est l'antithrombine III qui est synthétisée par le foie. L'antithrombine III est capable d'inhiber de nombreuses enzymes de la coagulation plasmatique dont la thrombine et le facteur Xa.

La protéine C dont la synthèse hépatique est vitamine K dépendante, est activée par la thrombomoduline endothéliale. Cette protéine C activée, en présence d'un autre cofacteur plasmatique également vitamine K dépendant, la protéine S, inactive les facteurs Va et VIIIa.

L'inhibiteur de la voie initiée par le facteur tissulaire:TFPI (Tissular Factor Pathway Inhibitor), synthétisé au niveau des cellules endothéliales, inhibe le complexe facteur tissulaire-facteur VII en présence de phospholipides et de calcium.

Le système macrophagique et surtout celui du foie, joue un rôle important. En phagocytant les molécules activées qui circulent, il évite l'extension du phénomène de coagulation au reste de l'organisme.

#### 3) LA FIBRINOLYSE.

Le système de la fibrinolyse intervient après la coagulation sanguine pour éliminer le caillot hémostatique de fibrine.

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) synthétisé par les cellules endothéliales et libéré sous l'influence de certains stimuli comme la thrombine, a une grande affinité pour la fibrine à laquelle il se fixe. Cette fixation facilite celle du plasminogène qui se trouve ainsi juxtaposé, favorisant son activation en plasmine. La plasmine ainsi formée lyse le dépôt fibrineux qui aboutit à la formation des produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène (PDF), tandis que la libération de la plasmine dans le plasma est suivie de sa neutralisation par la puissante  $\alpha_2$ -antiplasmine.

Lors de la lutte contre les maladies cardio-vasculaires, 3 cibles sont visées : l'activation des plaquettes et de la cascade de la coagulation pour prévenir la formation du caillot sanguin, et le système fibrinolytique pour activer la dissolution du caillot sanguin.

## C) LES TRAITEMENTS CLINIQUES.

### 1) LES THROMBOLYTIQUES

Les traitements thrombolytiques ont pour objectif d'une part, de supprimer les dépôts intravasculaires de fibrine qui ne peuvent être dissous par les mécanismes physiologiques de la fibrinolyse, et d'autre part de restaurer une perméabilité vasculaire aussi complète et aussi rapide que possible de façon à réduire au maximum les dommages tissulaires causés par l'ischémie ou l'obstruction. La cible de ces thrombolytiques est l'activation du système fibrinolytique et la libération de la plasmine par l'utilisation d'activateurs du plasminogène. On peut citer par exemple :

-la streptokinase qui est une protéine bactérienne produite par un streptocoque hémolytique. Cette protéine induit une modification de la conformation du plasminogène qui extériorise son site actif.

-l'urokinase d'origine humaine induit l'activation du plasminogène en plasmine par un mécanisme enzymatique, et la pro-urokinase qui diffère de l'urokinase par sa structure en une seule chaîne glycoprotéique et a l'avantage de ne retrouver son activité qu'au contact du thrombus, ménageant ainsi le fibrinogène.

-l'activateur tissulaire du plasminogène provenant dans l'organisme des cellules endothéliales. Il apparaît comme l'activateur physiologique et est actuellement produit par génie génétique.

La voie d'administration la plus habituelle est la perfusion intraveineuse et les principales indications concernent l'embolie pulmonaire, les thromboses veineuses profondes et l'infarctus du myocarde.

### 2) LES ANTICOAGULANTS

#### A) LES HEPARINES.

Les héparines, mucopolysaccharides hétérogènes, sont formées d'une longue séquence d'unités saccharidiques répétitives diversement sulfatées. Parmi les héparines ont distinguent les héparines standards ou non fractionnées, mélange très hétérogène de molécules ayant une même structure chimique de base et se différenciant par leur masse moléculaire (15 kDa à 30 kDa), et les héparines de bas poids moléculaire (HBPM, 5 kDa).

L'héparine ralentit ou bloque la coagulation par son action inhibitrice qui est instantanée. L'héparine n'agit pas directement: elle n'est active qu'en présence de son cofacteur, l'antithrombine III, inhibiteur plasmatique naturel. Ce complexe agit sur la forme activée des facteurs XII, XI, IX, X et II mais son action principale est dirigée contre la thrombine (facteur II). Ceci a pour effet de ralentir la fibrinoformation mais aussi d'empêcher la rétroactivation de la thrombine et donc de ralentir la formation du complexe "prothrombinase" et par voie de conséquence, la génération de thrombine. L'héparine est essentiellement utilisée pour prévenir ou traiter les maladies

thromboemboliques, et est administrée par voie parentérale. L'héparinothérapie occupe une place majeure dans le traitement des phlébites et des embolies pulmonaires. Elle est également utilisée systématiquement à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde et dans les oblitérations artérielles. Néanmoins, l'utilisation de l'héparine a certaines limitations:

- les patients ont des réponses variables à des doses données d'héparine.
- l'utilisation à long terme peut être associée à certaines complications comme des hémorragies, des manifestations allergiques, la lipolyse.
- elle se lie à diverses protéines plasmatiques diminuant ainsi l'effet anticoagulant.
- son action est inhibée par le facteur IV plaquettaire.
- elle est inefficace lorsque la thrombine est liée à la fibrine.
- elle peut provoquer l'agrégation plaquettaire.
- elle peut induire une thrombopénie.

#### B) LES COUMARINIQUES

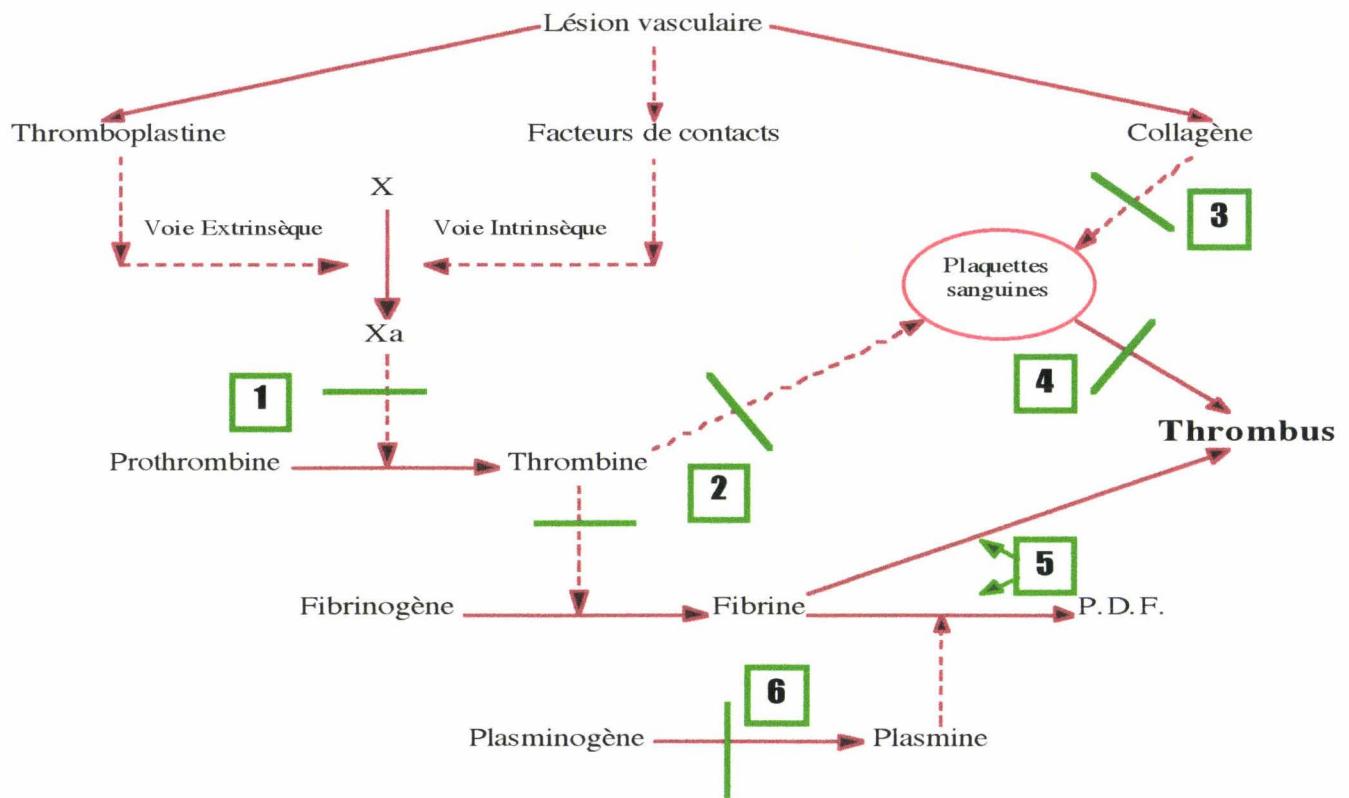
Les coumariniques inhibent le métabolisme de la vitamine K, une enzyme nécessaire à la synthèse dans le foie de certaines protéines de la coagulation sanguine, d'où leur nom courant d'« antivitamines K ». Leur dérivé le plus utilisé est la warfarine. Les antivitamines K sont aujourd'hui largement utilisés car elles peuvent être administrées par voie orale durant une longue période, et préviennent d'une façon effective les thrombo-embolies dans la circulation artérielle et veineuse. Malheureusement, le risque hémorragique n'est pas à négliger en cas de surdosage.

#### C) LES INHIBITEURS DE L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE.

Les molécules qui empêchent l'agrégation plaquettaire agissent sur leur métabolisme. C'est ainsi que l'aspirine, le principal de ces agents, est un inhibiteur de la cyclo-oxygénase, une enzyme qui transforme un acide gras des plaquettes, l'acide arachidonique, en endopéroxydes. Ces derniers sont nécessaires à la formation dans les plaquettes du thromboxane A<sub>2</sub>, l'un des plus puissants activateurs de l'agrégation plaquettaire.

Le ridogrel est un nouvel anti-agrégant qui inhibe la synthèse du thromboxane A<sub>2</sub> et de plus, occupe ses récepteurs sur la membrane des plaquettes.

La ticlopidine et son dérivé, le clopidogrel, agissent en modifiant le récepteur plaquettaire d'un autre activateur majeur de l'agrégation, l'adénosine diphosphate (ADP).



**1** Antistasine, Ghilanthène.

**2** Hirudine, Haemendine, Bufrudine.

**3** Caline, LAPP.

**4** Décorsine, Ornatine.

**5** Hémentine, Destabilase.

**6** Hémentérine.

**Figure 7:** Cibles des anticoagulants isolés chez les sangsues dans l'hémostase.

### III) LES ANTICOAGULANTS CHEZ LES ANIMAUX HEMATOPHAGES.

#### A) LES INHIBITEURS DE LA THROMBINE.

##### 1) DES SANGSUES (Fig.7, tableau I).

###### A) *HIRUDO MEDICINALIS*.

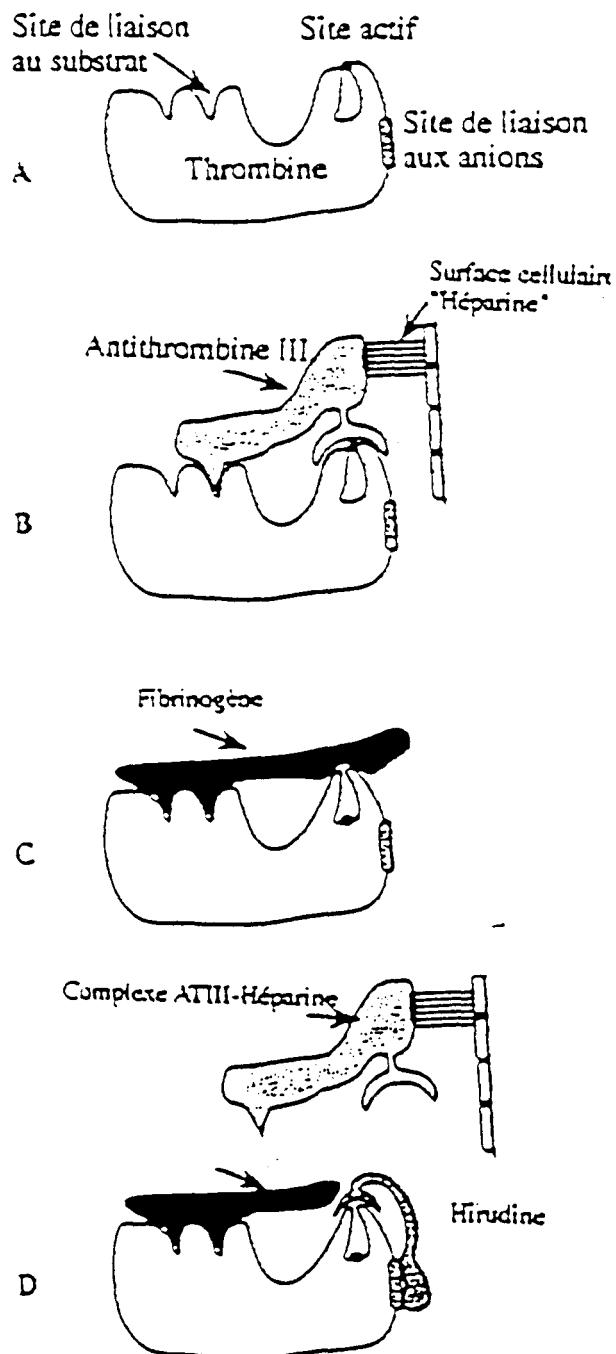
L'agent anticoagulant chez cette sangsue médicinale, nommé HIRUDINE, a été isolé comme une petite protéine d'un poids moléculaire d'environ 7 kDa, contenant 65 acides aminés (Markwardt *et al.*, 1967) dont six cystéines impliquées dans trois ponts disulfures. Il est doté d'une forte affinité pour la thrombine ( $K_i$ : 21 fM). La partie N-terminale est globulaire et fortement serrée par les trois ponts disulfures. La queue C-terminale apparaît très lâche avec de nombreux acides aminés acides. Cette molécule dont l'activité anticoagulante a été mise en évidence dès 1884 par Haycraft a été le seul anticoagulant connu jusqu'à la découverte de l'héparine. Elle a fait l'objet de recherches très actives qui ont abouti à sa production sous forme recombinante actuellement disponible dans le commerce, et à la définition de ses applications thérapeutiques. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une revue exhaustive par Markwardt (1994).

La liaison de l'hirudine à la thrombine est très rapide et spécifique. Le complexe non covalent formé bloque tous les effets de la thrombine. Le taux de dissociation est extrêmement lent, ce qui classe l'hirudine comme un inhibiteur irréversible de la thrombine (Stone *et Hofsteenge*, 1986). Dans cette liaison, une molécule d'hirudine se lie à une molécule de thrombine et on a appelé ATU l'unité antithrombotique correspondant à la quantité qui neutralise une unité internationale de thrombine à 37°C.

La quantité d'hirudine contenue dans une sangsue est d'environ 285 ATU. Cette simple constatation permet de comprendre que puisque la sangsue *H.medicinalis* ne peut être obtenue qu'en nombre limité, l'hirudine naturelle n'est pas disponible en quantité suffisante pour des usages thérapeutiques. Il faut par exemple 256000 ATU/heure pour le traitement d'une personne de 80 kg, soit ce que l'on extrait de 1280 *H.medicinalis* (Blackshear *et Ebener*, 1994). De plus cette espèce figure sur la liste rouge des espèces en voie de disparition dans certains pays. Pour son utilisation médicale, l'hirudine est maintenant produite par génie génétique.

Les premiers travaux ont permis d'obtenir une hirudine recombinée chez *Escherichia coli* (Fortkamp *et al.*, 1986) mais avec un rendement très faible. Depuis elle est produite chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Loison *et al.* 1988). Des travaux plus récents ont visé à accroître le rendement chez *S.cerevisiae* (Heim *et al.*, 1994) ou en utilisant d'autres organismes d'expression tels que la levure *Hansenula polymorpha* (Weydemann *et al.*, 1995) et plus récemment un champignon filamenteux *Acremonium chrysogenum* (Radzio *et Kück*, 1997).

Les hirudines recombinantes ont la même configuration que l'hirudine naturelle mais elles n'ont pas de groupement sulfate sur la tyrosine 63 (Talbot, 1989), elles sont



**Figure 8 :** Schéma hypothétique des interactions de la thrombine avec l'antithrombine III (AT III), le fibrinogène et l'hirudine.  
 Sous forme libre, la thrombine est inhibée par l'AT III, et la réaction est accélérée par l'héparine (A, B). La liaison de la thrombine au fibrinogène génère un conformaton de la serine protéase, empêchant ainsi l'inhibition par l'AT III (C). Les inhibiteurs directs de la thrombine sont capables d'inhiber la thrombine liée au caillot sanguin (D) (Ali *et al*, 1995).

appelées désulfato-hirudines. Ce sont des inhibiteurs sélectifs de la thrombine et leur activité anticoagulante est aussi élevée que celle de l'hirudine.

La disponibilité de quantités importantes d'hirudine et la mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les régions actives de la molécule:

- dix acides aminés de la région C-terminale (55-65) réagissent avec le site de liaison aux anions de la thrombine qui est une région importante pour la fixation au fibrinogène, sans affecter l'activité catalytique de la thrombine. Cette liaison entraîne une modification conformationnelle de la thrombine qui rend cette molécule accessible à la partie N-terminale de l'hirudine.

- les résidus 1 à 48 de la partie N-terminale inhibent alors la thrombine. La liaison de l'hirudine n'est pas due à une interaction spécifique avec le site catalytique de la thrombine mais par des liaisons avec des sites à la fois proches et éloignés de ce site catalytique. Les acides aminés en position 46 à 48 sont importants pour la liaison mais ils ne ressemblent pas à une séquence de type « substrat like ». Ce mode d'action très particulier explique pourquoi l'hirudine n'inhibe pas d'autres sérine protéases.

De petits peptides analogues basés sur les domaines fonctionnels de la molécule d'hirudine ont été synthétisés. C'est le cas de l'hirugen, dodécapeptide sulfaté de la partie C-terminale de l'hirudine qui se complexe avec le site de liaison aux anions de la thrombine (Maraganore *et al.*, 1989), et de l'hirulog, qui correspond à une séquence inhibitrice du site actif de la thrombine reliée à l'hirugen via un polymère de glycine (Maraganore *et al.*, 1990).

En vue d'une utilisation médicale, les propriétés anticoagulantes de l'hirudine ont été dans un premier temps comparées à celles de l'héparine dans différents types de pathologies expérimentales chez le chien et le cochon (Cannon *et al.* 1995). Les résultats obtenus ont montré que l'hirudine possèdent plusieurs avantages sur l'héparine:

- l'hirudine peut inhiber la thrombine liée au caillot sanguin (Fig.8,d) (Weitz *et Hirsh*, 1990).
- elle n'est pas inhibée par les plaquettes activées (Fareed *et al.*, 1991).
- elle ne nécessite pas de cofacteur (Talbot *et al.*, 1989), contrairement à l'héparine qui n'est active qu'en présence de son cofacteur (Fig.8,b) l'antithrombine III, inhibiteur plasmatique naturel.
- elle semble être peu immunogène (Beijering *et al.*, 1996).

Actuellement, de nombreux essais cliniques de phase III sont réalisés avec l'hirudine qui est comparée à l'héparine dans les différentes situations suivantes:

- l'infarctus du myocarde. Utilisée conjointement à une thérapie thrombolytique, l'hirudine permet un meilleur maintien de la thrombolyse, une diminution plus importante de la réocclusion, et une plus faible fréquence du renouvellement des infarctus et des décès (Cannon *et al.*, 1995).

- l'angine de poitrine. L'hirudine améliore la résolution des thromboses coronaires et réduit la fréquence des événements d'ischémie (Cannon *et al.*, 1995).

- l'angioplastie par ballonnets. L'hirudine réduit la fréquence des événements d'ischémie (Cannon *et al.*., 1995).

- l'opération de la hanche. L'hirudine réduit la fréquence des thromboses (Wallis, 1996).

- la thrombose artérielle. Les résultats obtenus lors des premiers essais pilotes montrent que l'hirudine semble être plus efficace que l'héparine dans la diminution du degré de sténose (Topol, 1996). Les résultats des essais de phase II sont attendus avec intérêt.

- la thrombopénie induite par l'héparine est une maladie immuno-allergique dont le principal antigène est le complexe héparine-facteur 4 plaquettaire. L'hirudine se substitue d'une manière efficace et sûre à l'héparine (Schiele *et al.*, 1996).

- Enfin, l'hirudine semble être un anticoagulant efficace lors des opérations « à cœur ouvert », situations dans lesquelles un pontage cardio-pulmonaire est réalisé (Riess *et al.*, 1995).

#### B) HIRUDINARIA MANILLENSIS.

Un inhibiteur de la thrombine nommé BUFRUDINE a été isolé chez *Hirudinaria manillensis*. Cet inhibiteur possède 66% d'homologie de séquence avec l'hirudine et la même affinité vis à vis la thrombine (Electricwala *et al.*, 1991). La séquence en acides aminés, le clonage de l'ADNc et l'organisation génique de ces variants de l'hirudine ont été décrits (Scacheri *et al.*, 1993).

#### C) HAEMADIPSA SYLVESTRIS.

Chez cette sangsue indienne, un autre inhibiteur de la thrombine a été purifié. Cette protéine de 5 kDa appelée HAEMENDINE est composée de 57 acides aminés et ne possède aucune homologie de séquence avec l'hirudine (Strube *et al.*, 1993). Le clonage de l'ADNc et son expression chez *Escherichia coli* ont permis l'obtention d'une protéine recombinée ayant une activité inhibitrice (Ki:100 fM) similaire à son homologue naturel.

### 2) DES AUTRES ANIMAUX HEMATOPHAGES (Tableau II).

#### A) LES TIQUES.

Chez la tique *Ixodes ricinus*, un inhibiteur de la thrombine d'une masse moléculaire de 7 kDa nommée IXINE a été isolé (Hoffman *et al.*, 1991). Une activité antithrombine a également été détectée chez une autre espèce, *Ornithodoros moubata* (Hellemann *et al.*, 1967).

#### B) LES PUNAISES.

Des agents anticoagulants ont été extraits chez diverses punaises hématophages (Reduviidae). Ils ont été trouvés chez *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* (Markwardt *et al.*, 1960) et *Eutriatoma maculata* (Helleman *et al.*, 1960). Ces agents sont des inhibiteurs protéiques et furent nommés PROLIXINE, TRIATOMINE et

Tableau I : Les anticoagulants chez les sanguins hématophages.

Espèce	Composant	Mode d'action
Hirudo medicinalis (A)	hirudine	inhibiteur de thrombine
	caline	inhibiteur de l'agrégation plaquettaire
	destabilase	dépolymérisation de fibrine
Hirudinaria manillensis (A)	bufrudine	inhibiteur de la thrombine
Haemadipsa sylvestris (A)	haemendine	inhibiteur de la thrombine
Macrobdella decora (A)	decorcine	antagoniste de la GP IIb/IIIa
Haementeria officinalis (R)	antistasine	inhibiteur du facteur Xa
	LAPP	inhibiteur de l'agrégation plaquettaire
Haementeria ghilianii (R)	ghilantene	inhibiteur du facteur Xa
	hementine	enzyme fibrinolytique
Haementeria lutzi (R)	hementerine	activateur du plasminogène
Placobdella ornata (R)	ornatine	antagoniste de la GP IIb/IIIa

G: sangsue à mâchoires (Arhynchobdelle)

R: sangsue à trompe (Rhynchobdelle)

MACULATINE. Ils exercent leur effet en bloquant la thrombine. Puisqu'il y a une grande similarité dans leur mode d'action, il semblerait que ces inhibiteurs correspondent à des modifications d'une même molécule ancestrale. De ce fait, le nom de REDUVIINE, dérivé du nom de la famille, a été suggéré comme un terme général pour tous les inhibiteurs obtenus chez ces punaises (Markwardt *et al.*, 1960).

*Rodnius prolixus* a été étudiée de façon intensive comme insecte spécialisé dans la succion du sang et comme vecteur de la maladie de Chagas. Un inhibiteur spécifique de la thrombine ( $K_i$ : 0,2 pM) d'une masse moléculaire de 11 kDa a été purifié (Friedrich *et al.*, 1993). La séquence en acides aminés de cette protéine appelée RHODNIINE a permis le clonage moléculaire de l'ADNc et son expression chez *Escherichia coli*.

Récemment, un inhibiteur de la thrombine a été isolé à partir de la salive de *Triatoma pallidipennis* (Jungblut *et al.*, 1995). La forme recombinée de cette protéine de 142 acides aminés nommée TRIABINE a une activité biologique ( $K_i$ : 3 pM) similaire à celle de la protéine native.

### C) LES MOUCHES.

Des inhibiteurs de la coagulation sanguine ont été trouvés dans les glandes salivaires de plusieurs types de taons (Markwardt *et al.*, 1959). Leur cible est la thrombine, et le nom TABANINE a été donné à l'agent extrait à partir des glandes salivaires de *Tabanus bovinus*.

A partir des glandes salivaire de la mouche « tsé-tsé » *Glossina morsitans morsitans*, un inhibiteur de la thrombine ( $K_i$ : 0,5 pM) a été purifié et caractérisé. Il s'agit d'un peptide de 3,5 kDa appelé TTI (tetse thrombin inhibitor) (Cappello *et al.*, 1996).

## B) LES INHIBITEURS DU FACTEUR XA.

### 1) DES SANGSUES (Fig.7, tableau I).

#### A) HAEMENTERIA OFFICINALIS.

Des inhibiteurs de la thrombine comme l'hirudine ne sont pas produits chez toutes les sangsues hématophages. Dans les glandes salivaires de la sangsue mexicaine *H.officinalis*, se trouve une protéine de 119 acides aminés, possédant une masse moléculaire de 15 kDa. Connue sous le nom d'ANTISTASINE, cette molécule inhibe le facteur Xa de la coagulation ( $K_i$ : 0,5 nM) (Nutt *et al.*, 1988). Cet inhibiteur riche en cystéine (20 résidus), est caractérisé par une structure interne répétée deux fois et par une activité antimétastasique (Tuszynski *et al.*, 1987). En effet, administrée par voie intraveineuse à une souris le même jour que l'inoculation de cellule cancéreuse, l'antistasine réduit le nombre et la taille des métastases pulmonaires. Les cellules tumorales possèdent une activité procoagulante qui peut activer directement le facteur Xa (Falanga *et Gordon*, 1985), et la formation des caillots de fibrine permet la séquestration des cellules tumorales logeant dans le lit vasculaire (Wood, 1974). La fibrine va protéger ces cellules tumorales par la formation d'une couverture

Tableau II : Les protéines anticoagulantes chez les animaux hématophages autres que les sanguins.

Mode d'action	composant	Espèce
inhibiteur du facteur Xa	ixodine	<i>Ixodes ricinus</i> (tique)
	TAP*	<i>Ornithodoros moubata</i> (la tique)
		<i>Simulium vittatum</i> (simulie)
		<i>Glossina morsitans</i> (mouche tsé-tsé)
	AeCAP*	<i>Aedes aegypti</i> (moustique)
inhibiteur de la thrombine	AcAP*	<i>Ancylostoma caninum</i> (ankylostome)
	ixin	<i>Ixodes ricinus</i> (tique)
	triatomine	<i>Triatoma infestans</i> (punaise)
	maculatine	<i>Eutriatoma maculata</i> (punaise)
	rhodniine*	<i>Rhodnius prolixus</i> (punaise)
	triabine*	<i>Triatoma pallidipennis</i> (punaise)
	tabanine	<i>Tabanus bovinus</i> (taon)
inhibiteur de l'agrégation plaquettaire	TTI	<i>Glossina morsitans</i> (mouche tsé-tsé)
	moubatine*	<i>Ornithodoros moubata</i> (tique)
	apyrase	<i>Rhodnius prolixus</i> (punaise)
	pallidipine*	<i>Triatoma pallidipennis</i> (punaise)
activité fibrinolytique		<i>Glossina morsitans</i> (mouche tsé-tsé)
	rhokinase	<i>Rhodnius prolixus</i> (punaise)
	bat PA*	<i>Desmodus rotundus</i> (vampire)

\* existe sous la forme recombinée

imperméable au système immunitaire (Gorelik *et al.*, 1982). De ce fait l'antistasine, par son action inhibitrice sur le facteur Xa, empêche la formation de fibrine et prévient la formation de métastases. Enfin, la protéine recombinée a été obtenue en grande quantité grâce à l'utilisation du bacculovirus comme vecteur d'expression.

#### B) HAEMENTERIA GHILIANI.

Cette sangsue d'Amazonie sécrète dans sa trompe un inhibiteur du facteur Xa appelé GHILANTÈNE (Brankamp *et al.*, 1990). Cette protéine possède le même nombre d'acides aminés et la même structure secondaire que l'antistasine. La seule différence concerne les 11 acides aminés du côté C-terminal. La ghilantène possède une activité antimétastasique similaire à celle observée pour l'antistasine. La protéine recombinante est produite chez la levure *Pichia pastoris*.

### 2) DES AUTRES ANIMAUX HEMATOPHAGES (tableau II).

#### A) LES TIQUES.

Les extraits de la tique *Ixodes ricinus* sont capables de prévenir la coagulation du sang sucé par l'animal (Sabbatani 1899). Le principe actif appelé IXODINE a été décrit comme une enzyme qui détruit la thrombine. Plus tard cet agent a été caractérisé comme un inhibiteur du facteur Xa (Markwardt *et al.*, 1964).

Des substances interagissant avec la coagulation du sang ont été observées chez les tiques de la famille des Argasidae: *Argas persicus* (Cornwall *et al.*, 1914), *Ornithodoros pallipes* (Pawlowsky *et al.*, 1930) et *Ornithodoros moubata* (Markwardt *et al.*, 1961). L'agent anticoagulant de cette dernière tique, appelé ARGASINE, a été caractérisé comme un inhibiteur du facteur Xa (Markwardt, 1964). Plus tard il a été isolé et nommé TAP (Tick Anticoagulant Peptide) (Waxman *et al.*, 1990). Ce peptide de 6 kDa est constitué d'une seule chaîne de 60 acides aminés et a une très forte affinité pour le facteur Xa (Ki: 0,6 nM). Maintenant le TAP est produit par génie génétique et est disponible sous forme recombinée (Jordan *et al.*, 1990).

#### B) LES MOUSTIQUES.

Un inhibiteur du facteur Xa d'une masse moléculaire de 18 kDa a été purifié à partir des glandes salivaires de la simulie *Simulium vittatum* (Jacobs *et al.*, 1990). De même chez le moustique vecteur de la fièvre jaune *Aedes aegypti*, un inhibiteur du facteur Xa de masse moléculaire apparente de 35 kD a été isolé à partir des extraits des glandes salivaires de la femelle (Stark et James., 1995).

#### C) LES NEMATODES.

Chez l'ankylostome *Ancylostoma caninum*, l'activité anticoagulante a été attribuée à un inhibiteur spécifique du facteur Xa appelé AcAP (*Ancylostoma*

*caninum* Anticoagulant Peptide) (Cappello *et al.*, 1993). Cette protéine de 8,7 kDa possède une forte affinité pour le facteur Xa (Ki: 0,3 pM) et existe maintenant sous forme recombinée grâce au clonage et à l'expression de l'ADNc chez *E.coli* (Cappello *et al.*, 1996).

Actuellement les effets du TAP et de l'antistasine sont testés sur différents animaux. Alors que les inhibiteurs directs de la thrombine comme l'hirudine affaiblissent la fonction hémostatique des plaquettes, ni le TAP, ni l'antistasine n'affectent le temps de saignement à de très fortes doses. Ces inhibiteurs du facteur Xa produisent une interruption dose dépendante de la formation du thrombus avec moins de perturbations de la fonction hémostatique des plaquettes que celles provoquées par les antithrombotiques directs (Kelly *et al.*, 1991, 1992).

Le TAP prévient de façon efficace la formation du thrombus veineux induit par la thromboplastine chez le lapin (Vlasuk *et al.*, 1991).

Chez le babouin, le TAP inhibe le dépôt des plaquettes au niveau de greffes vasculaires sans affecter l'hémostase primaire (Schaffer *et al.*, 1991).

Chez ce même animal, le TAP induit une réduction de l'accumulation des plaquettes et de la formation du thrombus après angioplastie au niveau de vaisseaux sanguins athérosclérosés (Lyle *et al.*, 1995).

Enfin, administré conjointement à l'activateur tissulaire du plasminogène, le TAP favorise la thrombolyse et le maintien du débit sanguin dans les artères coronaires canines (Lynch *et al.*, 1994).

### C) LES INHIBITEURS DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE.

#### 1) DES SANGSUES (Fig.7, tableau I).

##### A) HIRUDO MEDICINALIS.

Une protéine de 65 kDa nommée CALINE a été isolée à partir des glandes salivaires d'*H.medicinalis*. La caline inhibe de façon spécifique l'adhésion et l'agrégation plaquette induites par le collagène (Munro *et al.*, 1991).

En interférant avec l'interaction plaquettes-collagène, la caline induit un effet antithrombotique dans un modèle de thrombose riche en plaquettes chez le hamster (Deckmyn *et al.*, 1995).

##### B) HAEMENTERIA OFFICINALIS.

Chez la sangsue *H.officinalis*, une autre voie d'attaque du caillot sanguin a été découverte, il s'agit d'une protéine inhibant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes induites par le collagène (Connolly *et al.*, 1992). Elle inhibe également la stimulation par le collagène de la sécrétion par les plaquettes des granules denses. Cette protéine de 126 acides aminés nommée LAPP (Leech AntiPlatelet Protein) est

disponible en quantité suffisante grâce au clonage de l'ADNc et de son expression chez la levure *S.cerevisiae* (Keller *et al.*, 1992).

Les premières données concernant les effets de cet inhibiteur indiquent que le LAPP inhibe l'agrégation plaquettaire dans un modèle canin de thrombose artérielle coronaire (Connolly *et al.*, 1993), et qu'il bloque le dépôt des plaquettes sur une section d'artère coronaire humaine athérosclérosée (Van Zanten *et al.*, 1995). Cependant, l'injection de LAPP aux babouins ne permet pas de prévenir les thrombi expérimentaux.

### C) MACROBDELLA DECORA.

Une protéine antiplaquettaire a été isolée chez la sangsue nord américaine *M.decora* (Seymour *et al.*, 1990). Cette protéine appelée DÉCORSINE est composée de 39 acides aminés et a une masse moléculaire de 4,4 kDa. La décorsine est un puissant antagoniste de la glycoprotéine IIb/IIIa membranaire des plaquettes, important récepteur de l'agrégation plaquettaire. La partie C-terminale de la décorsine contient la séquence RGD, suggérant ainsi que la liaison de haute affinité de la décorsine envers la glycoprotéine IIb/IIIa est due à cet épitope.

### D) PLACOBDELLA ORNATA.

Chez la sangsue nord américaine *P.ornata* communément appelée la sangsue des tortues de mer, six isoformes d'une molécule appelée ORNATINE ont été purifiées et caractérisées (Mazur *et al.*, 1991). Il s'agit d'antagonistes de la glycoprotéine IIb/IIIa. Ils sont composés de 41 à 52 acides aminés et possèdent une masse moléculaire de 4,5 kDa à 5,7 kDa. Ces molécules contiennent la séquence RGD, séquence commune de reconnaissance des protéines d'adhésion, et 6 résidus cystéine. Les ornatines possèdent 40% d'homologie de séquence avec la décorsine. De plus, la séquence RGD et 5 des 6 résidus cystéine occupent la même position dans la décorsine et l'ornatine.

## 2) DES AUTRES ANIMAUX HEMATOPHAGES (tableau II).

Chez la punaise *Triatoma pallidipennis*, un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire induit par le collagène a été isolé (Jungblut *et al.*, 1994). Cette protéine de 19 kDa nommée la PALLIDIPINE existe maintenant sous forme recombinée (Haendler *et al.*, 1996).

De même chez la tique *Ornithodoros moubata*, un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire stimulée par le collagène a été purifié. Cette protéine de 17 kDa est appelée MOUBATINE (Waxman *et Connolly*, 1993). Elle existe sous forme recombinée grâce à l'expression de l'ADNc chez la levure *S.cerevisiae* (Keller *et al.*, 1993).

Enfin, une activité anti-agrégante appelé APYRASE a été détectée dans la salive de *Rhodnius prolixus* (Ribeiro *et al.*, 1981), ainsi que chez la mouche "tsé-tsé" *Glossina morsitans morsitans* (Mant *et al.*, 1985).

## D) LES MOLECULES INTERVENANT DANS LA FIBRINOLYSE.

### 1) DES SANGSUES (Fig.7, tableau I).

Des enzymes issues de la salive *d'H. medicinalis* renferment la DESTABILASE, une enzyme pouvant dépolymériser la fibrine (Baskova *et al.*, 1985). Récemment, la séquence protéique complète a été décrite grâce à l'obtention de l'ADNc. La destabilase est composée de 115 acides aminés comprenant 14 résidus cystéine (Fradkov *et al.*, 1996).

Chez la sangsue *H. ghiliani*, une enzyme fibrinogénolytique nommée HEMENTINE a été détectée (Malinconico *et al.*, 1984). La purification et la caractérisation de cette enzyme ont montré qu'il s'agit d'une métalloprotéase d'une masse moléculaire de 120 kDa (Swadesh *et al.*, 1990). L'hémentine permet de dissoudre les caillots sanguins et de garder le sang sous forme liquide pendant le trajet dans la longue trompe de cette espèce, en empêchant l'agrégation des plaquettes.

Une activité fibrinogénolytique a été également observée dans les extraits de glandes salivaires de la sangsue brésilienne *H. lutzi* (Kelen et Rosenfeld., 1975). La substance nommée HEMENTERINE est capable d'activer le système fibrinolytique du plasma humain en présence d'un cofacteur du sérum et/ou de calcium. Cet effet indirect présente des similarités avec la streptokinase.

### 2) DES AUTRES ANIMAUX HEMATOPHAGES (tableau II).

Dans la salive de la chauve souris vampire *Desmodus rotundus*, des activateurs du plasminogène (PA) ont été isolés (Gardell *et al.*, 1989). Ces activateurs du plasminogène de vampire (bat PA) existent sous 3 formes majeures et correspondent à des glycoprotéines dont la masse moléculaire est comprise entre 40 et 49 kDa. Ces molécules disponibles maintenant sous forme recombinante possèdent des similarités structurales avec l'activateur du plasminogène tissulaire humain (tPA) et semblent être plus puissantes que le tPA (Gardell *et al.*, 1991).

Enfin, une activité fibrinolytique appelée RHOKINASE a été détectée chez la punaise *Rhodnius prolixus* (Ribeiro *et al.*, 1981).

## **IV) LES AUTRES INHIBITEURS DE PROTEASES DES SANGSUES**

(Tableau III).

### **A) HIRUDO MEDICINALIS.**

#### **1) LES BDELLINES**

La sangsue médicinale contient une famille d'inhibiteurs de protéases appelés BDELLINES. Elles ont une activité antitrypsine et antiplasmine (Fritz *et al.*, 1969). La composition en acides aminés permet de distinguer deux types de bdellines; les bdellines A et les bdellines B. Ces inhibiteurs contiennent un grand nombre de résidus cystéine et histidine mais ils ne possèdent pas de résidu proline. La bdelline B3 avec une masse moléculaire de 5 kDa est la plus petite forme connue chez cette sangsue.

#### **2) LES EGLINES.**

Cette autre famille de molécules isolées chez la sangsue médicinale correspond à de puissants inhibiteurs de l'élastase et de la cathepsine G relarguées par les granulocytes humains. Les églines inhibent aussi la chymotrypsine et la subtilisine, protéase issue de *Bacillus subtilis* (Seemüller *et al.*, 1977). Elles possèdent une forte homologie avec les inhibiteurs de la chymotrypsine et de la trypsine isolés de la pomme de terre et de l'orge. Ces inhibiteurs sont remarquables par l'absence de méthionine, d'isoleucine et de ponts disulfures. Leur stabilité est assurée par les interactions hydrophobes entre des acides aminés adjacents.

La plus connue de ces substances est l'église C avec une masse moléculaire de 8,1 kDa et composée de 70 acides aminés. Cet inhibiteur existe sous forme recombinée grâce à son expression chez *E.coli* (Rink *et al.*, 1984).

#### **3) L'HIRUSTASINE.**

L'hirustasine est le premier inhibiteur de la kallikréine identifié chez la sangsue. Cette protéine composée de 55 acides aminés et d'une masse moléculaire de 5,8 kDa inhibe aussi la trypsine, la chymotrypsine, la plasmine, et la cathepsine G (Söllner *et al.*, 1994) L'hirustasine est caractérisée par le fait qu'elle possède respectivement 27% et 32% d'homologie avec le premier et le second domaine de l'antistasine. De plus, l'espace entre les 10 résidus cystéine est conservé. Cependant, malgré sa similitude avec l'antistasine, en particulier dans la région du site actif, l'hirustasine n'a aucune activité inhibitrice sur le facteur Xa.

#### **4) LDTI (Leech Derived Tryptase Inhibitor).**

Cette protéine composée de 46 acides aminés et d'une masse moléculaire de 4,7 kDa est un inhibiteur de la trypsine, de la chymotrypsine et de la tryptase, une enzyme membre de la famille des sérines protéases "trypsine like", qui n'est exprimée

Tableau III : Les inhibiteurs d'enzymes protéolytiques chez les sanguines.

Espèce	composant	Mode d'action
Hirudo medicinalis	bdellines	inhibiteur de la trypsine, plasmine
	eglines	inhibiteur de l'élastase, cathepsine G, chymotrypsine , subtilisine
	hirustasine	inhibiteur de la trypsine, chymotrypsine cathepsine G, kallicréine
	LDTI	inhibiteur de la tryptase, trypsine chymotrypsine
Hirudo nipponia	bdelline KL	inhibiteur de la trypsine, plasmine
	guamérine	inhibiteur de l'élastase
Hirudinaria manillensis	géline	inhibiteur de l'élastase, cathepsine G, chymotrypsine
Whitmania endentula	guamérine II	inhibiteur de l'élastase, chymotrypsine

que par les mastocytes (Sommerhoff *et al.*, 1994). Cette protéine existe sous forme recombinée grâce à l'expression de l'ADNc chez la levure *S.cerevisiae* (Auerswald A.E *et al.*, 1994).

## B) HIRUDO NIPPONIA.

### 1) LA BDELLINE-KL.

Un nouvel inhibiteur de la trypsine; la bdelline KL (bdelline for Korean Leech) a été isolé à partir de la sangsue hématophage *Hirudo nipponia* (Kim *et al.*, 1996). Cette protéine de 143 acides aminés et d'une masse moléculaire de 16 kDa inhibe aussi la plasmine. Sur les 61 acides aminés de la partie N-terminale obtenus, cette protéine possède 80% d'homologie de séquence avec la bdelline B3. De plus, la position des résidus cystéine des bdelline KL et B3 et de la LDTI est similaire.

### 2) LA GUAMERINE.

Chez *H.nipponia*, un inhibiteur spécifique de l'élastase leucocytaire a été isolé et appelé GUAMERINE (Jung *et al.*, 1995). Cette protéine d'une masse moléculaire de 6 kDa est composée de 57 acides aminés et est riche en résidus cystéine. La guamérine possède respectivement 51% et 39% d'homologie de séquence avec l'hirustasine et le deuxième domaine de l'antistasine. De plus, l'espace entre les résidus cystéine est conservé.

## C) HIRUDINARIA MANILLENSIS.

Chez cette sangsue, un inhibiteur de l'élastase pancréatique, de la chymotrypsine et de la cathepsine G a été isolé (Electricwala *et al.*, 1993). Cet inhibiteur nommé GÉLINE possède une masse moléculaire (5 kDa) et une activité inhibitrice semblables à celles de l'église C, cependant sa structure lui est fondamentalement différente.

## D) WHITMANIA EDENTULA.

Un inhibiteur de sérine protéase riche en résidus cystéine appelé la GUAMERINE II a été isolé chez la sangsue non hématophage *Whitmania edentula* (Kim *et al.*, 1996). Cet inhibiteur de l'élastase des neutrophiles et de la chymotrypsine possède une masse moléculaire de 6 kDa et est composé de 56 acides aminés. La guamérine II possède respectivement 77%, 48% et 29% d'homologie avec la guamérine, l'hirustasine et le premier domaine de l'antistasine. L'espace entre les résidus cystéine est également conservé.

Tableau IV : Les protéines d'intérêts pharmaceutiques chez les sangsues ( Sawyer, 1991).

Composé	Activité	Cible thérapeutique	Données	Compagnie
Antistasine	Inhibiteur du facteur Xa	Anticoagulant Antimétastasique	Gène cloné Tests pré-clinique	Merck, Sharp&Dohme West point, U.S.A.
Caline	Inhibiteur de l'adhésion plaquettaire	Pontage coronarien, microchirurgie Prévention de la réocclusion	Purification et Caractérisation	BioPharm Hendy, Angleterre
Décorsine	Antagoniste de la GP IIb/IIIa	Inhibition de l'agrégation plaquettaire	Gène cloné chez E.coli	Genentech So. San Francisco, U.S.A.
Destabilase	Dépolymériser la fibrine	Dissolution des caillots de fibrine	Evaluation chez des modèles animaux de thrombose	Inst. de génétique moléculaire Moscou, U.R.S.S
Egline	Inhibiteur de l'élastase et de la chymotrypsine	Emphysème, anti-inflammatoire	Gène cloné chez E.coli Tests précliniques	CIBA-Geigy Basle, Suisse
Geline	Inhibiteur de l'élastase et de la chymotrypsine	Gingivite, dermatitis Anti-inflammatoire	Essais cliniques chez l'homme pour des applications orales et pour le dermatitis	EuroBioPharm Ridderkerk, Hollande
Ghilantène	Inhibiteur du facteur Xa	Anticoagulant Antimétastasique	Evaluation chez des modèles animaux de métastases	Merrell Dow Research Inst. Cincinnati, U.S.A.
Hémentine	Clive le fibrinogène	Dissolution des caillots riche en plaquettes	Gène cloné, Tests précliniques	BioPharm Charleston, U.S.A.
Orgélase*	Hyaluronidase	Infarctus du myocarde Ophtalmologie	Tests précliniques	Biopharm Angleterre

\*: L'orgélase est une  $\beta$  endoglucuronidase qui hydrolyse l'acide hyaluronique. Cette molécule est considérée comme un facteur de propagation permettant d'augmenter le taux de diffusion des sécrétions salivaires autour de la morsure de la sangsue. L'orgélase est capable de dissoudre la capsule de polysaccharides qui protège certaines bactéries contre les mécanismes de défense de l'hôte, conduisant ainsi à la formation d'anticorps (Sawyer, 1986).

Les inhibiteurs de protéases isolés chez les sangsues hématophages représentent un enjeu économique important. En effet, plusieurs firmes pharmaceutiques se sont investies dans des recherches relatives à ces protéines. Ces études sont menées dans le plus grand secret et de ce fait peu de résultats sur les intérêts pharmaceutiques de ces molécules ont été publiés. Les seules données que nous possédons (Tableau IV) sont tirées de *Sawyer R.T. (1991)*.

# **Les inhibiteurs de la coagulation**

## **Articles présentés**

- (1) Amino-acid-sequence determination and biological activity of Theromin: a novel thrombin inhibitor isolated from the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum* (en vue de dépôt de brevet).
- (2) Amino-acid-sequence determination and molecular cloning of Therostasin: a novel factor Xa inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum* (en vue de dépôt de brevet).

La prévention des maladies cardio-vasculaires, premières causes de mortalité dans les pays industrialisés fait appel à des agents antithrombotiques et/ou thrombolytiques. Les animaux hématophages représentent l'une des sources potentielles de ces substances. En effet, leur longue coévolution avec leur hôte a conduit à la sélection de molécules anticoagulantes particulièrement efficaces, contenues dans les sécrétions de leurs glandes salivaires.

La sanguine élevée au laboratoire, *T. tessulatum* représentait une source potentielle de ces substances actives. La position systématiques de cette sanguine (Rhynchobdelle primitive) et la nature de ses hôtes (oiseaux aquatiques) étaient en faveur de substances différentes de celles déjà connues chez les Hirudinées. De plus R.T. Sawyer (communication personnelle) nous avait fait part d'indices en faveur de la présence d'un antithrombotique que chez cette espèce, c'est à dire d'un type d'anticoagulant qui n'avait jamais été signalé chez les Rhynchobdelles.

Les premiers travaux initiés par J. Malecha avec la collaboration de J.L. Baert et M. Salzet ont confirmé la présence d'une telle molécule et ont montré l'existence d'un inhibiteur du facteur Xa.

Mon travail a porté sur la caractérisation de ce dernier et s'est poursuivi par l'obtention du cDNA en vue de sa production par génie génétique. Dans le cas de l'inhibiteur de la thrombine j'ai contribué avec I. Matias à sa caractérisation biochimique et je participe à son clonage.

A partir des parties antérieures de la sanguine *T. tessulatum*, nous avons isolé un nouvel inhibiteur de la thrombine: la théromine. Cet inhibiteur de 14 kDa formé de deux monomères de 67 acides aminés. Tout comme l'hirudine, il possède une forte affinité vis à vis de la thrombine. Ce travail représente la première mention d'un inhibiteur de la thrombine isolé d'une part d'une sanguine à trompe et d'autre part, d'une sanguine possédant également un inhibiteur du facteur Xa.

En effet, la thérostasine est un nouvel inhibiteur du facteur Xa de 9 kDa composé de 82 acides aminés. Le criblage d'une banque d'ADNc réalisée à partir des parties antérieures de *T. tessulatum* a conduit à l'isolement d'un ADNc d'une taille de 883 paires de bases codant pour une protéine de 101 acides aminés correspondant à la thérostasine native précédée d'un peptide signal de 19 acides aminés.

# **Amino-acid-sequence and biological activity of theromin a novel thrombin inhibitor isolated from the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum***

**Isabel Matias<sup>1</sup>, Vincent Chopin<sup>1</sup>, Jean-luc Baert<sup>2</sup>, Michel Salzet<sup>1\*</sup>and Malecha Jean<sup>1</sup>**

1 : Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, groupe de Neuroimmunité des Hirudinées, SN3, Université des Sciences et Technologie de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

2 : Institut Pasteur de Lille, rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille, France

To whom correspondence should be addressed : Professeur M. Salzet, Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, groupe de Neuroimmunité des Hirudinées, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France. Tel : (33)-3-2043-6839, Fax : (33)-3-2004-1130. E-mail : salzet@pop.univ-lille1.fr

## ***Acknowledgments***

We would like to thank Dr. A. Van Dorsselaer, (Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique, UA 31 CNRS, Strasbourg, France), for the mass spectrometry determination. The authors are very grateful to Annie Desmons for her technical assistance. This work was in part supported by the following grants: Conseil régional Nord-Pas de Calais Crédit FEDER, NIMH COR 17138, NIDA 09010 and the Research Foundation and Central Administration of the State University of New York (GBS) and NIH Fogarty INT 00045 (MS and GBS).

---

\* The abbreviations used are : Theromin, *Theromyzon* thrombin inhibitor, MALDI-MS, Matrix assisted laser desorption mass measurement.

Enzymes. Chymotrypsin (EC 3.4.21.1); Trypsin (EC 3.4.21.4); activated factor Xa (EC.3.4.21.6); Thrombin (EC 3.4.21.5), porcine pancreatic elastase (EC 3.4.21.11), cathepsin G (EC 3.4.21.20).

**Abstract :** We purified a new thrombin inhibitor, designated THEROMIN, from the rhynchobellid leech *Theromyzon tessulatum*. Theromin was purified to apparent homogeneity by gel permeation and anion-exchange chromatographies followed by two reversed-phase HPLC. By a combination of reduction and s- $\beta$ -pyridylethylation, Edman degradation, trypsin enzymatic digestion and matrix assisted laser desorption mass spectrometry measurement, the primary sequence of theromin (a homodimer of 67 amino acid residues, m/z 14491 Da, 16 cysteine residues) was determined. This peptide exhibits no sequence homology with known thrombin inhibitors. By contrast, theromin exhibits a *ca.* 27% sequence identity with peptides of the antistasin-type protease inhibitor family *i.e.* the first and second domain of antistasin, hirustasin, gilanthen and guamerins (I, II). Theromin like hirudin is a tight-binding inhibitor of thrombin ( $K_i : 12 \pm 5$  fM) and has no action towards trypsin, chymotrypsin, coagulation factor Xa, elastase or cathepsin G. Dimerisation of theromin is not necessary for activity. In fact, each monomer is able to act on thrombin. Theromin represents the most potent and naturally occurring thrombin inhibitor known at the present time.

## **Introduction**

In order to understand pathological phenomena such like caediovascular disease, scientists have developed hematophagous animals as models in which to find new antithrombin molecules. In hematophagous leeches, studies on serine-protease inhibitors have yielded significant results in this regard. Of two groups of serine-protease inhibitors found, one is related to specific inhibitor of proteases interfering with the activation of the blood clotting processes, i.e., thrombin inhibitors such as hirudin [1] and haemadin [2] and inhibitors of coagulation Factor Xa, i.e., antistasin [3] and ghilanten [4]. The second group of inhibitors act on the extracellular matrix, i.e., bdellins [5], eglins [6], gelin [7], guamerins [8, 9] and hirustasin [10]. Some of them exhibit different amino acid sequences and inhibitory activities, their three-dimensional structure shares the same structural motif with the Leech Antihemostatic Protein (L.A.P.) [11]. Interestingly, their mechanisms of action and epitopes, important for binding to their respective targets, are distinct as well [11].

In addition, Tuszyński *et al* [12] demonstrated that antistasin also exhibits antimetastatic properties [12]. Hirustasin (5.866 kDa) was isolated from the jaw leech *H. medicinalis* [13] and shares *ca.* 35% sequence identity with the first and the second domain of antistasin [13]. Furthermore, in the rhynchosellid leech *T. tessulatum*, new serine-protease inhibitors (therin [14] and cytin [15]) towards trypsin or chymotrypsin respectively have been isolated. Thus, hematophagous leeches serve as a potential reservoir of protease inhibitors. Thus, we demonstrate for the first time the isolation and characterization of a highly specific and new thrombin inhibitor, designated theromin.

## **Materials and Methods**

### **Materials**

Starved *T. tessulatum* leeches were maintained in our laboratory as noted elsewhere in detail [16]. Chromogenic substrates S-2765, S-2238, S-2586 were purchased from Kabi Diagnostica. Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Baker. Trifluoroacetic acid (TFA) was from Pierce, porcine pancreatic elastase (EC 3.4.21.11), chymotrypsine (EC 3.4.21.1), trypsin (EC 3.4.21.4), cathepsin G (EC 3.4.21.20), thrombin (EC 3.4.21.5) and chromogenic substrates, (Benzoyl-arginine *p*-nitroanilide, *N*-succinyl Ala-Ala-Ala *p*-nitroanilide (SAAP), *N*-succinyl Ala-Ala-Pro-Phe *p*Na) were obtained from Sigma. Molecular weight calibration markers for SDS-PAGE were purchased from Pharmacia. All other reagents were of analytical grade.

Discarded human saphenous vein were obtained from patients at University Hospital (State University of New York at Stony Brook); these vessels are normally used for coronary artery bypass grafting. The vessels were cut into 3 mm ring sections. The sections were cut and the flat tissue, endothelial side up, was used for the NO determinations. Patient eligibility included admission for elective coronary artery bypass grafting only for atherosclerotic heart

disease. Patients with chronic illnesses such as diabetes or cancer as well as acute processes (e.g., known infections, trauma) were not eligible.

### **Isolation of theromin**

#### *Chromatography on Superdex G75 column*

After anesthesia of the animals in 0.01% chloretone, posterior parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. 8 g. of anterior parts were placed in 25 ml 20 mM Tris/HCl, pH 8.4, 200 mM NaCl (Tris/NaCl) and homogenized at 4°C with a polytron (five 15s bursts on setting 9). After centrifugation (30 min at 12,000 rpm on Sigma 2K15 rotor at 4°C), the pellet was extracted six-fold with Tris/NaCl. Supernatants were combined and filtered on nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size; Millipore). The extract was applied onto a FPLC column (Superdex G75, 16/60, Pharmacia; equilibrated with Tris/NaCl) at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by absorbance at 280 nm. All column fractions (1 ml) were assayed for protease inhibitor activity against thrombin.

#### *Chromatography on Mono Q*

Pooled active fractions were concentrated 20-fold in a vacuum centrifuge (Savant) before being loaded onto a Mono Q (FPLC, HR 5/5, Pharmacia) column, equilibrated in 20 mM Tris/HCl, pH 8.8. The column was washed with the same buffer and eluted with a discontinuous linear gradient of 0.2 M to 1.5 M NaCl in 60 min at a flow rate of 1ml/min.

#### *Final purification*

Fractions containing theromin were applied to a C8 Lichrosphere Rp100 column (125 mm x 4.6 mm, Merck) with a linear gradient of acetonitrile 3.3%/min in water acidified with 0.1 % trifluoroacetic acid at a flow rate of 1 ml/min. The active fractions were then purified on the same column with a shallower gradient (1%/min). All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a photodiode array detector Beckman 168.

### **Chromogenic assay**

During the purification procedure, inhibitory activity was assayed by measuring the inhibition of the release of p-nitroanilide from the synthetic substrate catalyzed by thrombin. Samples were incubated with a known amount of thrombin in Tris/NaCl for 15 min at room temperature. The assay was started by addition of the chromogenic substrate. The released nitroaniline was monitored photometrically at 405 nm for 3.5 min using a Dynatec MR-5000 at room temperature. A control reaction, in the absence of theromin, was carried out under identical conditions. The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml 50% glacial acetic acid.

1 U protease inhibitory activity is as defined 1 $\mu$ g of protease inhibited, and specific activity as U/mg protease inhibited [17].

### **Protein assay**

Protein concentrations were determined by the Bradford procedure [18] using  $\gamma$  globulin as a standard.

### **Electrophoresis**

Electrophoresis analysis of reduced and denatured proteins was performed in 10-25% SDS/polyacrylamide gradient gels in presence of  $\beta$ -mercaptoethanol as described by Laemmli [19].

### **Structural analysis of the thrombin inhibitor**

#### **Capillary zone electrophoresis**

Prior to microsequencing, the purity of the peptide was evaluated by capillary electrophoresis. Samples (2 nl) were injected under vacuum into a 270A-HT capillary electrophoresis system (Applied Biosystems) equipped with a fused silica capillary (72 cm length). Separation from anode to cathode was carried out in 20 mM citrate buffer (pH 2.5) with a voltage of 20 kV, at 30°C. Capillary effluent was monitored by its absorption at 200 nm.

#### **Reduction and S- $\beta$ -pyridylethylation**

10  $\mu$ l of inhibitor (50 pmol) was dissolved in 40  $\mu$ l of 0.5 M Tris/HCl pH 7.5 and 2 mM EDTA containing 6 M guanidine hydrochloride to which 2  $\mu$ l 2 M dithiothreitol were added in the dark. The sample was flushed with nitrogen and incubated at 45°C for 1 h. Freshly distilled 4-vinylpyridine (2 $\mu$ l) was added and incubated for 10 min at 45°C in the dark. The pyridylethylated peptide was separated by reversed-phase HPLC prior to microsequencing.

#### **Microsequence analysis**

Automated Edman degradation of both native and pyridylethylated peptides and detection of phenylthiohydantoin (Pth-Xaa) derivatives were performed on a pulse-liquid automatic sequencer (Beckman, LF3200).

#### **Enzymatic treatment**

An aliquot of the s- $\beta$ -pyridylethylated theromin was treated with trypsin (TPCK treated, Takara, Koyto, Japan) in a ratio 25% (w/w). The material was digested according to the manufacturers' directions (37°C, 16h); the reaction was stopped by acidification and the peptide

fragments separated on a RP100 C18 column (250 x 4.6 mm, Merck) equilibrated with acidified water. Fractions were eluted with a linear gradient, 0-80%, of acetonitrile in acidified water over 80 min at a flow rate of 1 ml/min. Emerging peaks were concentrated in a vacuum centrifuge (Savant) prior to sequencing.

### **Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS)**

Purified theromin (1  $\mu$ l) was deposited on a thin layer of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid crystals made by fast evaporation of a saturated solution in acetone. The droplet was allowed to dry under a gentle vacuum before introduction into the mass spectrometer. MALDI-MS measurement was performed in a Bruker BIFLEX<sup>TM</sup> (Bruker, Bremen, Germany) operating in the positive linear mode. Ions were formed by a pulse ultraviolet laser beam (nitrogen laser,  $\lambda$  = 337 nm). Mass spectra were obtained by averaging 50-100 laser shots. External mass calibration was provided by the [M + H]<sup>+</sup> ion of angiotensin II (1047.20 Da), ACTH (18-39) (2466.73 Da), and bovine insulin (5734.56 Da) and/or using matrix peaks [M + H]<sup>+</sup> : 190.05; [2M + H]<sup>+</sup> : 379.09 Da).

### **Determination of equilibrium constants**

To determine the specificity of theromin, its inhibitory activity towards different serine-proteases was compared using established chromogenic assay methods. Equilibrium dissociation constants ( $K_i$ ) for the complexes of theromin with individual proteases were determined essentially as described by the method of Henderson [20] and simplified by Bieth [21]. In brief, increasing amounts of theromin were incubated with a constant amount of protease in Tris/NaCl for 30 min at 37°C and the remaining protease activity was measured by the addition of the chromogenic substrate. Remaining protease activity was monitored by absorbance at 405 nM. Graphical analysis yielded an apparent  $K_i$  using the equation :  $[I]/(1-a)=K_{iapp} (1/a)+ [P]$ , where [I] and [P] are the initial concentration of inhibitor and protease respectively, and a is the remaining fractional protease activity (100% control activity equals fractional activity of 1.0) [22].

### **Sequence identity and sequence alignment**

The sequence identity of theromin with other serine-protease inhibitors was determined using the BLITZ database search (<http://www.ebi.ac.uk/searches/blitz.html>). The amino acid sequences of the various antistasin-type protease inhibitors were aligned using MPSrch version 1.5 algorithm (Shane S. Sturrock & John F. Collins, 1993. Biocomputing Research Unit, University of Edinburgh, UK).

### **Direct Measurement of NO Release**

NO release from the saphenous vein fragments (3 mm ring opened longitudinally and the endothelial surface faced the probe) was measured directly using an NO-specific amperometric probe (World Precision Instruments, Sarasota, FL) as previously described [23,29]. Briefly, the vessel fragments were placed in 2 ml PBS endothelial side up. A micromanipulator (Zeiss-Eppendorff) attached to the stage of an inverted microscope (Nikon Diaphot) was employed to position the amperometric probe 15  $\mu$ m above the cell surface. The system was calibrated daily using different concentrations of the nitrosothiol donor S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP; Sigma, St. Louis, MO) to generate a standard curve. Baseline levels of NO release were determined by evaluation of NO release in PBS. Cells were stimulated with the respective ligand, and the concentration of NO gas in solution was measured in real-time with the DUO 18 computer data acquisition system (World Precision Instruments). The amperometric probe was allowed to equilibrate for 12 hours in PBS prior to being transferred to the tube containing the tissue. Manipulation of the tissue was performed only with glass instruments. Each experiment was repeated four times. The mean values for NO release were obtained at two minute intervals for cNOS-coupled NO release as indicated. Each experiment was simultaneously performed with a control (vehicle alone) to exclude experimental drift in NO release.

Data were evaluated by Student's *t*-test. Data acquisition was by the computer-interfaced DUO-18 software (World Precision Instruments). The experimental values were then transferred to Sigma-Plot and -Stat (Jandel, San Rafael, CA) for graphic representation and evaluation. Data gatherers were unaware of the experimental treatment.

## **RESULTS**

### ***Purification of theromin***

The results of the stepwise purification of theromin are summarized in Table 1. After extraction, filtered supernatants were subjected to a gel permeation chromatography on Superdex G75 column. A single zone at a retention time between 21 and 23 min corresponding to proteins having a molecular mass less than 20 kDa, was detected (Figs. 1a). The inhibitor was then purified by anion exchange chromatography on a Mono Q column using a stepwise gradient of NaCl from 0-1.5 M. The thrombin inhibitor eluted from the column at a retention time of 0.38-0.4 M NaCl (Fig. 1b). SDS-PAGE control revealed several protein bands at a molecular mass less than 20 kDa (Fig. 2 lane c). Finally, this peptide was purified by two successive reversed-phase HPLC on a C8 Lichrosphere column using a linear gradient of acetonitrile in acidified water. Several peaks eluted from the column at retention time 15-18 min (corresponding to 53.28%-59.94% of acetonitrile) in the HPLC1 conditions (Fig. 1c). In HPLC2 conditions, a single peak presenting the activity was obtained at a retention time of 36.7 min (corresponding to 36.76% of acetonitrile) (Fig. 1d). After the final reversed-phase HPLC,

purity of the purified material was established by capillary zone electrophoresis (Fig. 3) and SDS-PAGE (Fig. 2 lane d). A single band at a Mr. of ca. 15 kDa was obtained (Fig. 2 lane d).

### ***Biochemical characterization***

Prior to its microsequencing, the purified peptide was reduced and s- $\beta$ -pyridylethylated, then subjected to automated Edman degradation. The 54 first amino acid residues were obtained on 25 pmol of isolated theromin with a repetitive yield of 96%, ECENTECPRACPGEYEFDEDGCNTCVCKGCDDAQCRCSSDANGCESFCTCNTR<sup>54</sup>. A trypsin digestion followed by a reverse-phase separation, microsequencing and MALDI-MS of each emerging peak (Fig. 4) allowed us to determined the complete sequence as ECENTECPRACPGEYEFDEDGCNTCVCKGCDDAQCRCSSDANGCESFCTCNTRCSAAD ECNPRCTCK. The molecular mass, measured by MALDI-MS of the native molecule (*m/z* 14491) Da (Fig. 5a) is in agreement with that found by SDS-PAGE. By contrast, after reduction and s- $\beta$ -pyridylethylation of the molecule, the mass measured is lower *m/z* : 8911.5 Da (Fig. 5b). This measured mass is in good agreement with the monoisotopic molecular mass of an homodimer of theromin calculated from the amino acid sequence with 16 cysteines (7214.69 Da). Taken together, the data demonstrates that theromin is a homodimer of 14.5 kDa.

No sequence homology with theromin was found with hirudin [1] and haemadin [2], known thrombin inhibitors isolated from jawed leeches. Theromin only exhibits a 24% of sequence identity with inhibitors of the antistasin-type family (antistasin [3], gilanthen [4], hirustasin [10], guamerins [8, 9]). The sequence similarity is the much higher than the first domain of antistasin (26.9%) [12]. Furthermore, if theromin is aligned with these potentially homologous inhibitors on the basis of their cysteines, the position of the cysteines matches best with all antistasin-type protease inhibitors. The P1 residue of the reactive site of the inhibitor generally determines its specificity [26]. In antistasin, only the N-terminal domain is inhibitory and the P1 residue has been determined as Arg34 [12]. This residue corresponds to Arg30 of hirustasin, Met35 in guamerin (I and II) [8, 9]. In theromin, we speculate that the Glu45 may be the P1 residue (Table 2).

### ***Biological Activity of theromin***

Theromin inhibits thrombin with high affinity and specificity (*Ki* value of  $12 \pm 5$  fM). This value is much higher than that obtained with hirudin (21 fM) [1] and heamadin (100 fM) [2]. Theromin has no activity towards trypsin, chymotrypsin, elastase, cathepsin G, plasmin and factor Xa, despite its low homology with antistasin-type inhibitors family.

Because hirudin, at concentrations from 0.1 to 2 microM, induced vasodilation of PGF2 alpha-precontracted ring segments of porcine pulmonary arteries with intact endothelium we sought to determine if theromin could release endothelium-derived NO [28]. However, theromin, regardless of concentration, did not stimulate endothelial NO release from human

saphenous vein endothelial cells (data not shown). The vein fragments were judged to be in fine condition because 1  $\mu$ M morphine released NO ( $33.6 \pm 4.6$  nM NO) as expected [29].

### Conclusion

In the present study we demonstrate the presence of a novel 67 amino acid protein that inhibits thrombin, designated theromin, from a non-jawed leech. Theromin's novelty is based on its low sequence identity to known thrombin inhibitors as well as with the antistasin-type protease inhibitor family. In this regard, we further demonstrate that it appears to be the most potent thrombin inhibitor known. We also demonstrate that each of theromin's monomers possess thrombin inhibitory activity which may help explain its efficacy.

Concerning theromin's biological activity, we have previously demonstrated the following [13, 27]: Lipopolysaccharides (LPS) stimulate immunocytes in a process that exhibits a primary and secondary phase of stimulation [14]. The LPS-stimulated secondary phase appears to require enzyme-processed secretory products released from immunocytes [30-33]. Aprotinin, a serine protease inhibitor used in clinical situations, significantly reduces the level of immunocyte activation, probably by inhibiting this "secondary" processing thus releasing or freeing immunocyte excitatory peptides, and theromin also diminishes this action as well when pooled with therin [13] and tessulin [27], other serine protease inhibitors.

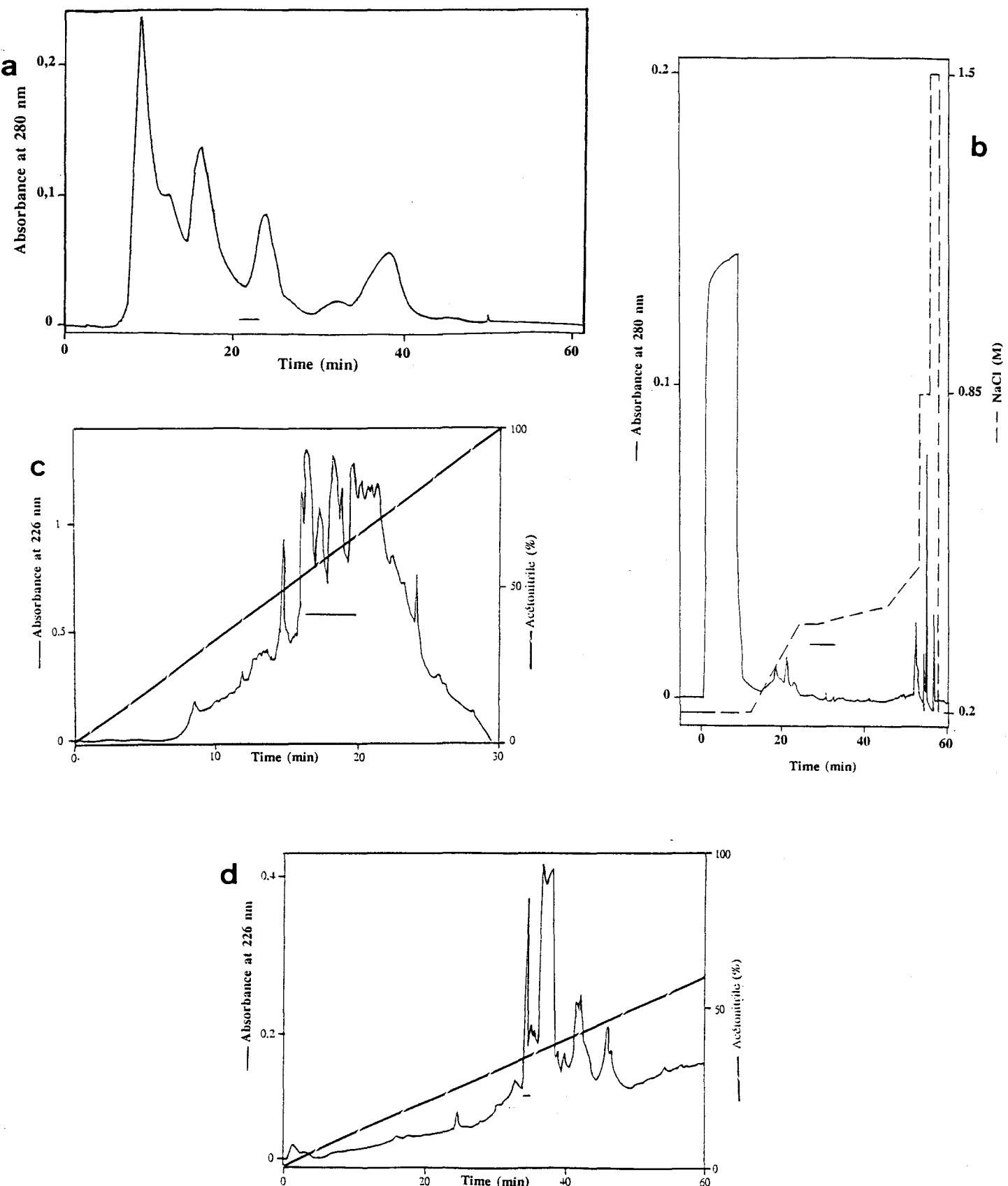
Taken as a whole, the present study demonstrates that these relatively primitive organisms have devised highly specific mechanisms to communicate with their hosts. These mechanisms, at the same time, serve to indicate the significance of various host processes as well as to shed light on their "vulnerable" steps. Indeed, these vulnerable points of "alteration" may well be used clinically to curtail pathological processes where deemed appropriate, i.e., diffuse inflammatory response associated with major surgery [28].

### REFERENCES

- [1] Markwardt, F. (1970) Hirudin as an inhibitor of thrombin. Proteolitic enzymes (ed. Perlman G.E. and Lorand L.) *Meth. Enzymol.* **19**, 924-932.
- [2] Strube, K-H., Kröger, B., Biolojan, S., Otte, M. et Dodt, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 8590-8595.
- [3] Gasic, G.J., Viner, E.D., Budzynski, A.Z. et Gasic, G.P. (1983) *Cancer Res.* **43**, 1633-1636.
- [4] Blankenship, D.T., Brankamp, R.G., Manley, G.D. et Cardin, A.D. (1990) *Biochem. Biophys. Commun.* **166**, 1384-1389.
- [5] Fritz, H. et Krejci, K. (1976) *Meth. Enzymol.* **45**, 797-805.
- [6] Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Muller, H.-P. et Fritz, H. (1977) *Hoppe-seyler Z. Physiol. Chem.* **358**, 1105-1117.

- [7] Electricwala, A., Von Sicard, N.A.E., Sawyer, R.T. et Atkinson, T. (1993) *J. Enzyme Inhibition* **6**, 293-302
- [8] Kim, D.R., Hong, S.J., HA, K.-S., O Joe, C. and Kang, K.W. (1996) *J. Enz. Inhibit.* **10**, 81-91.
- [9] Jung, H.I., Kim, S.I., Ha, K.S. and Kang, K.W. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13879.
- [10] Söllner, C., Mentele, R., Eckerskorn, C., Fritz, H. And Sommerhoff, C. P. (1994) *Eur. J. Biochem.* **219**, 937-943.
- [11] Krezel, A.M., Wagner,G., Seymour-Ulmer, J. and Lazarus, R.A. (1994) *Science* **264**, 1944-1947
- [12] Tuszyński, G.P., Gasic, T.B. and Gasic, G.J. (1987) *J. Biol. Chem* **262**, 9718-9723
- [13] Chopin, V., Matias I., Stefano G.B. and Salzet, M. *Eur. J. Biochem*, in revision
- [14] Chopin V., Stefano G.B., Bilfinger, T.V., Matias, I. and Salzet, M. (1997) *Eur. J. Biochem* **249**, 733-738.
- [15] Soeparwata, R., Hartmen, A.R., Stefano, G.B., and Bilfinger, T.V., (1996) *Int. J. Cardiology* **53(26)**, 55-65.
- [16] Malecha, J., Verger-Bocquet, M., Leprêtre, A., and Tramu, G. (1989) *C. R. Acad. Sci. Paris* **309**, 127-130.
- [17] Goldstein, A. M., Murer, E. H. and Weinbaum, G. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* **84B**, 117.
- [18] Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- [19] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- [20] Henderson, P. (1972) *Biochem J.* **127**, 321-333.
- [21] Bieth, J. G. (1980) *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **16**, 183-195.
- [22] Pratt, C.W., Pizzo, S.V. (1987) *Biochemistry* **226**, 2855-2863.
- [23] Stefano, G.B., Scharrer, B., Smith, E.M., Hughes, T.K., Magazine, H.I., Bilfinger,T.V., Hartman,A.R., Fricchione, G.L., Liu,Y., and Makman, M.H., (1996) *Critical Reviews in Immunology*.**16**, 109-144.
- [24] Stefano, G.B., Hartman, A., Bilfinger, T.V., Magazine, H.I., Liu, Y., Casares, F., and Goligorsky, M.S. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 30290.
- [25] Magazine, H.I., Liu, Y., Bilfinger, T.V., Fricchione, G.L., and Stefano, G.B.(1996) *J.Immunol.* **156**, 4845
- [26] Morisson, J.F. (1969) *Biochem. Biophys. Acta* **185**, 269-286.
- [27] Chopin, V. and Salzet, M. submitted for publication in *Eur. J. Biochem*.
- [28] Roston, D. (1996) *Int. J. Cardiol.* **53 suppl**, S11-S37.
- [29] Bilfinger TV, Hartman A, Liu Y, Magazine HI, Stefano GB: (1997) *Ann. Thor. Surgery* **63**:1063.
- [30] Salzet, M., Stefano, G.B. (1997) *Brain Res.* **768**, 224-232.
- [31] Salzet, M., Salzet-Raveillon, B., Cocquerelle, C., Verger-Bocquet, M., Pryor S.C., Rialas, C.M., Laurent, V., Stefano, G.B. (1997) *J. Immunol.* **159**, 5400-5411.

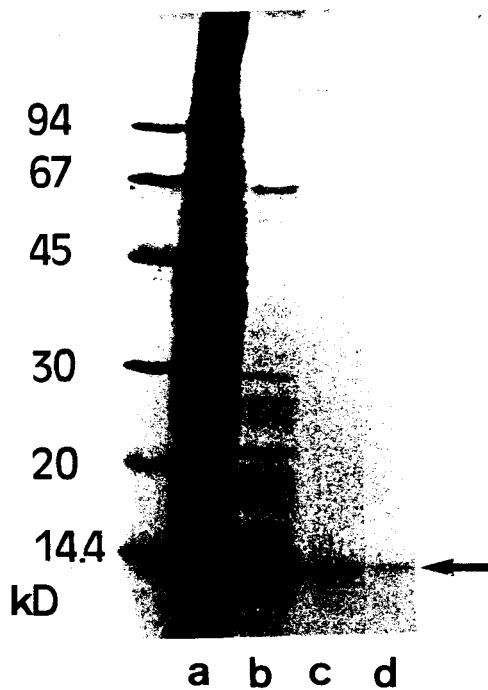
- [32] Salzet, M., Stefano, G.B., *Mol. Brain Res.* **52**, 47-55
- [33] Stefano, G.B., Bilfinger, T.V., and Fricchione, G.L., (1994) *Prog. Neurobiol.* **42**, 475-488.



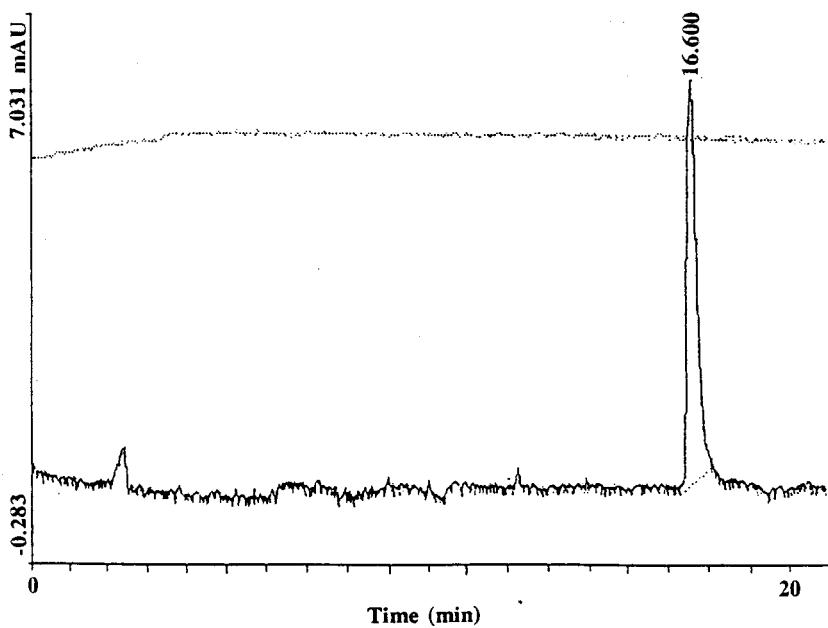
**Figure 1 : Elution profiles of theromine following purification steps.**

Elution profiles on Superdex G75 column (a) ; Mono Q column (b) ; Final step of purification on C8 reversed phase column with a linear gradient of acetonitrile 3.3%/min ( c ) and a shallower gradient (1%/min) (d).

The solid bars indicate the fractions containing theromine.



**Figure 2 :** Photography represent the fractions containing the theromine separated by SDS/Page under reducing conditions : (a) crude extract ; (b) after Superdex G75 column separation ; (c ) after Mono Q column separation ; (d) after the final step of purification on C8 reversed phase column.



**Figure 3 :** Capillary electrophoresis of isolated theromine.

Analyses were performed using a 72-cm capillary with 20 mM sodium citrate, pH 2.5.

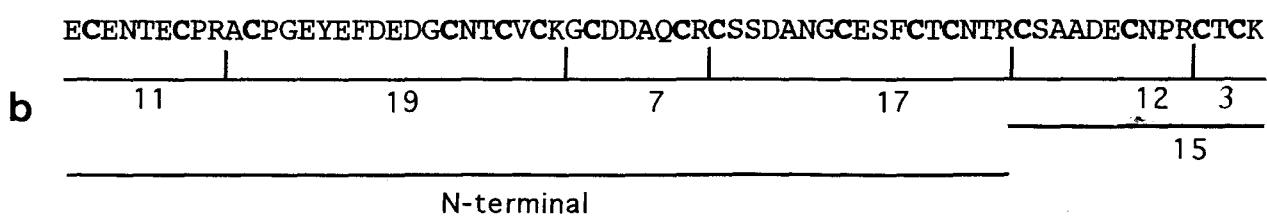
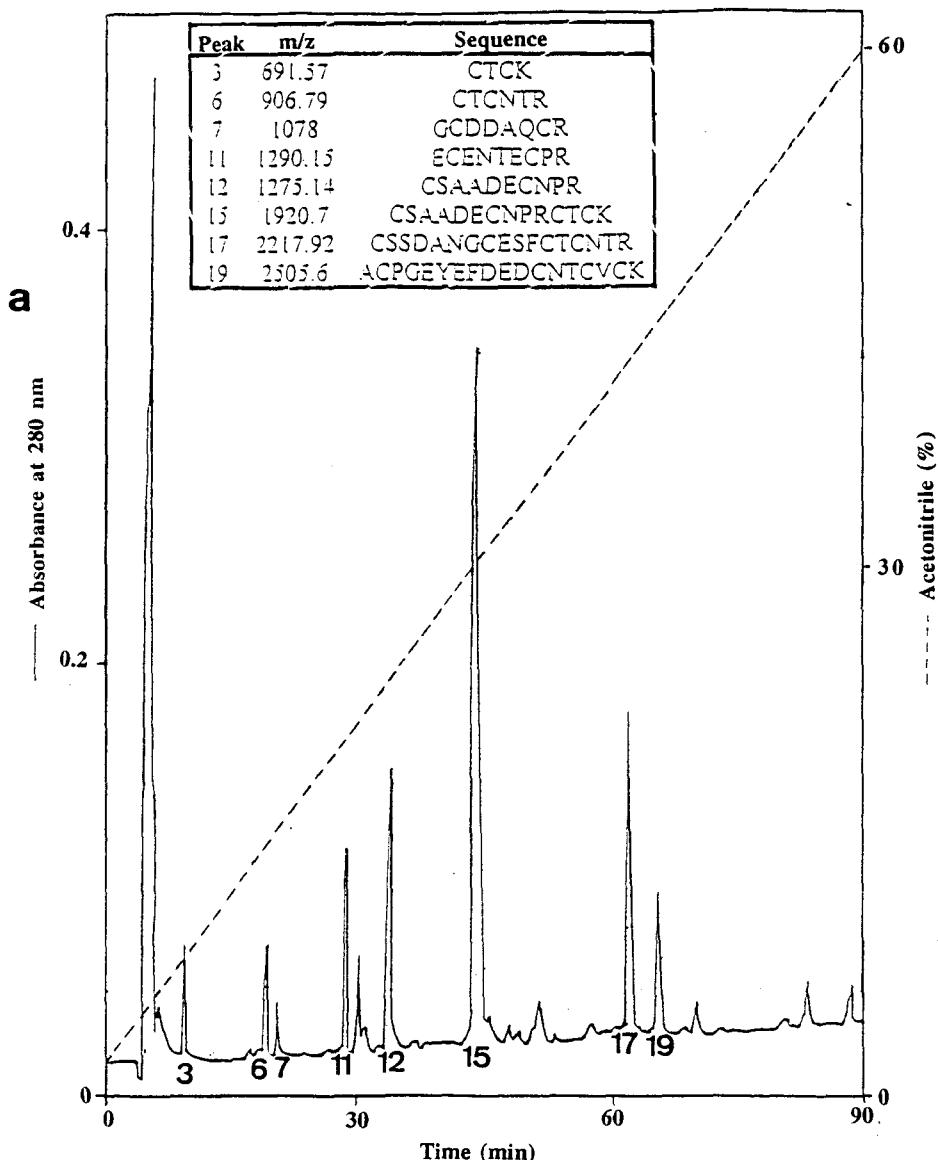
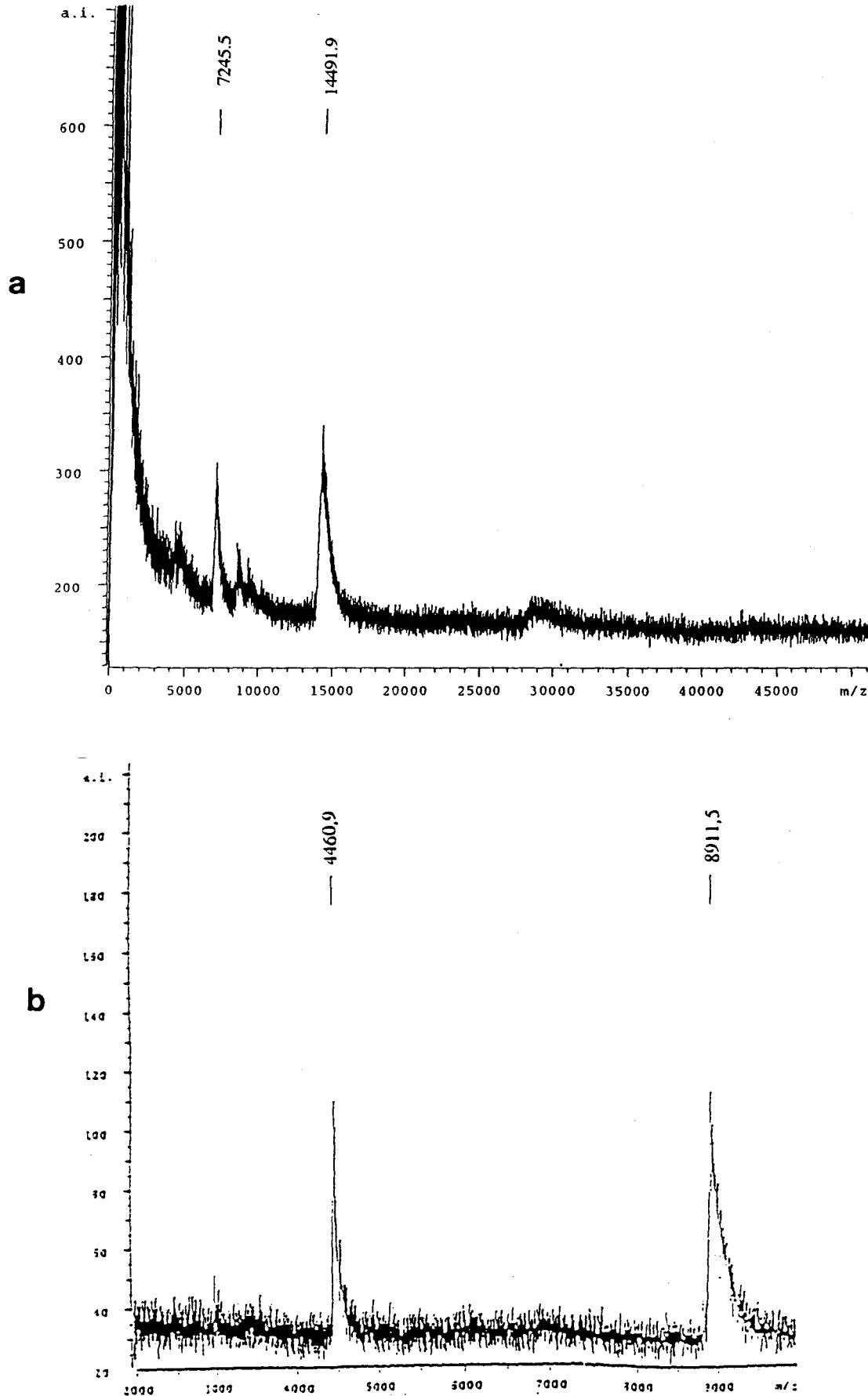


Figure 4 : Elution profile of the  $\beta$ -pyridylethylated theromin treated with trypsin, and both microsequencing and MALDI-MS of each emerging peaks (a); (b) Amino acid sequence of theromin.



**Figure 5 : (a) MALDI-MS determination of theromine.** Peak at  $m/z$  7245.5 is a multiplied charged ions with two charges corresponding to a mass of 14491.9 Da for theromine.

**(b) MALDI-MS determination of s- $\beta$ -pyridylethylated theromine.** Peak at  $m/z$  4460 is a multiplied charged ions with two charges corresponding to a mass 8911 Da for s- $\beta$ -pyridylethylated theromine.

**Table 1** Purification of theromin. 4g leech extract was used as the starting material. One Inhibition Unit (IU) was defined as the amount ( $\mu\text{g}$ ) of protease inhibited at 100% (see Materials and Methods section).

	Total protein (mg)	Total activity (IU)	Specific Activity (IU/mg)	Recovery (%)	Purification Fold
step					
Leech extract	400	1200	3	100	1
Superdex G75	40	1000	25	83	8
Mono Q-FPLC	1.7	425	250	35	83
RP-HPLC2	0.006	105	17582	9	5860

**Table 2.** Comparison of putative active site sequences of theromin with those of antistasin-type protease inhibitors.

	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
Theromin	D	A	N	C	E	S	F	C
Ghilanthen	E	V	R	C	R	V	Y	C
Antistasin I	G	V	R	C	R	I	H	C
Antistasin II	D	I	N	C	R	K	T	C
Hirustasin	E	V	H	C	R	I	R	C
Guamerin	A	I	R	C	M	I	F	C
Guamerin II	Q	I	R	C	M	I	F	C

**Amino-acid-sequence determination and molecular cloning of Therostasin  
: A Novel factor Xa inhibitor from the Leech *Theromyzon tessulatum*.**

**Vincent Chopin<sup>1</sup>, Michel Salzet<sup>1,2\*</sup>, Jean-luc Baert<sup>3</sup>, Beatrice Salzet<sup>1</sup>, Pierre  
Sautière<sup>3</sup>, Jean-Pierre Kerckaert<sup>4</sup> and Jean Malecha<sup>1</sup>**

1 : Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, Groupe de Neuroimmunité des Hirudinées, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

2 : Multidisciplinary Center for the study of Aging, Neuroscience Research Institute, State University of New York, College at Old Westbury, Old Westbury, NY 11568-0210, USA

3. Institut Pasteur de Lille, rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille, France.

4. Laboratoire d'Oncohématologie, Unité 124 INSERM, place de Verdun, Lille

***Acknowledgments***

We would like to thank Dr. A. Van Dorsselaer, (Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique, UA 31 CNRS, Strasbourg, France), for the mass spectrometry determination. The authors are very grateful to Annie Desmons and Marie-Paule Hildebrandt for their technical help. This work was in part supported by the following grants: Conseil régional Nord-Pas de Calais Crédit FEDER, NIMH COR 17138, NIDA 09010 and the Research Foundation and Central Administration of the State University of New York (GBS) and NIH Fogarty INT 00045 (MS and GBS).

---

\* To whom correspondence should be addressed : Pr. M. Salzet, Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, Groupe de Neuroimmunité des Hirudinées, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France. Tel : 33-3-2043-6839, Fax : 33-3-2004-1130, E-mail : Salzet@pop.univ-lille1.fr

a : have realized this work at the same level.

## SUMMARY

Therostasin is a potent naturally occurring tight-binding inhibitor of mammalian factor Xa ( $K_i$  : 34 pmol) isolated from the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. Therostasin is a cysteine-rich protein (8991 Da) consisting of 82 amino-acid residues with 16 cysteine residues having 8 disulfide bridges. Its amino acid sequence has been determined by a combination of techniques, including Edman degradation, enzymatic cleavages, laser-desorption mass spectrometry and s- $\beta$  pyridylethylation. Sequence analysis reveals that it shares no homology with known serine-protease inhibitors except with a factor inhibitor (25%) Xa from *Hydra magnipapillata*. Moreover, it exhibits a consensus sequence with vertebrate endothelins *i.e.* sarafotoxins and bibotoxins, potent vasoconstrictors isolated from the *Atractaspis* snake venom. Therostasin cDNA (883 pb) codes for a polypeptide of 82 amino acid residues preceded by 19 residues representing a signal peptide sequence.

Animals depending on a diet of fresh blood have evolved mechanisms that interfere with the coagulation process of the blood donor. In this regard, a variety of coagulation inhibitors have been isolated from blood-sucking animals, *i.e.*, bat (1), tick (2, 3), leeches (4, 5) and hookworm (6). Their salivas contain anticoagulant compounds that maintain the blood in a fluid state during intake and in their digestive structures (4).

In leeches, among the different anticoagulant molecules involved in the inhibition of the coagulation cascade, three substances have been investigated in great detail *e.g.* hirudin (thrombin inhibitor), antistasin (factor Xa inhibitor) and decorsin (antagonist of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa (7-9). Although these molecules are different in amino acid sequences and inhibitory activity, their three-dimensional structures share a similar conformational motif with that of the Leech Antihemostatic Protein (L.A.P) (10). Interestingly, their mechanisms of action and epitopes important for binding to their respective targets are distinct as well (10). This may demonstrate the significance of diverse mechanisms for inhibiting the coagulation process of the host as well as the evolution of slightly different inhibitory processes.

We focused our attention on the rhynchobellid leech *Theromyzon tessulatum*, since it is considered to be a primitive leech (4) and has already been shown to contain novel immune altering substances (11-13). It is our expectation that this animal may provide answers as to the evolutionary origin of factor Xa inhibitors given their biomedical significance (11-13).

*T. tessulatum* takes three blood meals during its life. After the third blood meal apoptosis of the salivary gland occurs (4). In order to obtain the maximum amount of factor Xa leech inhibitor present in *T. tessulatum* a crude protein extract of anterior part of hungry leeches at stage 2 of their life cycle was prepared (13; Fig. 1 lane a). This material, after fractionation by gel filtration column (Superdex G75, 16/60, Pharmacia), exhibits the ability to inhibit factor Xa (14). It has a molecular size less than of 30 kDa in SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 1 lane b). Interestingly, trypsin inhibitory activity was also monitored and found to be present throughout the column.

Further purification (Table 1) by anion exchange chromatography (Figs. 1 lane c and 1A) and reversed-phase HPLC (RP-HPLC) (Figs. 1 lane d and 1B) revealed the inhibitory activity in one peak. Mass measurement, with laser-mass spectrometry (MALDI-TOF), of the purified fraction confirmed the existence of a single mass at m/z of 8991 kDa (Fig. 2a). Comparison of the mass of this material by MALDI-TOF and by s-pyridylethylation (8991 *vs.* 10698.7 Da, Fig. 2b) demonstrates the presence of 16 cysteine residues. The primary structure of the *T. tessulatum* factor Xa inhibitor was established by direct sequence analysis (Fig. 3). The peptide contains 82 amino acid with a molecular mass of 8990 Da which is in agreement with the molecular mass measured by MALDI-TOF (8991 Da). This inhibitor of factor Xa, designated therostasin, is a cysteine-rich peptide without post-translational modifications.

A comparison of the amino acid sequence of this new inhibitor with the hydra antistasin-like protein revealed a 25% sequence homology (14). Despite its size, which is close to that reported for hookworm factor Xa inhibitor (8.7 kDa), no sequence homology was found between the two molecules. By contrast, therostasin resembles the vertebrate endothelins (25-39 :CLCKGCNDAQCRIYC; i.e., sarafotoxins and bibotoxins), potent vasoconstrictors isolated from the *Atractaspis* snakes (18, 19). The consensus pattern is C-x-C-x(4)-D-x(2)-C-x(2)-[FY]-C. Although it is similar in size to Kunitz-type protease inhibitors, it is an acidic protein (pI 4.3) whereas the Kunitz inhibitors are generally basic (20). Therostasin is highly specific for factor Xa (Ki 34 pM) (21) while exhibiting lower a affinity for trypsin. This also is in contrast to Kunitz inhibitors which inhibit trypsin with a high affinity (20). The putative active site of therostasin, deduced after sequence alignment with factor Xa inhibitors, could be at position 34-35 as also is the case for antistasin (Table. II).

Based on the first 33 amino acids of the therostasin N-terminal sequence, two degenerated oligonucleotide primers were used in the polymerase chain reaction (PCR) with first strand cDNA (22). A PCR amplified oligonucleotide of 132 bp was obtained. Its sequence analysis showed an open reading frame (ORF) following oligonucleotide 1 that extends through the known therostasin sequence (data not shown). Two positive clones (T1 $\alpha$  and T1 $\beta$ ) out of approximately  $2 \times 10^6$  phage lysates from the *Theromyzon tessulatum*  $\lambda$ gt11 library were identified using the 132-bp oligo probe (22). After EcoRI digestion of the purified recombinant phage, T1 $\alpha$  or T1 $\beta$ , a single band (approximately 900 pb) with a similar size was identified (Fig.4). Southern-blot analysis with the 132 bp-oligo probe, confirmed that both clones, T1 $\alpha$  and T1 $\beta$ , correspond to therostasin cDNA. After subcloning in pBluescript II KS vector, the nucleotide sequence of T1 $\beta$  cDNA insert was performed and revealed that this clone contains an uninterrupted ORF of 303 nucleotides (nt) preceded by a 200 nt 5'-untranslated sequence followed by 379-nt 3'-untranslated region (Fig 5). The first hexanucleotide AATAAA consensus signal for polyadenylation was found at position 758 (Fig 5). Translation of the ORF gives a 101-amino acid residue sequence that matches the sequence of the mature protein (Fig. 5). The N-terminal Asp residue of mature therostasin is preceded by a 19-amino acid pre-peptide beginning with the Met residue. This 19-amino acid sequence contains a hydrophobic core of 17 amino acids flanked by two charged residues typical of signal peptides (Fig. 5).

Factor Xa inhibitors, in general, contain two molecules consisting of 119 amino acid residues with antimetastatic activity (8, 23). Furthermore, antistasin and ghilianthen, have been isolated in glossiphoniidae leeches i.e. *Haementeria officinalis* (8) and *Haementeria ghilianii* respectively (24) that contain similar type molecules. In Hydra, a

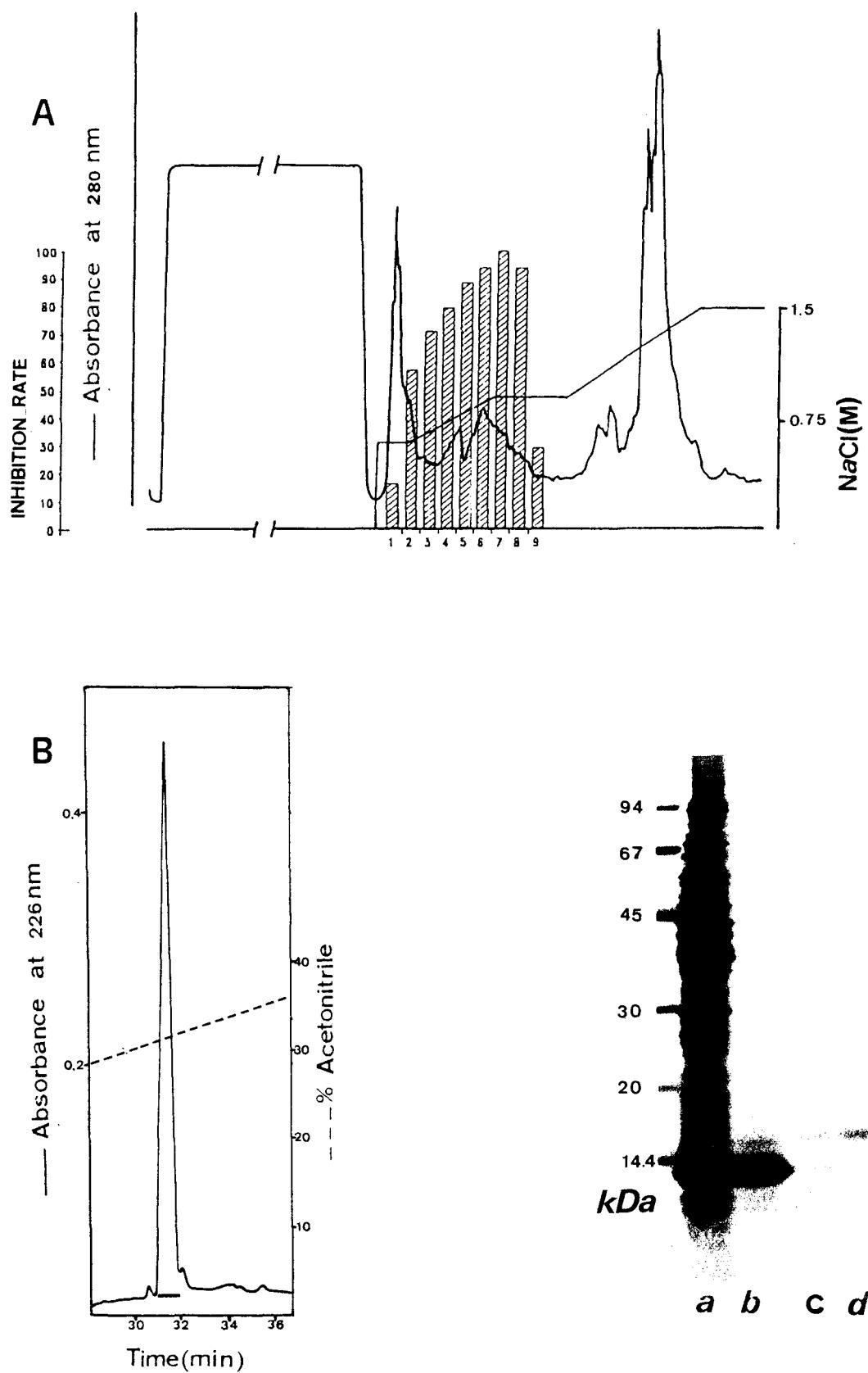
cDNA coding for an antistasin-like protein with a highly conserved 6 fold internal repeating sequence of 25-26 amino acids with a highly conserved pattern of 6 cysteine and 2 glycine residues identical to that in leech antistasin has been cloned, suggesting that antistasin has evolved by gene duplication (14). In the hookworm *Ancylostoma caninum*, a small molecule with a molecular mass of 8.7 kDa and a high intrinsic Ki (323.5 pM) also has been isolated (6). The N-terminal sequence of this molecule reveals no homology to any previously identified coagulation inhibitors, suggesting the existence of another novel anticoagulant gene family.

Structural as well as kinetic evidence presented in this study suggest distinct dissimilarities between therostatin and the other known inhibitors of factor Xa. Therostatin represents a novel coagulation inhibitor whose effectiveness *in vitro* makes it attractive to test in various *in vivo* models of occlusive vascular disease. Heterologous expression of r-therostatin will allow us to produce larger amounts of the material to perform further studies on the therostatin-factor Xa interaction. Taken as a whole, the study demonstrates that organisms evolving novel substances to block coagulatory processes may provide information that may be of biomedical significance for man.

#### REFERENCES AND NOTES.

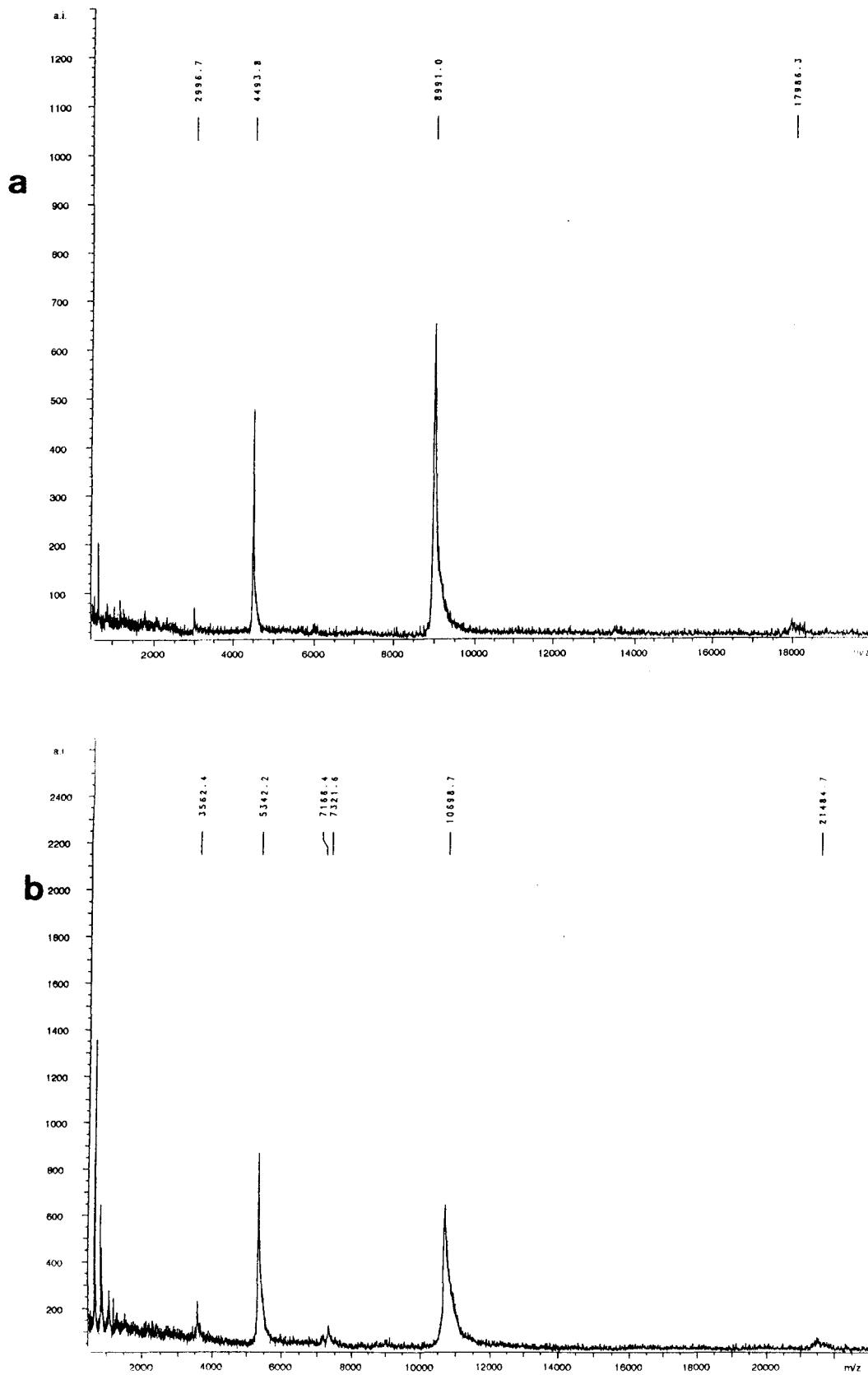
1. S.J. Gardell, L.T. Duong, R.E., Diehl, J.D., York, T.R. Hare, R.B. Register, R.A.F. Dixon and P.A. Friedman, *J. Biol. Chem.* **264**, 17947-17952 (1989).
3. J.W. Jacobs, E.W. Cupp, M. Sardana and P.A. Friedman, *Thromb. Haemostasis* **64**, 235-238 (1990).
2. L. Waxman, D.E. Smith, K.E. Arcuri and G.P. Vlasuk, *Science* **248**, 593-596 (1990).
4. R.T. Sawyer, *Leech Biology and Behavior* (Oxford Science Publications, Oxford, 1986), Vol. II.
5. R.T. Sawyer, *Biotechnology* **9**, 513-518 (1991).
6. M. Capello, G.P. Vlasuk, P.W. Bergum, S. Huang and P. Hotez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6152-6156 (1995).
7. Markwardt, F. Hirudin as an inhibitor of thrombin. Proteolitic enzymes (ed. Perlman G.E. and Lorand L.) *Meth. Enzymol.* **19**, 924-932, 1970.
8. G.P. Tuszyński, T.B. Gasic and G.J. Gasic, *J. Biol. Chem.* **262**, 9718-9723 (1987).
9. Seymour, J.L., Henzel, W.J., Neving, B., Stults, J.T., Lazarus, R.A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265(117)**, 10143-10147.
10. A.M. Krezel, G. Wagner, J. Seymour-Ulmer and R.A. Lazarus, *Science* **264**, 1944-1947 (1994).
11. Chopin, V., Matias, I., Stefano, G.B., Salzet, M. *Eur. J. Biochem.*, submitted for publication.

12. Chopin, V., Bilfinger, T.V., Stefano, G.B., Matias, I., Salzet, M. (1997) *Eur. J. Biochem.* **249**, 733-738.
13. Chopin, V., Stefano G.B., Salzet M., *Eur. J. Biochem.* Submitted for publication.
14. T.W. Holstein, C. Mala, E. Kurz, K. Bauer, M. Greber and C. N. David, *FEBS Lett.* **309**, 288-292 (1992).
15. J. Malecha, M. Verger-Bocquet and G. Tramu, *Can J. Zool* **67**, 636-640 (1989).
16. V. Laurent and M. Salzet, *Neurosci. Lett.* **198**, 1-5 (1995).
17. Enzyme assays were carried out at room temperature in 96-well microtiter plates. the color developed from the hydrolysis of peptide-nitroanilide (pNA) substrates was monitored at 405 nM on a Dynatec MR-250 microtiter. The concentration of factor Xa was given by the manufacturer (Sigma) and the one of purified inhibitor by the Bradford procedure using  $\gamma$  globulin as standard (M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254) and confirmed by amino acid analysis. Typically, the assay included 3  $\mu$ M proteolytic enzyme in tris/HCl 20 mM pH 8.4, 0,2 M NaCl and an aliquot of selected column fractions in a total volume of 100  $\mu$ l. After a 15 minutes incubation, substrate was added and the residual activity was determined. The substrates for trypsin and factor Xa (S-2786), thrombin (S-2238) and chymotrypsin (S-2765) were from Kabi. The elastase substrate, *N*- succinyl Ala-Ala-Ala p nitroanilide (SAAP) was from Sigma.
18. Y. Kloog and M. Sokolovsky, *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 212-214 (1989)
19. M. Sokolovsky, *Trends Biochem. Sci.* **16**, 261-264 (1991).
20. M. Laskowski, Jr. and I. Kato, *Annu. rev. Biochem.* **49**, 593 (1980).
21. J.G. Bieth, *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **16**, 183-195 (1980).
22. T. Maniatis, E.F. Frisch and J. Sambrook, in *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Lanoratory Press, Cold Spring Harbor, 1989).
23. J.G. Han, S.W. Law, P.M. Keller, P.J. Kniskern, M. Silberklang, J.-S. Tung, T.B. Gasic, G.J. Gasic, P.A. Friedman and R.W. Ellis, *Gene* **75**, 47-57 (1989).
24. D.T. Blankenship, R.G. Brankamp, G.D. Manley and A.D. Cardin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **166**, 1384-1389 (1990).



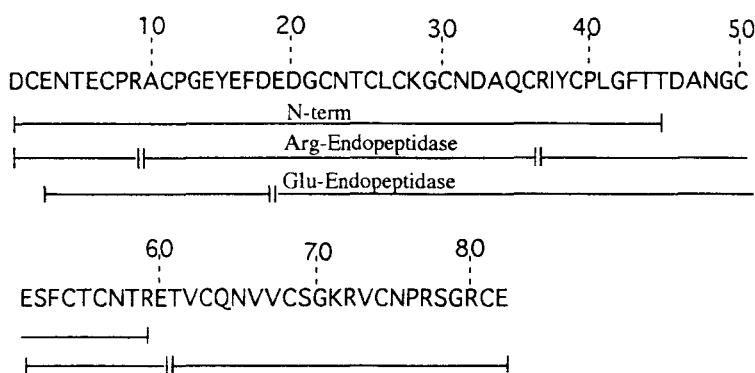
**Figure 1 : Elution profiles of therostatin following purification steps.**

(A) Elution profile on MonoQ column; (B) Final step of purification on C8 reversed-phase column. The solid bars indicate the fractions containing therostatin. Inset photographs represent the fractions containing the therostatin separated by SDS/PAGE under reducing conditions : (a) crude extract; (b) after Superdex G75 column separation ; (c) after MonoQ column separation; (d) after the final step of purification on C8 reversed-phase column

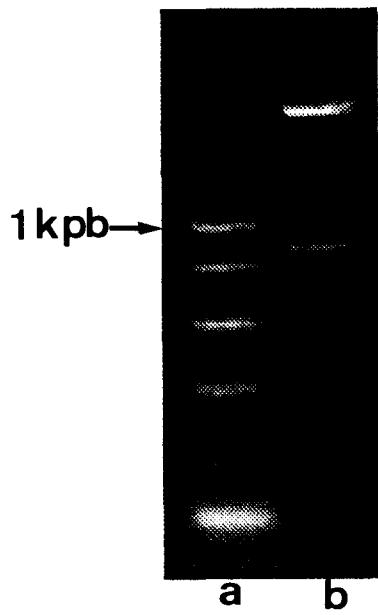


**Figure 2 :** (a) MALDI-TOF determination of therostasin. Peak at  $m/z$  = 4493.8 is a multiplied charged ions with two charges corresponding to a mass of 8991 Da for therostasin.

(b) MALDI-TOF determination of s- $\beta$ -pyridylethylated therostasin. Peak at  $m/z$  = 5342.2 is a multiplied charged ions with two charges corresponding to a mass of 10698.7 Da for therostasin.



**Figure 3 : Amino acid sequence of therostatin.** The sequence (82 amino acid residues) results from the analysis of the s- $\beta$ -pyridylethylated therostatin that provided good yields for 46-residues on a pulse liquid automatic sequenator (Applied Biosystems, model 473). Three arginyl-endopeptidase fragments and an overlapping with three peptides from a *S aureus* V8 protease digestion were isolated by fractionating digested peptides by RP-HPLC on a Lichrosphere C8 column which was used to obtain the complete sequence.



**Figure 4 :** Agarose gel electrophoresis of therostatin cDNA insert resulting from T1 $\beta$  digestion with *Eco* RI (b); (a) Lambda *Hind* III Markers as molecular weight standard.

G CTT GAT ATC GAA TTC CGG GGA TTG AAA CGC TGG TCA GAG AGC	43
AAA TTA GCG AGT TAA ACT CGA GCT AAC TGT GTG CAT ATA TAA GGC	43
GCC TGC TGT TCG AAA AAG CTC GAA ATA CAT TAA ATT TGT TAA TTA	133
TTT AAT TGA TTA CTG ATT TTA ATT AAT TTA TTA ATT AAT TAG TTT	178
AAG TAT TTT TTA AAA AAT ATC ATG AGA GGG TTA GCC GTT CTG TTG	223
<u>M R G L A V L</u>	8
TTG GTG GCA TGT TTC TGT TCC GTT GCA TTC GGA GAT TGC GAA AAC	268
<u>H V A C F C S V A F G D C E N</u>	23
ACG GAA TGT CCC AGA GCT TGT CCA GGG GAG TAC GAA TTT GAT GAA	313
C T E P R A C P G E Y E F D E	38
GAT GGT TGC AAT ACC TGT CTG TGC AAA GGT TGC AAC GAT GCA CAG	358
D G C N T C L C K G C N D A Q	53
TGC AGA ATT TAC TGC CCA TTA GGA TTC ACC ACA GAC GCT AAC GGC	403
C R I Y C P L G F T T D A N G	68
TGT GAA TCA TTC TGC ACT TGT AAC ACT AGA GAA ACT GTT TGC CAG	448
C E S F C T C N T R E T V C Q	83
AAT GTT GTT TGC AGT GGA AAT CGA GTT TGC AAC CCT CGC AGC GGG	493
N V V C S G K R V C N P R S G	98
AGA TGC GAA TAA AAG AAC ATT GGT GGA TGA GGA AGA AGA AGA TGA	538
R C E *	101
ATT ATT AAT TAA TTG ATT AAT TAA TTG ATT AAT TAA TTG ATT AAA	583
TAT TTT TTT AAA TCG TTA CAC AAT TCT ACT GAA ATT AAT TAA TTA	628
ATT AAA TAA TTA ATT GAT TGT TTT AAT TCA TTG TTC AAT TCT AAT	673
GAA ATT AAC TTC GAT AGC CCA TCT AAC GAT AAC AAA GAT GGC GAT	718
TAA GTT TAT TTA ATG CTT TTA ACA AAC AAA CAA ACA AAC <u>GAA TAA</u>	763
<u>ATA AAT TAA TAA ATA</u> ATT AAA CCG ATT ACG ATG ATG ATG ACG	808
ACT ATG <u>AAA TAA ATT ATA AAT AAA</u> ATT ATT TAA AAA CCG GAA TT	852

**Figure 5 : Nucleotide and deduced amino acid sequence of therostasin.**

Nucleotides and amino acid residues are numbered on the right column. Amino acids are numbered from the first methionine residue and identified with the single letter code. Peptide signal is underlined and an asterisk indicates the stop codon (TAA) of the open reading frame. Possible polyadenylation signals are underlined twice.

**Table I Purification of therostasin.** 6g leech extract was used as starting material. One Inhibition Unit (IU) was defined as the amount (1 µg) of protease inhibited at 100% (see Materials and Methods section). ND : Not Determined.

Total Protein		specific	Purification	
Recovery				
step	(mg)	activity (IU/mg)	Fold	(%)
Leech extract	300	0.08	1	100
Superdex G75	24	0.83	10	87
Mono Q	1.6	5.8	72	39
Reversed-phase	0.01	78	975	3

**Table II : Comparison of the putative active-site sequences of therostasin with those of factor Xa protease inhibitors isolated either in leeches (antistasin, ghilanten), Hydra (hydra antistasin) or in bacteria (Ecotin).**

	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
Therostasin	A	Q	C	R	I	Y	C	P
Ghilanten	V	R	C	R	V	Y	C	S
Antistasin	V	R	C	R	I	H	C	P
Ecotin	V	S	T	M	M	A	C	P
Hydra Antistasin	I	Q	C	R	M	F	C	K

## **Les inhibiteurs de sérines protéases agissant sur la matrice extracellulaire**

### **Articles présentés**

- (3) Amino-acid-sequence determination and biological activity of cytin, a naturally occurring specific chymotrypsin inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Eur. J. Biochem.* (1997) 209, 733-738.
- (4) Biochemical evidence of specific trypsin-chymotrypsin inhibitors in the rhynchobdellid leech, *Theromyzon tessulatum*. *J. Enzyme. Inhibition.* (1997). Sous presse.
- (5) Amino-acid-sequence determination and biological activity of therin, a naturally occurring specific trypsin inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum*. Soumis à *Eur. J. Biochem.*
- (6) Amino-acid-sequence determination and biological activity of tessulin, a naturally occurring trypsin-chymotrypsin inhibitor isolated from the leech *Theromyzon tessulatum*. Soumis à *Eur. J. Biochem.*

Pendant de nombreuses années, l'hirudine, inhibiteur spécifique de la thrombine, a été la principale source d'intérêts pour les biochimistes chez la sangsue *H.medicinalis*. Depuis, cette sangsue a fait l'objet de nombreuses études et différents inhibiteurs de sérine protéases telles que la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase ont été isolés. Il s'agit des bdellines (Fritz *et al.*, 1969), des églines (Seemüller *et al.*, 1969) et de l'hirustasine (Söllner *et al.*, 1994). Ces molécules semblent intervenir dans la préservation du sang ingéré par la sangsue lors de sa digestion qui peut durer plus de six mois.

Avant notre travail, aucun inhibiteur de sérine protéases n'avait été isolé chez la sangsue *T.tessulatum* car cette espèce est rare dans la nature. Après différentes étapes de chromatographies et par une combinaison de méthodes biochimiques incluant l'électrophorèse capillaire, la réduction et l'alkylation, des coupures enzymatiques et la dégradation automatique d'Edman, nous avons caractérisé de nouveaux inhibiteurs de sérine-protéases chez *T.tessulatum* :

- la cytine, inhibiteur de la chymotrypsine de 7,4 kDa formé par l'association de deux chaînes protéiques.

- la thérine, inhibiteur de la trypsine de 5,4 kDa composé de 48 acides aminés. Cet inhibiteur possède le motif L.A.P, motif structural caractéristique de certains inhibiteurs de protéases isolés chez les sangsues (Krezel *et al.*, 1994).

- ATCA et ATCB, inhibiteurs de la trypsine et de la chymotrypsine d'environ 14,5 kDa. Ces deux inhibiteurs semblent être liés, ATCB résulterait de la perte de quelques acides aminés d'ATCA.

De la même manière, nous avons isolé à partir de parties postérieures de cette sangsue un inhibiteur de la trypsine de 9 kDa possédant un plus faible affinité envers la chymotrypsine: la tessuline. Ce résultat indique que ces inhibiteurs de protéases ne sont pas tous produit au niveau des glandes salivaires.

Enfin, le criblage d'une banque d'ADNc réalisée à partir de parties antérieures de *T.tessulatum*, a conduit à l'isolement de différents clones susceptibles de contenir l'ADNc de la thérine et de la cytine.

Alors que chez la sangsue l'un des rôles de ces inhibiteurs est vraisemblablement la préservation du sang ingéré en inhibant les protéases leucocytaires, les premiers résultats *in vitro* montrent qu'ils sont aussi capables de moduler la réaction inflammatoire. En effet, ils diminuent le taux d'activation des granulocytes humains et des monocytes induit par les lypopolysaccharides.

## Amino-acid-sequence determination and biological activity of cytin, a naturally occurring specific chymotrypsin inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum*

Vincent CHOPIN<sup>1</sup>, Thomas V. BILFINGER<sup>2</sup>, George B. STEFANO<sup>2,3</sup>, Isabel MATIAS<sup>1</sup> and Michel SALZET<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, Groupe de Neuroimmunité des Hirudinées, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

<sup>2</sup> Cardiac Research Program, Department of Surgery, University Medical Center, SUNY at Stony Brook, Stony Brook, USA

<sup>3</sup> Multidisciplinary Center for the study of Aging, Old Westbury Neuroscience Research Institute, State University of New York, College at Old Westbury, Old Westbury, USA

(Received 14 April/30 June 1997) – EJB 97 0516/4

We purified a chymotrypsin inhibitor, designated cytin, from the rhynchobellid leech *Theromyzon tessulatum*. This 7.4-kDa peptide was purified to apparent homogeneity by gel-permeation and anion-exchange chromatographies, followed by reverse-phase HPLC. The structure of cytin was determined by reduction, S-β-pyridylethylation, automated Edman degradation, and electrospray mass spectrometry. Cytin is formed by the association of two protein chains, which are linked by a disulfide bridge. Chain A consists of 43 and chain B of 22 amino acid residues. Chain B exhibits 40–63% sequence similarity with the N-terminal sequences of subtilisin/chymotrypsin inhibitors isolated from barley seeds. Cytin inhibited chymotrypsin ( $K_i$ , 600 pM) and weakly inhibited trypsin ( $K_i$ , 350 nM). This chymotrypsin inhibitor, in contrast to others isolated from leeches, does not inhibit elastase or cathepsin G. Furthermore, cytin (10 μM) significantly diminishes the level of human granulocyte and monocyte activation induced by lipopolysaccharide (1 U/ml) in a manner similar to that of aprotinin. These data indicate that this chymotrypsin inhibitor may be biomedically significant.

**Keywords:** chymotrypsin inhibitor; immunomodulator; leech; sequencing.

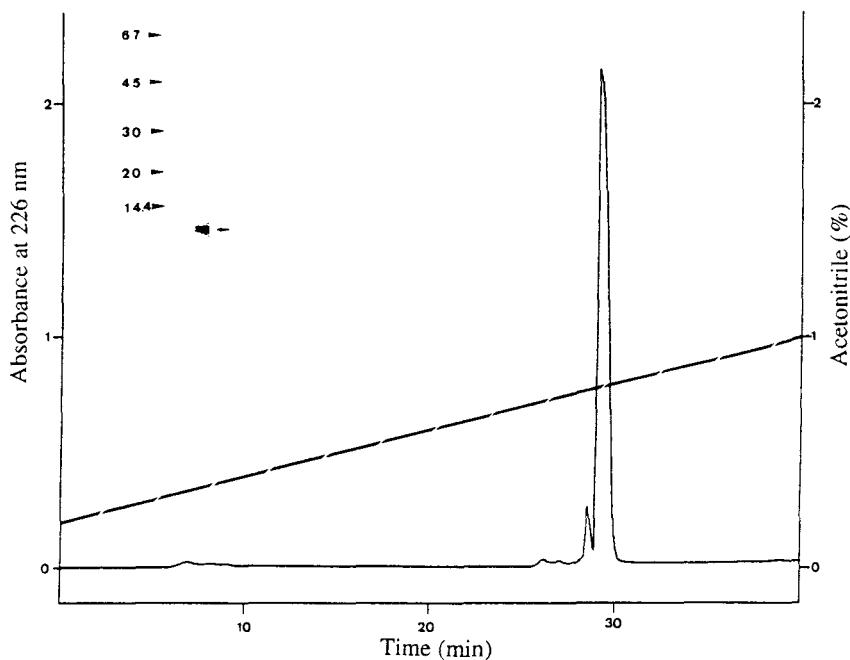
Evidence is accumulating that demonstrates the significance of proteases in numerous pathological processes. The destruction of the extracellular matrices of articular cartilage and bone in arthritic joints is thought to be mediated by excessive proteolytic activity [1]. In emphysema, gingivitis, tumor invasion and inflammatory infections, it is suggested that tissue destruction is caused by proteases [1]. Among the enzymes involved in extracellular-matrix degradation, a few serine proteases (elastase, collagenase, cathepsin G) are able to solubilize fibrous proteins such as elastin and collagen [2, 3]. Given the specific recognition by proteases of defined amino acid sequences, it may be possible to inhibit these enzymes when they are involved in pathological processes. Thus, the development of non-toxic protease inhibitors for *in vivo* application may be quite important [1].

In hematophagous leeches, studies of serine-protease inhibitors and their substrates have been performed extensively. Two

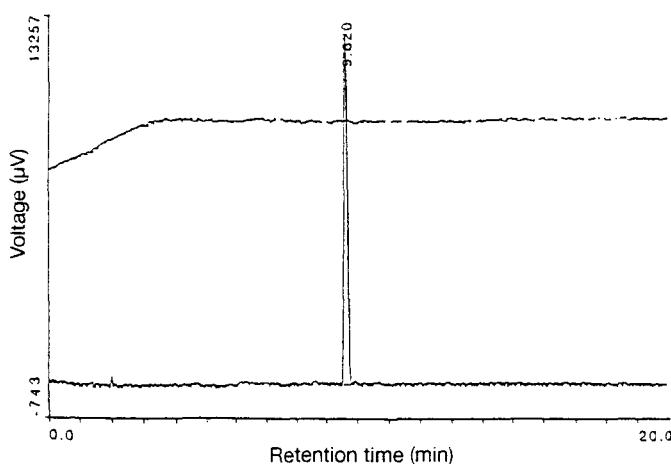
groups of serine-protease inhibitors can be distinguished. The first is related to specific inhibitors that interfere in the activation of the blood-clotting system: inhibitors of thrombin (i.e. hirudin [4] or haemendin [5]); and inhibitors of factor Xa (i.e. antistatin [6] or ghilanten [7]). The second group is related to inhibitors that work on the extracellular matrix, i.e. bdellin [8], eglin [9], gelin [10] and hirustasin [11]. They have been studied in jawed leeches, and they act mainly against elastase and chymotrypsin. In this study we report the isolation and characterization of a highly specific chymotrypsin inhibitor from head parts of the rhynchobellid leech *Theromyzon tessulatum*. We demonstrate that this molecule, designated cytin, modulates this activity in human immunocytes in a manner similar to aprotinin, a serine-protease inhibitor used to diminish the diffuse inflammatory response associated with major surgery [12].

### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** Starved *T. tessulatum* leeches were maintained under standard laboratory conditions as described elsewhere in detail [13]. Chromogenic substrates S-2765, S-2238, S-2586 were purchased from Kabi Diagnostica. Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Baker. Trifluoroacetic acid was from Pierce, porcine pancreatic elastase, chymotrypsin, trypsin, cathepsin G, thrombin and chromogenic substrates (benzoyl-arginine *p*-nitroanilide, *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala *p*-nitroanilide and *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide) were obtained from Sigma. Molecular-mass markers for SDS/PAGE were purchased from Pharmacia. All other reagents were of analytical grade.



**Fig. 1.** Final step of purification of cytin by reverse-phase HPLC. The inset shows purified cytin after SDS/PAGE. The gel was stained with silver.



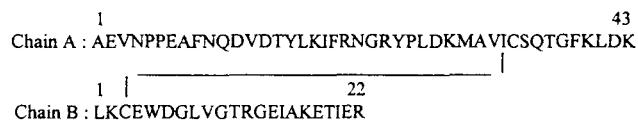
**Fig. 2. Capillary electrophoresis of isolated cytin.** Analyses were performed using a 72-cm capillary with 20 mM sodium citrate, pH 2.5.

$(1 - a) = K_{iPP}^{app} (1/a) + [P]$ , where [I] and [P] are the initial concentration of inhibitor and protease, respectively and  $a$  is the remaining fractional protease activity (100% control activity equals fractional activity of 1.0) [17].

**Immunocyte assay.** Human granulocytes and monocytes for cellular analyses were obtained from the Long Island Blood Services. Cells were separated by the standard Ficoll-Hypaque method as noted elsewhere [18-20]. They were washed three times in RPMI medium (Grand Island Biological Co.).

Lipopolsaccharide (LPS) was obtained from Sigma. In this assay, immunocytes were analyzed for their ability to change shape in response to LPS. Granulocytes and monocytes were diluted ( $406 \pm 13/100 \mu\text{l}$ ) and exposed to LPS, at a previously determined effective dose (1 U/ml), on coated (1% BSA) glass slides. Changes in cell shape were monitored over 60 min. In addition to LPS, the cells were incubated with either aprotinin, a serine-protease inhibitor, or cytin.

**Analysis of cellular activity.** The analysis of immunocyte activation was determined as reported elsewhere [20]. Cells,



**Fig. 3.** Sequence of cytin.

with or without the various agents, were analyzed using computer-assisted microscopic-image analysis (Image Analytics, Inc.). About 45–51 activated cells (ameboid and exhibiting form factors below 0.5) were observed for each 400- $\mu\text{m}$  viewing diameter, and four additional viewing diameters were observed per slide, constituting a single mean value. The entire process was repeated three times, and the resulting mean of the mean (immunocyte activation)  $\pm$  SEM was plotted against time. The variation for individual readings was 5–9%.

Human immunocytes were analyzed every 15 min after the initial exposure to the various agents. Changes in cellular conformation ranging from inactive rounded to active amoeboid were determined by measurements of cellular area and perimeter and were expressed mathematically using the shape-factor formula ( $4 \times p \times \text{area}/\text{perimeter}^2$ ). The proportion of activated cells was determined as described elsewhere [19]. Activated cells not only change their conformation in response to a pharmacological stimulus, but also become mobile, capable of phagocytosis and secrete various signaling factors [21, 22].

**Statistics.** Analysis was performed using the two-tailed Student's *t*-test to compare controls with LPS-stimulated cells and those stimulated with LPS in the presence of cytin and aprotinin. Each experimental sample was compared with its own control so as to reduce variability due to spontaneous activation.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Purification of cytin.** The results of the stepwise purification of cytin are summarized in Table 1. After extraction, filtered

**Table 2. Sequence comparison of cytin with chymotrypsin inhibitors isolated from barley seeds (CI) [25] or from potatoes (PI) [24]. Amino-acid residues underlined are in common with cytin.**

Inhibitor	Sequence	Residue Identity (%)
Cytin	LKCEWP <del>ELV</del> GTRGEAKETIER	
CI-2A	LKTEWP <del>ELV</del> GKSVEEAKKVIER	73
CI-IC	KTSWPEVVGMSAEKAETI <del>I</del> ER	52
CI-1A	KSTWPEVVGMSAEKAKE <del>E</del> I <del>I</del> ER	62
CI-1B	KRSWPEVVGMSAEKAKE <del>E</del> TIER	67
CI-2B	KTEWP <del>ELV</del> VEKSVEEAKKVIER	67
PI-IA	KERWPELLGTPAKFAMQII	47

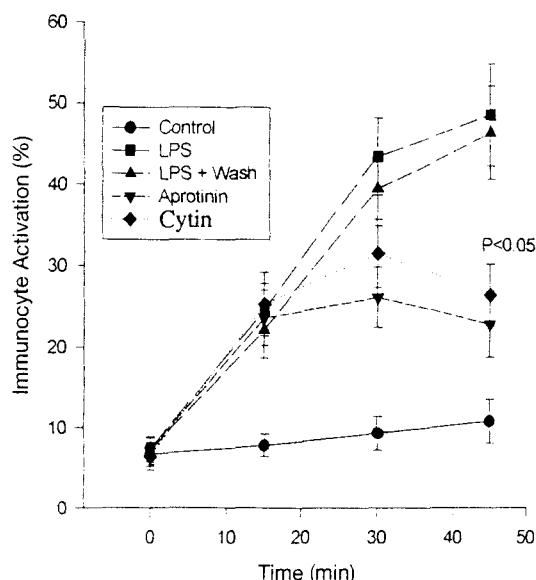
form of cytin. The  $m/z$  of  $7395.59 \pm 0.26$  Da is in good agreement with the calculated monoisotopic molecular mass of Cytin with two chains linked by a disulfide bridge at positions 3 and 34. The cytin sequence is given in Fig. 3.

**Structure comparison.** The B chain of cytin exhibits 16% sequence identity with eglin from *Hirudinae medicinalis* [9]. Moreover, no sequence similarity was found with gelin from *Hirudinae manillensis* [10] or with the other chymotrypsin inhibitors isolated from *Hirudinae* (i.e. bdellins [9]). Cytin, similarly to eglin, possesses sequence identity with the substilisin/chymotrypsin-inhibitor (I) family isolated from barley seeds [23]. Alignment of N-terminal sequences (first 22 residues) of the B chain of cytin with CI-2a revealed 73% residue identity (Table 2) and 52–67% residue identities with CI-1 (a, b and c) and CI-2b, respectively. At the level of the A chain, no sequence similarity was found with other chymotrypsin inhibitors. Thus, this structure, two chains linked by a disulfide bridge, has not been demonstrated previously among chymotrypsin inhibitors. Additionally, this structure appears to be essential for the inhibitory activity of cytin. After reduction and S-pyridylethylation, the two chains became separated and the peptide lost its activity (data not shown). Furthermore, this structure makes cytin different from the potato chymotrypsin inhibitors [24], of which eglin and CI-2 are members [25], and from other known serine-protease inhibitors (serpins). Moreover, the oxidation of cytin provoked a loss of activity of around 85%, reflecting that the methionine amino acid residue present in chain A is important for the activity of the molecule. This data reinforces the conclusion reached on the basis of sequence that the two chains are necessary for the activity of the cytin.

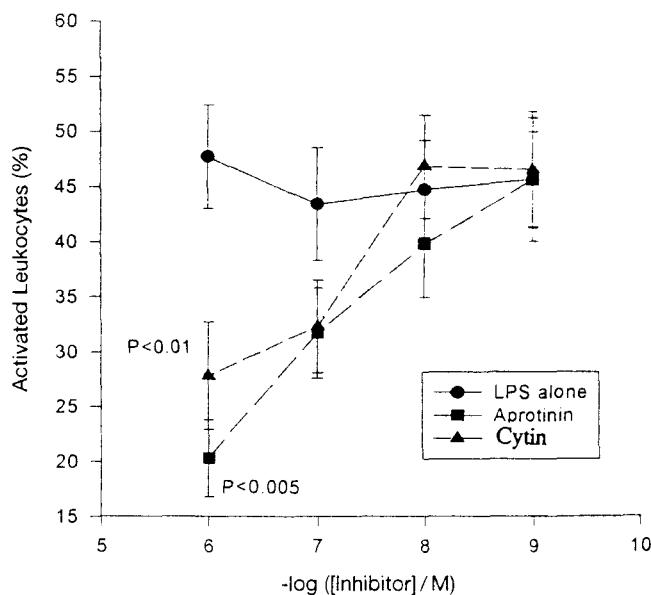
With regard to known chymotrypsin inhibitors isolated from jawed leeches (*H. medicinalis* and *H. manillensis*), i.e. gelin and eglin, no sequence similarity with cytin was found. This result is in contrast to thrombin inhibitors from these animals, where there is 70% structural similarity [10]. Therefore, we conclude that eglin and gelin did not originate from the same ancestral gene as cytin.

**Specificity of cytin.** The chymotrypsin specificity of cytin ( $K_i$ , 600 pM) was much greater than that of eglin ( $K_i$ , 3 nM) or gelin ( $K_i$ , 1 nM). In contrast to gelin and eglin, cytin exhibited no activity towards cathepsin G, elastase, thrombin or factor Xa, but it did exhibit some inhibitory activity towards trypsin, similar to that reported for gelin and eglin.

**Biological activity of cytin.** To determine whether cytin was biologically active in diverse cell systems we examined its ability to diminish LPS-induced excitation of human granulocytes



**Fig. 6. Demonstration of the dual nature of LPS activation of human immunocytes.** LPS (1 U/ml) stimulates a mixture of granulocytes and monocytes in a manner that can be diminished by aprotinin (1  $\mu$ M) and cytin (1  $\mu$ M). The activation is determined by computer-assisted microscopy, where the number of cells exhibiting form factors below 0.50 are compared with those exhibiting this factor at 0.70 and above. Details of the assay are found in the text.



**Fig. 7. Concentration-dependant inhibition of LPS-activated human granulocytes and monocytes by aprotinin and cytin.** Details are given in the text and the legend to Fig. 6.

and monocytes. These immunocytes were chosen for their ability to release numerous enzymes that may participate in a further enhancement of immunocyte activation [21, 22]. As previously observed, once human immunocytes are separated and placed on a slide, they exhibit a low level of spontaneous activation as noted by an increase in the number of cells becoming amoeboid ([22], Fig. 6). In the presence of a previously demonstrated effective dose of LPS (1 U/ml) the number of activated cells increased significantly ( $P < 0.005$ ; Fig. 5). This response to LPS continued after LPS was washed off (Fig. 7); this suggests that a cascading process may have been initiated.

**Amino acid sequence determination and biological activity of THERIN, a naturally occurring specific trypsin inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum***

**Vincent Chopin<sup>1</sup>, Isabel Matias<sup>1</sup>, George B. Stefano<sup>1,2</sup> and Michel Salzet<sup>1,2 \*</sup>.**

1 : *Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, groupe de Neuroimmunité des Hirudinées, SN3, Université des Sciences et Technologie de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.*

2 : *Multidisciplinary Center for the study of Aging, Old Westbury Neuroscience Research Institute, State University of New York, College at Old Westbury, Old Westbury, NY 11568, USA.*

\* To whom correspondence should be addressed : Professeur M. Salzet, Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, groupe de Neuroimmunité des Hirudinées, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France. Tel : (33)-3- 2043-6839, Fax : (33)-3-2004-1130. E-mail : salzet@pop.univ-lille1.fr or msalzet@worldnet.fr

---

Abbreviations: Therin, Theromyzon inhibitor; Theromin, Theromyzon thrombin inhibitor; ESMS, electrospray mass spectrometry ; LPS, lipopolysaccharide.

Enzymes : Chymotrypsin (EC 3.4.21.1); Trypsin (EC 3.4.21.4); Activated factor Xa (EC.3.4.21.6); Thrombin (EC 3.4.21.5) ; Porcine pancreatic elastase (EC. 3.4.21.11).

**Abstract :** We purified a new trypsin inhibitor, designated THERIN, from the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. Therin was purified to apparent homogeneity by gel-permeation and anion-exchange chromatographies followed by reversed-phase HPLC. By a combination of reduction and s- $\beta$ -pyridylethylation, Edman degradation and electrospray mass spectrometry measurement, the complete sequence of therin (48 amino acid residues, m/z : 5376.35 ± 0.22 Da) was determined. Therin exhibits a ca. 30% sequence homology with peptides of the antistasin-type inhibitors family *i.e.* the first and second domains of antistasin, hirustasin, ghilanthen and guamerins (I, II). Therin is a tight-binding inhibitor of trypsin ( $K_i$  : 0.6 pM) and has no action towards elastase or cathepsin G. Furthermore, therin ( $10^{-6}$  M) in conjunction with theromin, a *Theromyzon* thrombin inhibitor ( $10^{-6}$  M), significantly diminish the level of human leucocytes activation induced by LPS (1 U/ml) in a manner similar to that of aprotinin. These data indicate that this novel trypsin inhibitor is unique to leeches and may be biomedically significant.

## **1. INTRODUCTION**

Evidence is accumulating that demonstrates the significance of proteases in numerous pathological processes. The destruction of the extracellular matrix of articular cartilage and bone in arthritic joints is thought to be mediated by excessive proteolytic activity [1]. In emphysema, gingivitis, tumor invasion and inflammatory infections, it is suggested that tissue destruction is caused by proteases [1]. Among the enzymes involved in extracellular matrix degradation, a few serine proteases (elastase, collagenase, cathepsin G) are able to solubilize fibrous proteins such as elastin and collagen [2, 3]. Given the specific recognition by proteases of defined amino acid sequences, it may be possible to inhibit these enzymes when they are involved in pathological processes. Thus, the development of non-toxic protease inhibitors for *in vivo* application may be quite important [1].

In hematophagous leeches, studies of serine protease inhibitors and their substrates have been extensively performed. Two groups of serine protease inhibitors can be distinguished. The first is related to specific inhibitors that interfere in the activation of the blood clotting system: inhibitors of thrombin (i.e., hirudin [4] or haemendin [5]) or inhibitors of factor Xa (i.e. antistasin [6] or ghilanten [7]). The second group is related to inhibitors that work on the extracellular matrix, i.e., bdellin [8], eglin [9], gelin [10] and hirustasin [11]. They have been studied in jawed leeches and they act mainly against elastase and chymotrypsin. In this study, we report, for the first time, the isolation and characterization of a highly specific trypsin inhibitor from head parts of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. We also demonstrate that this molecule, designated therin, modulates, when pooled with the *Theromyzon* thrombin inhibitor, Theromin (Matias *et al.*, unpublished data), the activity in human immunocytes in a manner similar to aprotinin, a serine protease inhibitor used to diminish the diffuse inflammatory response associated with major surgery [12].

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2. 1. Materials**

Starved *T. tessulatum* leeches were maintained in the laboratory under standard laboratory conditions as described elsewhere in detail [13]. Chromogenic substrates S-2765, S-2238, S-2586 were purchased from Kabi Diagnostica. Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Baker. Trifluoroacetic acid (TFA) was from Pierce, porcine pancreatic elastase, chymotrypsin, trypsin, cathepsin G, thrombin and chromogenic substrates, (Benzoyl-arginine *p*-nitroanilide, *N*- succinyl Ala-Ala-Ala *p*-nitroanilide, *N*-succinyl Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide) were obtained from Sigma. Molecular mass markers for SDS/PAGE were purchased from Pharmacia. All other reagents were of analytical grade.

## **2. 2 Isolation of therin**

### **2.2.1. Chromatography on Superdex G75**

After anesthesia of the animals in 0.01% chlorethane, head parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. 500 head parts were placed in 25ml 20 mM Tris/HCl, pH 8.4, 200mM NaCl (Tris/NaCl) and homogenized at 4°C with a polytron (five 15s bursts on setting 9). After centrifugation (30 min at 12,000 rpm on sigma 2K15 rotor at 4°C), the pellet was extracted six-fold with Tris/NaCl. Supernatants were combined and filtered on nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size : Millipore). The extract was applied onto a FPLC column (Superdex G75, 16/60, Pharmacia, equilibrated with Tris/NaCl) at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by absorbance at 280 nm. All column fractions (1 ml) were assayed for protease inhibitor activity against trypsin.

### **2.2.2. Chromatography on Mono Q**

Pooled active fractions were concentrated 20-fold in a vacuum centrifuge (Savant) before loaded onto a Mono Q column (FPLC, HR 5/5, Pharmacia, equilibrated in 20mM Tris/HCl, pH 8.8). The column was washed with the same buffer and eluted with a linear gradient from 0 to 0.15 M NaCl in 18 min followed by a step at 1.5 M NaCl at a flow rate of 1ml/min.

### **2.2.3. Final purification**

Fractions containing the trypsin inhibitor were applied to a C<sub>8</sub> Lichrosphere Rp100 column (125 mm x 4.6 mm, Merck) with a linear gradient of acetonitrile in water acidified with 0.1 % trifluoroacetic acid from 0 to 60 % in 60 min at a flow rate of 1 ml/min. All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a photodiode array detector (Beckman 168).

## **2.3. Chromogenic assay**

During the purification procedure, inhibitory activity was assayed by measuring the inhibition of the release of p-nitroanilide from the synthetic substrate catalyzed by trypsin. Samples were incubated with a known amount of trypsin in Tris/NaCl for 15 min at room temperature. The assay was started by addition of the chromogenic substrate. The released nitroaniline was monitored photometrically at 405 nm for 3.5 min using a Dynatec MR-5000 at room temperature. A control reaction, in the absence of therin, was carried out under identical conditions. The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml 50% glacial acetic acid. 1 U protease inhibitory activity is as defined 1µg of protease inhibited, and specific activity as U/mg protease inhibited [14].

## **2.4. Protein assay**

Protein concentrations were determined with the Bradford procedure [15] using  $\gamma$  globulin as a standard.

## **2.5. Electrophoresis**

Electrophoresis analysis of reduced and denatured proteins was performed in 10-25% SDS/polyacrylamide gradient gels as described by Laemmli [16].

## **2.6. Structural analysis of the anti-trypsin peptide**

### **2.6.1. Capillary zone electrophoresis**

Prior to sequencing, the purity of the peptide was evaluated by capillary electrophoresis. Samples (2 nl) were injected under vacuum into a PACE capillary electrophoresis system (Beckman) equipped with a fused-silica capillary (72 cm length). Separation from anode to cathode was carried out in 20 mM sodium citrate, pH 2.5 at 20 kV and 30°C. Capillary effluent was monitored by its absorption at 200 nm.

### **2.6.2 Reduction and S- $\beta$ -pyridylethylation**

10  $\mu$ l of isolated protein (50 pmol) was dissolved in 40  $\mu$ l 0.5M Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, containing 6 M guanidine hydrochloride and 2  $\mu$ l 2 M dithiothreitol were added in the dark. The sample was flushed with nitrogen and incubated at 45°C for 1 h. Freshly distilled 4-vinylpyridine (2  $\mu$ l) was added and the mixture incubated for 10 min at 45°C in the dark. The pyridylethylated peptide was separated by reversed-phase HPLC prior to microsequencing.

### **2.6.3. Microsequence analysis**

Automated Edman degradation of both native and pyridylethylated peptides and detection of the phenylthiohydantoin derivatives were performed on a pulse-liquid automatic sequenator (Beckman, LF3200).

### **2.6.4. Electrospray mass spectrometry**

The purified peptide was dissolved in water/methanol (50/50, vol. by vol.) containing 1 % acetic acid and analyzed on a VG Biotech BioQ mass spectrometer. This instrument consists of an electrostatic ion-spray source operating at atmospheric pressure, followed by a quadrupole mass analyzer with a mass range of 1-4000. The extraction-cone voltage value was 55 V. Scanning was performed from  $m/z$  = 500-1500 for 10 s, with the resolution adjusted so that the  $m/z$  = 998 peak from horse myoglobin was 1.5-

1.7-Da wide at its base. The data system was operated as a multi-channel analyzer and several scans were summed to obtain the final spectrum. Each molecular species produced a series of multiply-charged protonated molecular ions from which the molecular mass was determined by simple calculation. Calibration was performed using the multiply-charged ions from a separate introduction of horse heart myoglobin (16951.4 Da). Molecular masses are given as average values based on the atomic weights of the elements (C = 12.011, H = 1.00794, N = 14.0067, O = 15.9994 and S = 32.06).

### ***2.7. Determination of equilibrium constants***

To determine the specificity of therin, its inhibitory activity towards different serine proteases was compared using established chromogenic assay methods. Equilibrium dissociation constants ( $K_i$ ) for the complexes of therin with individual proteases were determined essentially as described by the method of Henderson [17] and simplified by Bieth [16]. In brief, increasing amounts of therin were incubated with a constant amount of protease in Tris/NaCl for 30 min at 37°C and the remaining protease activity was measured by the addition of the chromogenic substrate. Remaining protease activity was monitored by absorbance at 405 nm. Graphical analysis yielded an apparent  $K_i$  using the equation :  $[I]/(1-a)=K_{iapp} (1/a)+ [P]$ , where [I] and [P] are the initial concentration of inhibitor and protease respectively, and a is the remaining fractional protease activity (100% control activity equals fractional activity of 1.0) [18].

### ***2. 8. Sequence identity and sequence alignment***

The sequence identity of therin with other serine protease inhibitors was determined using the BLITZ database search (<http://www.ebi.ac.uk/searches/blitz.html>). The amino acid sequences of the various antistasin-type protease inhibitors were aligned using MPSrch version 1.5 algorithm (Shane S. Sturrock & John F. Collins, 1993. Biocomputing Research Unit, University of Edinburgh, UK).

### ***2.9 Immunocyte Assay***

Human leucocytes for cellular analyses were obtained from the Long Island Blood Services (Melville, NY). Cells were separated by the standard Ficoll-Hypaque method as noted elsewhere in detail [19-21]; they were washed three times in RPMI medium (RPMI, 25 mM Hepes, Grand Island Biological Co., NY).

Lipopolysaccharide (LPS) was obtained from Sigma (St. Louis, Mo). In this assay, immunocytes were analyzed for their ability to change shape in response to LPS. Both granulocytes and monocytes were diluted ( $406 \pm 13 /100 \mu\text{l}$ ) and exposed to LPS, at a previously determined effective dose (1 U/ml), on precoated (1% BSA) glass slides;

changes in cell shape were monitored over a 60 min period. Besides LPS, the cells were coincubated with either aprotinin, a serine protease inhibitor, therin or theromin.

#### *2.9.1 Analysis of cellular activity*

The analysis of immunocyte activation was determined as reported elsewhere [21]. Briefly, cells, with or without the various agents, were analysed using computer-assisted microscopic image analysis (Image Analytics, Inc. Hauppauge, NY). About 45 to 51 activated cells (ameboid and exhibiting form factors below 0.5) were observed for each 400- $\mu$ m viewing diameter, and four additional viewing diameters were observed per slide constituting a single mean value. The entire process was repeated three times and the resulting mean of the mean (% immunocyte activation) ( $\pm$  SEM) was plotted against times. The variation for individual readings was between 5% and 9%.

Human immunocytes were analyzed every 15 min following the initial exposure to the various agents. Changes in cellular conformation ranging from inactive-rounded to active-amoeboid were determined by measurements of cellular area and perimeter and were expressed mathematically using the shape-factor formula ( $4 \times \pi \times \text{area} / \text{perimeter}^2$ ). The proportion of activated cells was determined as described elsewhere [20]. Activated cells not only change their conformation in response to a pharmacological stimulus, they also become mobile, capable of phagocytosis and secrete various signaling factors [22, 23].

#### *2.9.2 Statistics*

Analysis was performed using the two-tailed Student's-t-test to compare controls with LPS stimulated cells and those stimulated with LPS in the presence of therin, theromin and aprotinin. Each experimental sample was compared to its own control so as to reduce variability due to spontaneous activation.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### *3.1. Purification of therin*

The results of the stepwise purification of therin are summarized in Table I. After extraction, filtered supernatants were subjected to a gel-permeation chromatography on Superdex G75 column. A single zone at a retention time between 27-30 min corresponding to proteins having a molecular mass less than 14.4 kDa, was detected (Fig. 1a). The inhibitor was then purified by anion exchange chromatography on a Mono Q column using a stepwise gradient of NaCl from 0-1.5 M. The trypsin inhibitor was found in the void volume of the column (Fig. 1b). SDS-PAGE control revealed several protein bands at a molecular mass around 8 kDa. Finally, this peptide was purified to homogeneity by reversed-phase HPLC on a C8 Lichrosphere column using a linear gradient of acetonitrile in acidified water. A single peak presenting the activity was

obtained at a retention time of 33.6 min (33.6% of acetonitrile) (Fig. 1c). After the final reversed-phase HPLC, purity of the purified material was established by SDS-PAGE (Fig. 1c) and capillary zone electrophoresis (Fig. 2).

### 3.2. Biochemical characterization

Prior to its microsequencing, the purified peptide was reduced and s- $\beta$ -pyridylethylated, then subjected to automated Edman degradation. 48 amino acid residues were obtained on 20 pmol of isolated therin with a repetitive yield of 95% (Table II). Therin's sequence is the following RECNPPCAFQNQDCDTTLGKCFCNGY LCKMACHTGFKRDKNCEIIEPN. The molecular mass of the therin, measured by ESMS, is  $m/z$  5376.35  $\pm$  0.22 Da (Fig. 3) which is in agreement with the monoisotopic molecular mass of the therin calculated from the amino acid sequence with 8 cysteines residues engaged in four disulfide bridges (5380 Da). This has been sustained by ESMS results obtained on the s- $\beta$ -pyridylethylated molecule ( $m/z$  :6229  $\pm$  1.5 Da) (Data not shown). In regard to known trypsin-chymotrypsin inhibitors isolated from jawed leeches (*H. medicinalis* and *H. manillensis*), i.e., bdellins [9], gelin [10] and egin [11], no sequence homology with therin was found. Therin exhibits *ca.* 30% of sequence identity and spacing of the 8 cysteines residues with molecules of the antistasin-type inhibitors family *i.e.* antistasin [24], ghilanthen [7], hydra antistasin [25], hirustasin [11], guamerin and guamerin II [26, 27] (Table III). The sequence similarity is the much higher with the first domain of antistasin (33%) [24]. Furthermore, if therin is aligned with these potentially homologous inhibitors on the basis of their cysteines, the positions of the cysteines and the putative P1 active site match best with all these antistasin-type protease inhibitors. The P1 residue of the reactive site of the inhibitor generally determines its specificity [28]. In antistasin, only the N-terminal domain is inhibitory and the P1 residue has been determined as Arg34 [24]. This residue corresponds to Arg30 of hirustasin, Met35 in guamerin (I and II) [26, 27]. In the therin sequence, the P1 residue could be Lys28.

Additionaly, amino acid sequence comparison between antistasin, hirustasin, hirudin, decorsin [29] and ornatin [30], two glycoprotein IIb-IIIa antagonists found in the leeches *Macrobdella decora* and *Placobdella ornata* respectively, share the same structural motif. This motif involves the spacing of six ctyeine residues : Cys-X<sub>6-12</sub>-Cys-X-Cys-X<sub>3-6</sub>-Cys-X<sub>3-6</sub>-Cys<sub>8-14</sub>, where Xn is a string of any n residues except cysteine. With regard to therin's amino acid sequence, this trypsin inhibitor possesses this structural motif L.A.P (Leech Antihemostatic Protein), term proposed to refer to the general tertiary fold of this protein family [31]. Although, these protein are all from leeches and all affect the hemostatic process, but their sequence and activities differ. proteins that share the L.A.P motif likely arose as a result of divergent evolution.

### ***3.3. Specificity of therin (Table IV)***

Therin inhibits bovine trypsin with high affinity and specificity (Ki value of 0.6 pM). This value is much higher than those obtained with eglin, gelin, and guamerins potent trypsin-chymotrypsin inhibitors as well as with antistasin and hirustasin [10, 11, 23-27]. By contrast, therin like guamerin and eglin has no activity towards thrombin and factor Xa [10, 26, 27]. Interestingly, the sequence surrounding the reactive site may actually explain the specificity of therin, particularly in comparison with other antistasin-type protease inhibitors. Six of the eight amino acid residues within the stretch P5-P3' are different compared to those found in the inhibitory domain of antistasin or its variants (Table III). Furthermore, a preference for trypsin by therin could be explained by the lysine residue found at position P1 in the putative active site sequence. Indeed, antistasin and hydra antistasin inhibit factor Xa and they possess an Arg in P1. By contrast, guamerins which are more specific against neutrophil elastase and chymotrypsin than are the other antistasin-type protease inhibitors have a Met in P1. It appears that the major differences in specificity are caused by differences in the sequence surrounding the reactive site of therin, hirustasin, guamerins and antistasins.

### ***3.4. Biological Activity of therin***

In order to determine if therin was biologically active in diverse cell systems we examined it for its ability to diminish LPS-induced excitation of human leucocytes. These immunocytes were chosen for their ability to release numerous enzymes that may participate in a further enhancement of immunocyte activation [21, 22]. As previously observed, once human immunocytes are separated and placed on a slide, they exhibit a low level of spontaneous activation as noted by an increase in the number of cells becoming amoeboid (see [22], Fig 4). In the presence of a previously demonstrated effective dose of LPS (1 U /ml) the number of activated cells significantly increases ( $P<0.005$ ; Fig.4). Interestingly, this response to LPS continues after it is washed off (Fig 5), this suggests that a cascading process may have been initiated.

The results shown in Figures 4 and 5 demonstrate that pre-incubation of immunocytes with LPS followed by the serine protease inhibitor aprotinin, significantly ( $P< 0.005$ ) diminished the immunocyte excitation caused by LPS in a concentration-dependent manner. These results suggest that enzymes were present that may be processing released signaling molecules that would lead to the higher level of activation in the absence of aprotinin ( $P<0.01$ ; Figures 4,5). Furthermore, the level of activation that occurs in the presence of aprotinin is higher than that found in non-LPS exposed cells ( $10.8 \pm 3.4$ ; compared to  $10^{-6}$  M aprotinin  $21.1 \pm 3.7$ ,  $P <0.05$ ). This last result also supports the hypothesis that the higher level of cellular activation seen in the presence of aprotinin is due to a cascade of signaling molecules post-LPS stimulation.

In this regard, addition of a pool of therin and theromin (*Theromyzon* thrombin inhibitor, Matias *et al.*, unpublished data) also resulted in a concentration dependent inhibition of cell activation, similar to that induced by aprotinin in response to LPS stimulation was found (Figs.4, 5). By contrast, therin or theromin alone diminished in a significant manner, but at a low rate the cell activation. Taken together, these results demonstrate that after a primary stimulus is given the cells are capable of enhancing their own level of stimulation by generating signaling molecules that must be processed.

#### 4. CONCLUSION

Based on the therin homology to antistasin-type protease inhibitors family, its putative active site, and its specificity we surmise that therin belongs to this family. The present study clearly establishes that therin is a new, unique and potent trypsin inhibitor Ki (0.6 pM). In regard to therin's biological activity, we have demonstrated the following : LPS stimulates immunocytes in a process that exhibits a primary and secondary levels of stimulation; the LPS-stimulated secondary effect appears to require enzyme-processed secretory products released from the immunocytes; aprotinin significantly reduces the level of immunocytes activation, probably by inhibiting this "secondary" processing and therin also diminishes, but much more when pooled with theromin, the level of immunocytes excitation, demonstrating that it can also exert enzyme inhibitory actions. Taken as a whole, the study demonstrates that these relatively primitive organisms have devised highly specific mechanisms to communicate with their hosts. These mechanisms, at the same time, serve to indicate the significance of various host processes as well as to shed light on their vulnerable steps. Indeed, these vulnerable points of "alteration" may well be used in medicine to curtail these processes where deemed appropriate [1, 12, 32].

#### *Acknowledgments*

We would like to thank Dr. A. Van Dorsselaer, (Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique, UA 31 CNRS, Strasbourg, France), for the mass spectrometry determination and also to Dr. P. Bulet (UPR 9022 CNRS, Strasbourg) for his help in the beginning of the microsequencing of therin. The technical assistance of A. Desmons is kindly appreciated. This work was supported, in part, by the following grants: FEDER Nord-Pas de Calais, NIMH COR 17138, NIDA 09010 and the Research Foundation and Central Administration of the State University of New York (GBS) and NIH Fogarty INT 00045 (MS and GBS).

#### REFERENCES

- [1] Roston, D. (1996) Int. J. Cardiol. 53 suppl, S11-S37.

- [2] Sloane, B.F. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 2483-2487.
- [3] Quian, F. (1990) Biomed. Biochim. Acta **50**, 531-540.
- [4] Markwardt, F. (1970) Hirudin as an inhibitor of thrombin. Proteolitic enzymes (ed. Perlman G.E. and Lorand L.) Meth. Enzymol. **19**, 924-932.
- [5] Strube, K-H., Kröger, B., Biolojan, S., Otte, M. and Dodt, J. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 8590-8595
- [6] Gasic, G.J., Viner, E.D., Budzynski, A.Z. and Gasic, G.P. (1983) Cancer Res. **43**, 1633-1636.
- [7] Blankenship, D.T., Brankamp, R.G., Manley, G.D. and Cardin, A.D. (1990) Biochem. Biophys. Commun. **166**, 1384-1389.
- [8] Fritz, H. et Krejci, K. (1976) Meth. Enzymol. **45**, 797-805
- [9] Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Muller, H.-P. and Fritz, H. (1977) Hoppe-seyler Z. physiol. chem. **358**, 1105-1117.
- [10] Electricwala, A., Von Sicard, N.A.E., Sawyer, R.T. and Atkinson, T. (1993) J. Enzyme. Inhibition **6**, 293-302.
- [11] Söllner, C., Mentele, R., Eckerskorn, C., Fritz, H. and Sommerhoff, C. P. (1994) Eur. J. Biochem. **219**, 937-943.
- [12] Soeparwata, R., Hartmen, A.R., Stefano, G.B., and Bilfinger, T.V., (1996) Int. J. Cardiology, **53**(26):55-64.
- [13] Malecha, J., Verger-Bocquet, M., Leprêtre, A., and Tramu, G. (1989) *C. R. Acad. Sci. Paris* **309**, 127-130.
- [14] Goldstein, A.M., Murer, E.H., Weinbaum G. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* **84**, 117-124.
- [15] Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- [16] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- [17] Henderson, P. (1972) *Biochem J.* **127**, 321-333.
- [18] Bieth, J. G. (1980) *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **16**, 183-195.
- [19] Pratt, C.W., Pizzo, S.V. (1987) *Biochemistry* **226**, 2855-2863.
- [20] Shipp, M.A., Stefano, G.B., D'Adamio, L., Switzer, S.N., Howard, F.D., Sinisterra, J., Scharrer, B., and Reinherz, E., (1990) *Nature*. **347**, 394-396.
- [21] Stefano, G.B., Paemen, L.R. and Hughes, T.K. (1992) *J. Neuroimmunol.* **41**, 9-14.
- [22] Stefano, G.B., Melchiorri, P. Negri, L., Hughes, T.K., and Scharrer, B., (1992) *Proc. Natl. Sci. USA* **89**, 9316-9320.
- [23] Stefano, G.B., Bilfinger, T.V., and Fricchione, G.L., (1994) *Prog. Neurobiol.* **42**, 475-488.
- [24] Tuzynski, G.P., Gasic, T.B. and Gasic, G.J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9718-9723.

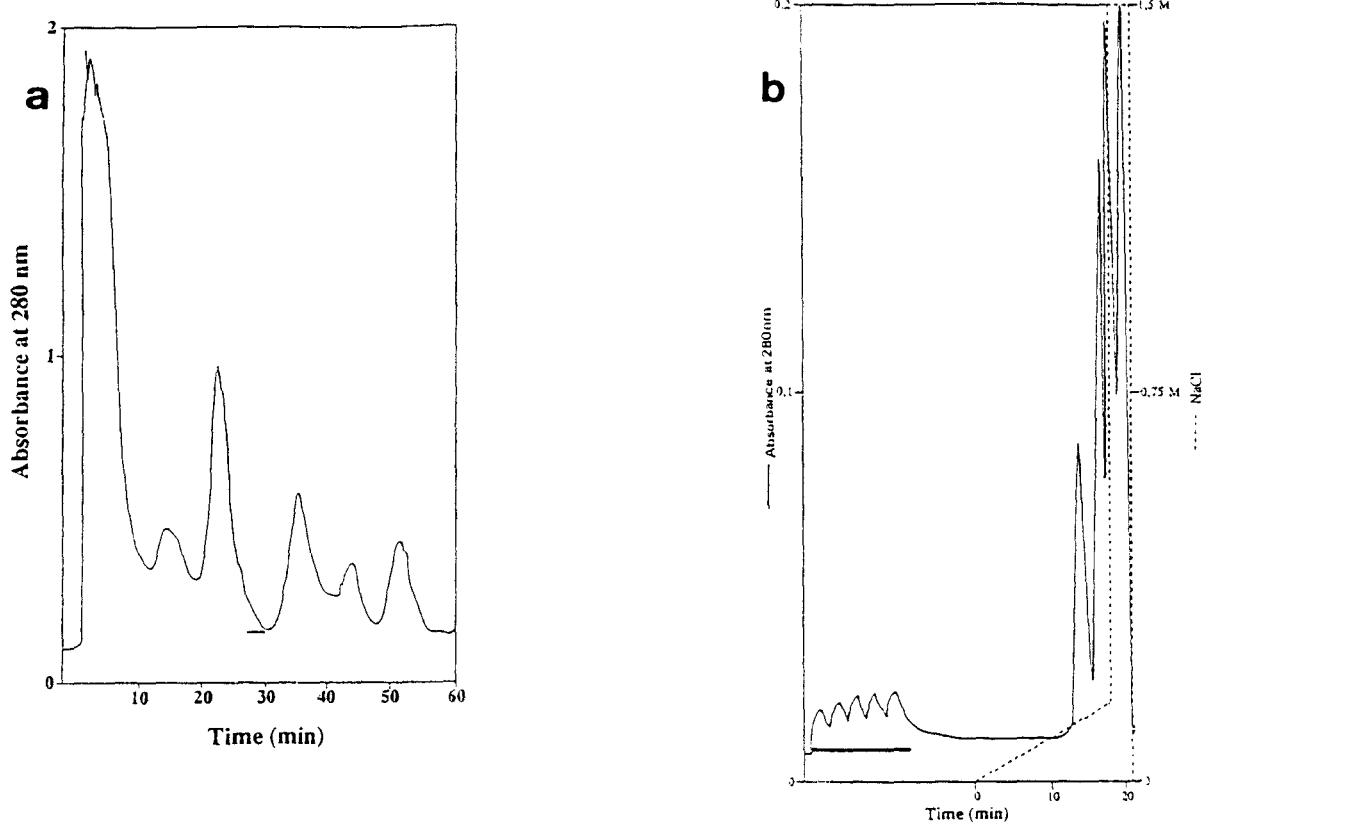
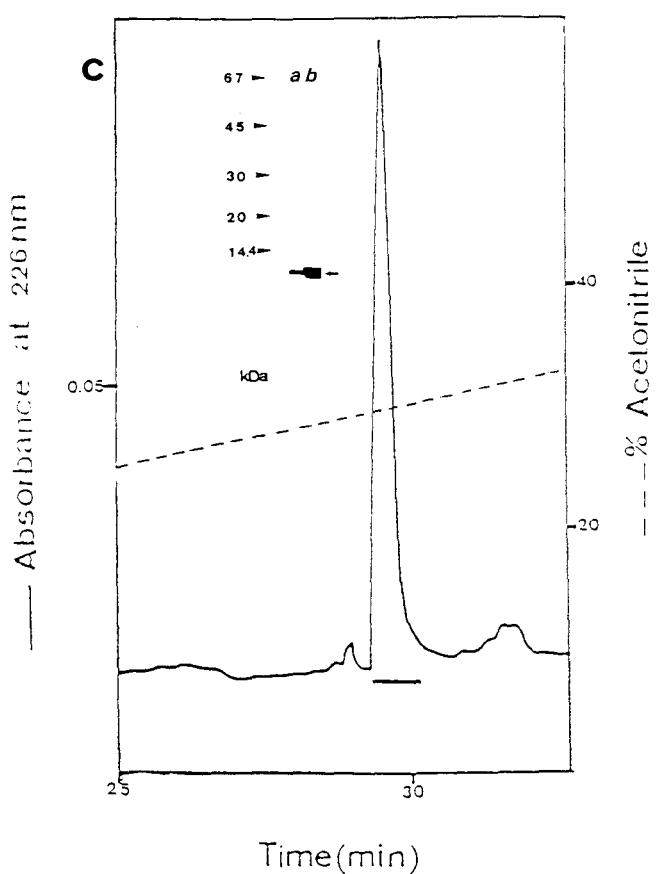
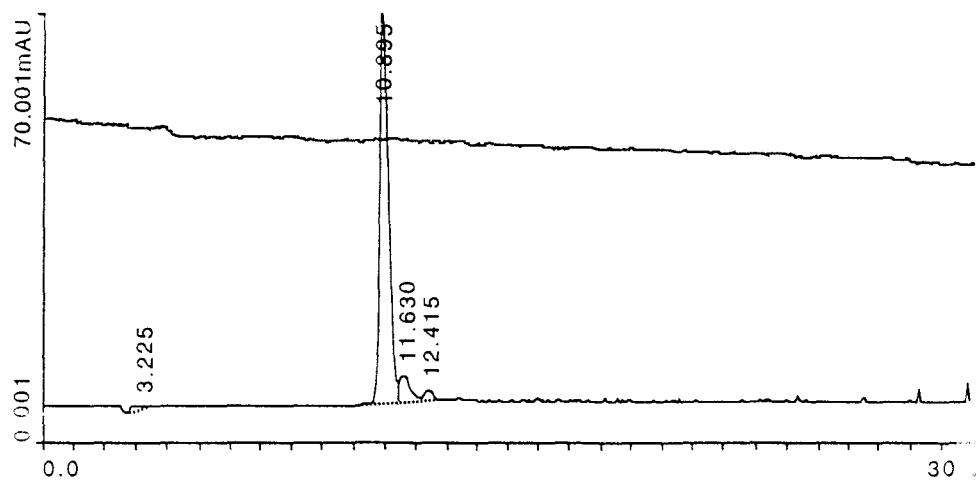


Figure 1 : Elution profiles of therin following purification steps.

- (a) Elution profile on Superdex G75 column of 3ml of extract.
- (b) Elution profile on MonoQ column of a pool of gel permeation active fractions.
- (c) Final step of purification on C8 reversed-phase column of the a ¼ of active fractions. Inset photograph represents the fractions containing the therin separated by SDS-PAGE in reducing conditions at the final step of purification (a), after MonoQ (b). Small arrow indicate position of the therin enzyme, arrowheads to the left of the silver staining gel indicate molecular mass standards

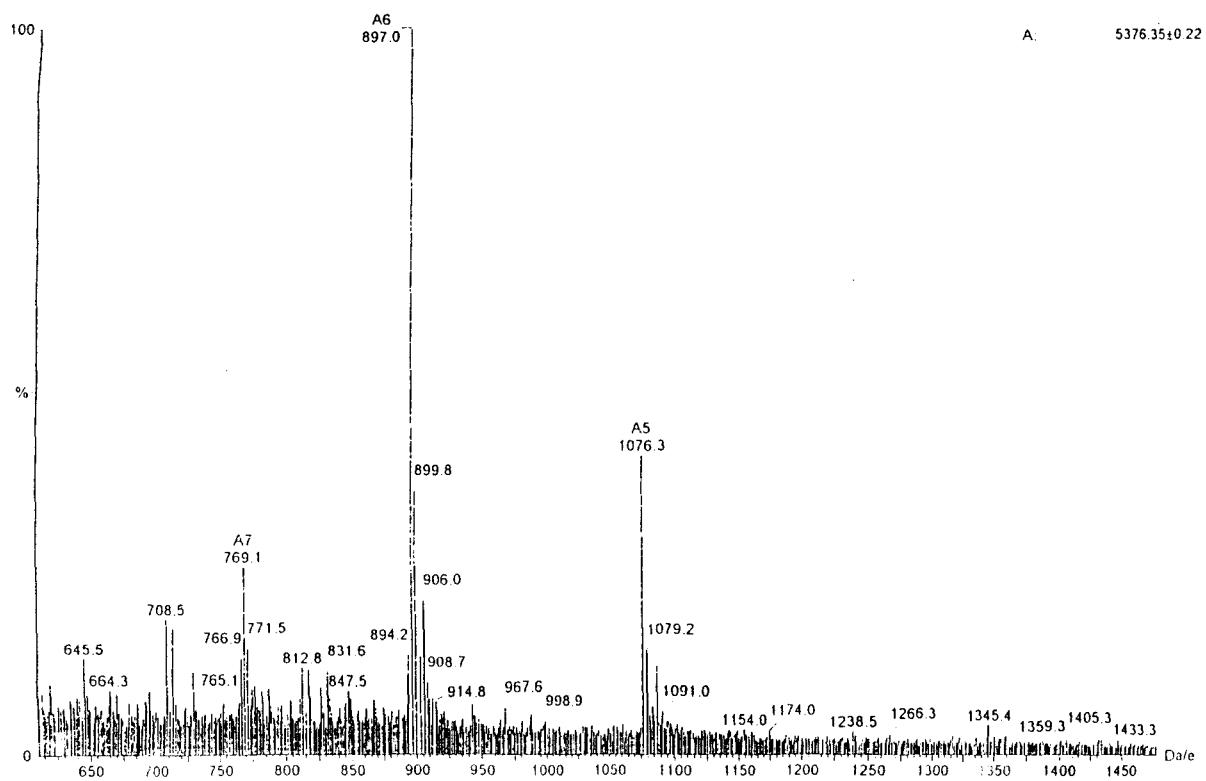
The solid bars indicate the fractions containing the therin.





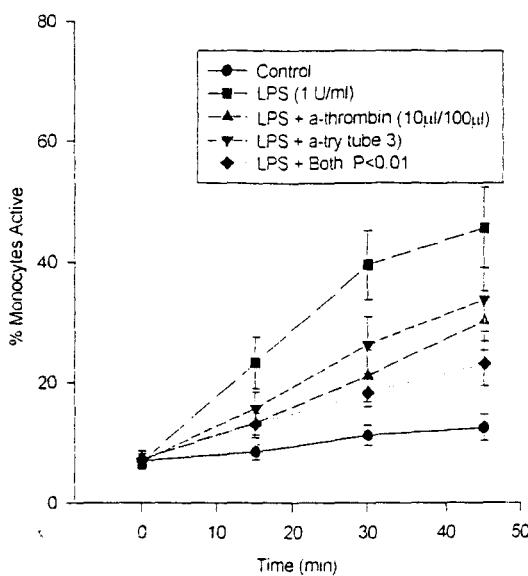
**Figure 2 : Capillary zonal electrophoresis of isolated therin.**

Analyses were performed using a 72 cm capillary with 20 mM sodium-citrate buffer at pH 2.5.



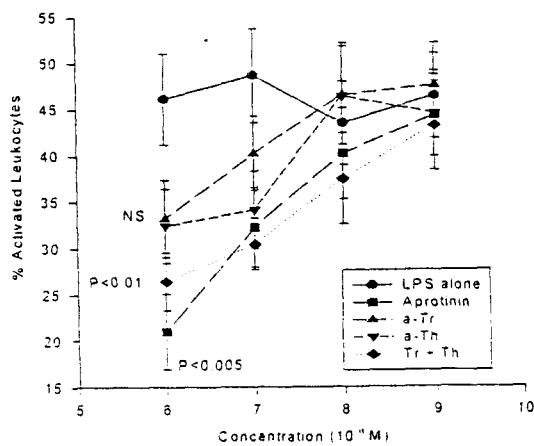
**Figure 3 : Electrospray mass spectrum of the therin**

Peaks at  $m/z = 769.1$ ,  $m/z = 897.0$  and  $m/z = 1076.3$  are multiplied charged ions with seven, six and five charges corresponding to a mass of  $5376.35 \pm 0.22$  Da of therin.



**Figure 4:** Demonstration of the dual nature of LPS activation of human monocytes.

LPS (1U/ml) stimulates monocytes in a manner that can be diminished by aprotinin ( $10^{-6}$  M), theromin ( $10^{-6}$  M) and therin ( $10^{-6}$  M). The percent activation is noted by computer-assisted microscopy where the number of cells exhibiting form factors below 0.50 are compared to those exhibiting this factor at 0.70 and above. Details of the assay are found in the text.



**Figure 5:** Concentration dependant inhibition of LPS-activated human monocytes by aprotinin, theromin and therin.

Details are in the text and the legend to figure 5. a-tr : therin; a-th : theromin, tr + th : therin + theromin.

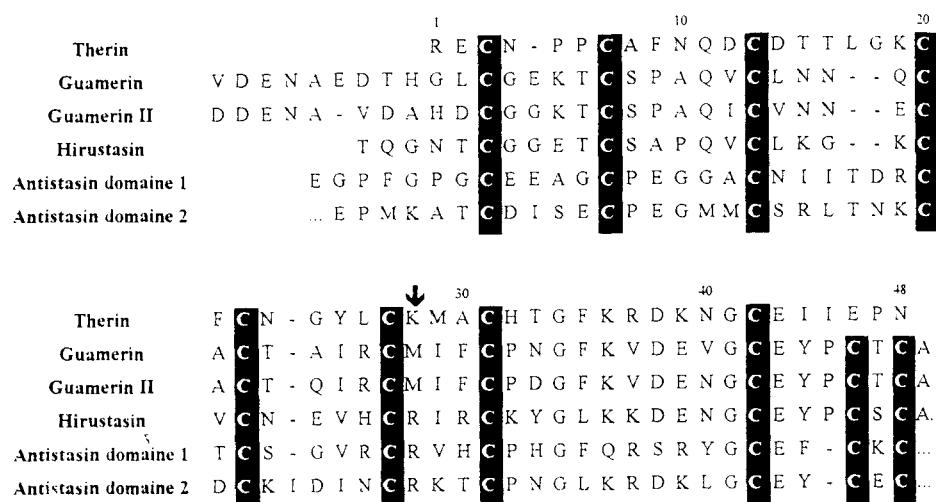
**Table I** Purification of therin. 4 g leech extract was used as the starting material. One Inhibition Unit (IU) was defined as the amount ( $\mu\text{g}$ ) of protease inhibited at 100% (see Materials and Methods section).

	Total protein step Leech extract	Total activity (IU) 11520	Specific Activity (IU/mg) 25.6	Recovery (%) 100	Purification Fold 1
Superdex G75	65	10660	164	92	6.5
Mono Q-FPLC	1.7	10217	6010	88	235
RP-HPLC	0.00025	4.7	18861	0.04	737

**Table II** : Automated Edman degradation of 20 pmol of s- $\beta$ -pyridylethylated therin, with a repetitive yield of 95%, isolated from the leech *T. tessulatum*.

Cycle N°	PTH-Xaa	Yield (pmol)	Cycle N°	PTH-Xaa	Yield (pmol)
1	Arg (R)	1.75	25	Tyr (Y)	3.8
2	Glu (E)	12	26	Leu (L)	3.2
3	Cys (C)	5.35	27	Cys (C)	1.75
4	Asn (N)	9.6	28	Lys (K)	2.6
5	Pro (P)	13	29	Met (M)	2.8
6	Pro (P)	12	30	Ala (A)	1.92
7	Cys (C)	4.35	31	Cys (C)	1.15
8	Ala (A)	6.25	32	His (H)	0.8
9	Phe (F)	15	33	Thr (T)	0.9
10	Asn (N)	5.85	34	Gly (G)	2.15
11	Gln (Q)	5.35	35	Phe (F)	2.25
12	Asp (D)	5.15	36	Lys (K)	1.5
13	Cys (C)	4.75	37	Arg (R)	0.8
14	Asp (D)	8.7	38	Asp (D)	1.15
15	Thr (T)	1.55	39	Lys (K)	2
16	Thr (T)	2.45	40	Asn (N)	1
17	Leu (L)	4	41	Gly (G)	1.6
18	Gly (G)	3.5	42	Cys (C)	0.8
19	Lys (K)	3.75	43	Glu (E)	0.5
20	Cys (C)	3.8	44	Ile (I)	1.6
21	Phe (F)	4.75	45	Ile (I)	0.9
22	Cys (C)	2.75	46	Glu (E)	0.7
23	Asn (N)	2.85	47	Pro (P)	0.6
24	Gly (G)	3	48	Asn (N)	0.5

**Table III:** Amino acid sequence comparison of therin with others antistasin-type protease inhibitors. Cysteine residues are boxed in black. The arrow marks the scissile peptide bond of the reactive site P1-P1' site of the inhibitors.



**Table IV :** Comparison of inhibitory constants (Ki).

Enzymes	Therin	Guamerin	Guamerin II	Hirustasin	Antistasin
Chymotrypsin	φ	φ	48.7 nM	6.4 nM	φ
Trypsin	0.6 pM	φ	φ	7.0 nM	5 nM
Cathepsin G	φ	N.D.	N.D.	2.9 nM	N.D.
Plasmin	φ	N.D.	N.D.	38 nM	N.D.
Urokinase	N.D.	N.D.	N.D.	13 nM	N.D.
Thrombin	φ	φ	φ	φ	N.D.
Factor Xa	φ	φ	φ	φ	1 nM

Guamerin data are from Jung *et al.* [27], antistasin data are from Tuszyński *et al.* [24], Hirustasin data are from Sollner *et al.* [11], Guamerin II data are from Kim *et al* [26].

φ : no inhibition , N.D. : not determined.

## BIOCHEMICAL EVIDENCE OF SPECIFIC TRYPSIN-CHYMO TRYPSIN INHIBITORS IN THE RHYNCHOBDELLID LEECH, *THE ROMYZON TESSULATUM*

VINCENT CHOPIN<sup>a</sup>, GEORGE STEFANO<sup>b,\*</sup> and MICHEL SALZET<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Centre de Biologie Cellulaire,  
Laboratoire de Phylogénie moléculaire des Annélides EA DRED 1027,  
Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudinées,  
Université des Sciences et Technologies de Lille,  
59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France  
<sup>b</sup>Multidisciplinary Center for the Study of Aging,  
Neuroscience Research Institute, State University of New York,  
College at Old Westbury, Old Westbury, NY 11568-0210, USA

(Received 30 August 1996; in final form 8 November 1996)

The presence of two specific trypsin-chymotrypsin inhibitors from head parts of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum* is reported. Two proteins, anti-trypsin-chymotrypsin A (ATCA; 14636.6 ± 131 Da) and anti-trypsin-chymotrypsin B (ATCB; 14368 ± 95 Da) were purified by size exclusion and anion-exchange chromatography followed by reversed-phase HPLC. Based on amino-acid composition, N-terminal sequence determination (MELCELGQSCSRDNPQPSNM), matrix assisted laser desorption-time of flight measurement (MALDI-TOF), trypsin mapping comparison, inhibition constant determination ( $K_i$ ), and influence on amidolytic activity of different serine proteases, it is demonstrated that ATCA and ATCB are novel and highly potent serine-protease inhibitors of trypsin and chymotrypsin (ATCA: 350 fM towards trypsin and chymotrypsin; ATCB: 400 and 75 fM towards trypsin and chymotrypsin, respectively). It is further surmised that ATCA and ATCB are linked, in that ATCB would lead to the formation of ATCA after loss of a few amino acid residues.

**Keywords:** Trypsin-chymotrypsin inhibitors; rhynchobdellid leech; anti-trypsin-chymotrypsin A and B.

### INTRODUCTION

\*Correspondence: Dr. M. Salzet, Fax: (33) 2091-9039, e-mail: salzet@pop.univ-lille1.fr.  
Dr. G.B. Stefano, Fax: 516-876-2727, e-mail: stefanog@surg.som.sunysb.edu

**Abbreviations:** ATC, anti-trypsin-chymotrypsin; FPLC, fast protein liquid chromatography; HPLC, high pressure liquid chromatography; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption-time of flight; TBS, Tris-buffered saline; PTH, phenylthiohydantoin.

Recent evidence indicates that proteases play a crucial role in numerous pathological processes. For example, destruction of extracellular matrix of articular cartilage and bone which occurs in arthritic joints is thought to be mediated by excessive proteolytic activity.<sup>1</sup> In other inflammatory conditions, it is suggested that tissue destruction is caused by proteolytic enzymes released from leukocytes.<sup>2</sup> This may occur in emphysema, gingivitis and tumor invasion.<sup>2,3</sup> In emphysema, a chronic lung disease characterized by the enlargement and destruction of the alveoli, the discovery of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency offered a completely new perspective for understanding this disease.<sup>3</sup> The deficiency of  $\alpha$ 1-antitrypsin disturbs the alveolar protease-anti protease balance, leading to elastase mediated tissue destruction and chronic pulmonary emphysema.<sup>1</sup> Given this data, it may be possible to alleviate these conditions by finding specific inhibitors of these enzymes while leaving other proteases unaffected.

In this regard, "nature" may have provided some answers to this intriguing question. In haematophagous leeches, two groups of serine protease inhibitors can be found. The first is related to specific inhibitors of proteases interfering with the activation of blood clotting system, i.e., inhibitors of thrombin (hirudin<sup>4</sup>, haemendin<sup>5</sup>) or inhibitors of factor Xa (antistasin<sup>6</sup> and ghilanten<sup>7</sup>). The second one is a class of inhibitors of proteases which are known to act on the extracellular matrix e.g. elastase, cathepsin G. These inhibitors are bdellin<sup>8</sup>, eglin<sup>9</sup>, gelin<sup>10</sup> and hirustasin.<sup>11</sup>

In the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*, serine protease inhibitors have not been isolated. We recently characterised a novel chymotrypsin inhibitor, closely related to the CI-2 from barley seeds<sup>13</sup> but different in structure to other chymotrypsin inhibitors isolated in jawed leeches (unpublished data). In the present study, we demonstrate for the first time the presence and characterization of two novel trypsin-chymotrypsin inhibitors from the head of the rhynchobdellid leech *T. tessulatum*. This result demonstrates that during evolution these enzymes are quite important and may represent the need in these animals and mammals to modulate serine proteases, enzymes known to have potential to cause damage.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Starved *T. tessulatum* were maintained and breed under constant laboratory conditions as described elsewhere in detail.<sup>14</sup> Chromogenic substrates S-2765, S-2238, S-2586 were purchased from Kabi Diagnostica (Saint Quentin en Yvelines, France). Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Baker. Trifluoroacetic acid

(TFA) was from Pierce (Strasbourg, France), porcine pancreatic elastase (EC 3.4.21.11), chymotrypsin (EC 3.4.21.1), trypsin (EC 3.4.21.4), cathepsin G (EC 3.4.21.20), thrombin (EC 3.4.21.5) and the chromogenic substrates, (benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide) were obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Mono Q-Sepharose, Superdex G75 and molecular weight calibration markers for SDS-PAGE were purchased from Pharmacia (Saint Quentin en Yvelines, France) and trypsin sequencing grade from Boehringer (Meylan, France). All other reagents were of analytical grade.

### Isolation of the Trypsin-Chymotrypsin Inhibitors

#### *Chromatography on Superdex G75 column*

After anaesthesia in 0.01% chloretone, head parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. 500 Head parts were homogenized and extracted with 5 ml of [TBS] : 20 mM Tris/HCl, pH 8.8 containing 200 mM NaCl at 4°C. After centrifugation at 12,000 rpm for 30 min at 4°C, the pellet was re-extracted twice. Supernatants were filtered on nitrocellulose membrane (0.45 µm pore size, Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). The extract was applied onto a FPLC (fast protein liquid chromatography) column (Superdex G75, 16/60) pre-equilibrated with TBS at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by its absorbance at 280 nm. All column fractions were assayed for protease inhibitor activity against trypsin.

#### *Chromatography on Mono Q*

Fractions containing trypsin inhibitors were pooled before being loaded onto a Mono Q (FPLC, HR 5/5, Pharmacia) column, equilibrated in TBS. The column was washed with the same buffer and eluted by a combination of linear and step gradients using TBS and TBS containing 0.15 M NaCl at a flow rate of 1 ml/min.

#### *Chromatography on reversed-phase HPLC*

Pooled fractions containing the trypsin inhibitors were separated on a C<sub>8</sub> Lichrosphere Rp100 column (125 × 4.6 mm), equilibrated in water. Elution was performed with a discontinuous linear gradient of acetonitrile in water from 0 to 50% in 15 min and from 50 to 80% in 10 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by absorbance at 226 nm and presence of trypsin inhibitor material was detected by chromogenic assay.

### *Final purification*

Fractions containing the trypsin inhibitors were concentrated 20-fold in a vacuum centrifuge (Savant, Saint Quentin en Yvelines, France) before being applied to a C<sub>8</sub> Lichrosphere Rp100 column (125 × 4.6 mm) and eluted with a linear gradient of acetonitrile in water acidified with 0.1% trifluoroacetic acid from 0 to 60% in 60 min at a flow rate of 1 ml/min. All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC (Gagny, France) system equipped with a photodiode array detector Beckman 168.

### **Chromogenic Assay**

During the purification procedure, inhibitory activity was assessed by measuring the inhibition of the release of *p*-nitroaniline from synthetic substrate, S-2765, catalyzed by trypsin. Samples were incubated with a known amount of trypsin in TBS for 15 min at 25°C. The reaction was started by addition of the chromogenic substrate. The released nitroaniline was monitored photometrically at 405 nm for 3.5 min using a Dynatec™ MR-5000 at room temperature. A control reaction, in the absence of trypsin inhibitor, was carried out under identical conditions. The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml 50% acetic acid. The unit of protease inhibitory activity (IU) is calculated as µg of protease inhibited at 100% and specific activity as units per mg protease inhibitor.<sup>12</sup>

### **Protein Assay**

Protein concentrations were determined by the Bradford procedure<sup>15</sup> using  $\gamma$ -globulin as a standard.

### **Electrophoresis**

Electrophoretic analysis of reduced and denatured proteins was performed in 10–25% SDS/polyacrylamide gradient gels as described by Laemmli.<sup>16</sup>

### **Structural Analysis of Anti-trypsin Inhibitors**

#### *Amino acid composition*

Quantitative amino acid analysis was carried out with a Beckman 6300. Samples of purified trypsin-chymotrypsin inhibitors were hydrolyzed at 110°C for 24 h in

50  $\mu$ l 6 M HCl in a tube sealed under vacuum. Cysteine was determined as cysteic acid and methionine as methionine sulphone.

#### *Reduction and S- $\beta$ -pyridylethylation*

The inhibitor (400 pmol) was dissolved in 40  $\mu$ l 0.5 M Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA containing 6 M guanidine hydrochloride to which 2  $\mu$ l 2 M dithiothreitol were added in the dark. The sample was flushed with nitrogen and incubated at 45°C for 1 h. Freshly distilled 4-vinylpyridine (2  $\mu$ l) was added and the mixture incubated for 10 min at 45°C in the dark. The pyridylethylated peptide was separated by reversed-phase HPLC prior to microsequencing.

#### *Microsequence analysis*

Automated Edman degradation of the reduced and alkylated peptide and detection of phenylthiohydantoin (PTH-Xaa) derivatives were performed on a pulse-liquid automatic sequenator (Applied Biosystems™, model 473A).

#### *Matrix assisted laser-desorption-time of flight (MALDI-TOF)*

MALDI-TOF-MS was performed on a Bruker laser desorption time of flight mass spectrometer (Bruker™, Bremen, Germany) operating in the positive mode. The analyses were performed as described previously.<sup>17</sup>

#### *Enzymatic digestions and separation of products of digestion*

Trypsin digestion: 5 nmol of pure inhibitors were treated with trypsin (Boehringer) at an inhibitor/trypsin ratio of 1 to 100 for 17 h at 37°C in 100  $\mu$ l of 100 mM Tris-HCl, pH 8.5. The digestion was stopped by adding 100  $\mu$ l of acidified water (0.1% TFA). The peptide mixture produced by enzymatic digestion was applied on an aquapore OD 300 C18 column (250  $\times$  4.6 mm, Browlee™ Associates) equilibrated with acidified water. Elution was performed with a linear gradient 0–80% of acetonitrile in acidified water over 80 min at a flow rate of 1 ml/min.

#### **Determination of Equilibrium Constants**

To determine the specificity of trypsin inhibitors, their action on different serine proteases were compared using established chromogenic assay methods (see above). Equilibrium dissociation constants ( $K_i$ ) for the complexes of each inhibitor

TABLE I Purification of anti-trypsin-chymotrypsin inhibitors (A and B).

Step	Inhibitor		Specific activity (IU/mg)		Total Protein (mg)		Purification Factor	
	( $\mu$ g)							
Leech extract	266		8.72		450		1	
Superdex G75	14		164		95		19	
Mono Q	ATCA	ATCB	ATCA	ATCB	ATCA	ATCB	ATCA	ATCB
	0.48	0.42	4833	ND	0.47	ND	554	ND
HPLC1	0.34	0.34	7363	5590	0.2	0.09	844	641
HPLC2	0.25	0.35	9580	6628	0.17	0.07	1098	760

1g leech extract was used as starting material. One Inhibition Unit (IU) is defined as the amount ( $\mu$ mol) of protease inhibited at 100% (see Materials and Methods section). ND: Not Determined.

with individual proteases were determined essentially as described by Bieth.<sup>18</sup> Briefly, increasing concentrations of the inhibitor were incubated with a constant concentration of the enzyme during 30 min at 37°C. Substrate was added and the residual enzyme activity was measured. Apparent  $K_i$  values were calculated by fitting the steady-state velocities to the equation for tight-binding inhibitors<sup>19</sup> using non-linear regression analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Purification of Trypsin Inhibitors

The purification of the trypsin inhibitors is summarised in Table I. After a TBS extraction, filtered supernatants were subjected to a gel permeation chromatography on Superdex G75 column. The inhibitory action on trypsin was assayed on eluted fractions. A single zone at a retention time of 18–22 min corresponding to proteins of molecular mass ranging between 20–14.4 kDa, was detected (data not shown). The inhibitory active fractions were pooled and subjected to anion exchange chromatography on a Mono Q column using a stepwise gradient of NaCl from 0–1.5 M. Two inhibitory active zones eluted between 0.46–0.75 M NaCl for Z1 and 0.75–1 M NaCl for Z2 were found (Figure 1). Finally, the inhibitors were purified to homogeneity on a C8 Lichrosphere column with a linear gradient of 1%/min of acetonitrile in acidified water. A single peak presenting the inhibitory activity was obtained at a retention time of 33 min and at 35 min for the trypsin inhibitors A (ATCA) and B (ATCB) contained in Z1 and in Z2, respectively (Figure 2). Purity control of the isolated inhibitors was performed by mass spectrometry measurement with MALDI-TOF-MS on native proteins (Figure 3). Molecular monoisotopic masses of  $14636.6 \pm 131$  Da for ATCA (Figure 3a) and  $14368 \pm 95$  Da for ATCB (Figure 3b) were obtained despite the low level of the isolated inhibitors.

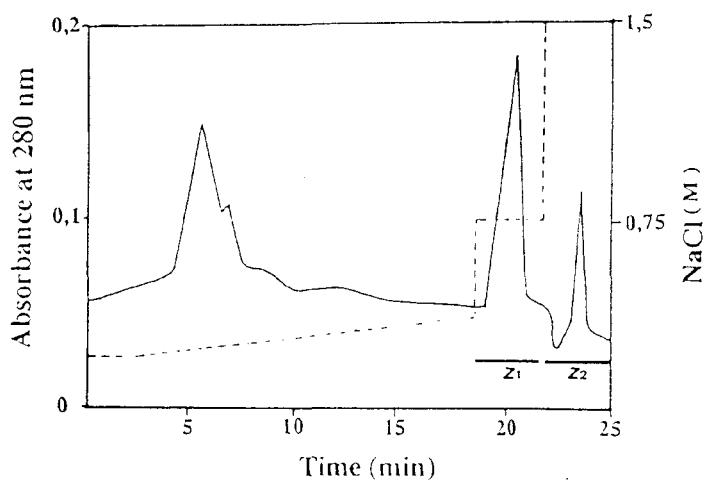


FIGURE 1 Anion exchange chromatography of *T. tessulatum* trypsin-chymotrypsin inhibitors. Solid bars indicate the active fractions, Z1 and Z2.

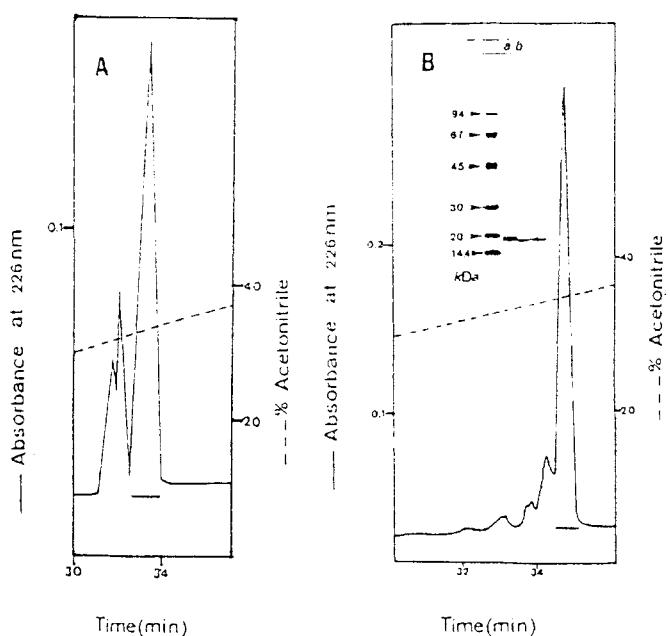


FIGURE 2 HPLC profiles of ATCA (A) and ATCB (B) at the final step of purification. Inset photographs correspond to ATCA (lane a) and ATCB (lane b) after SDS-PAGE. Gels are stained with silver. Arrows to the left correspond to molecular mass standards.

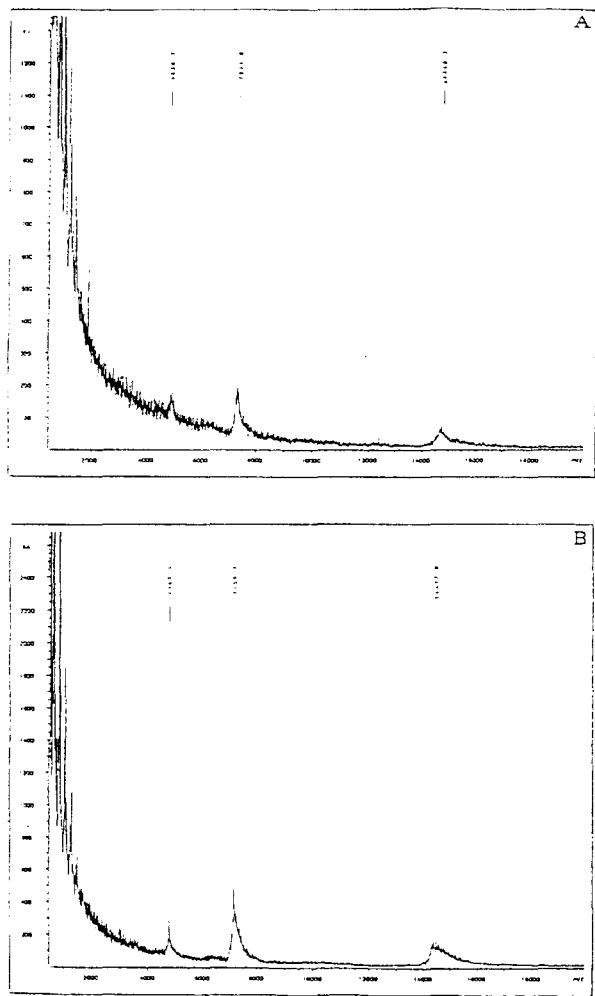


FIGURE 3 MALDI-TOF measurement of ATCA (A) and ATCB (B) at the final step of purification. Peaks at  $m/z = 4830.7$  and  $m/z = 7334$  for ATCA and at  $m/z = 4769.1$  and  $m/z = 7159.3$  for ATCB are multiple charged ions with three or two charges corresponding to a mass of  $14636.6 \text{ Da} \pm 131 \text{ Da}$  for ATCA and of  $14368 \pm 95 \text{ Da}$  for ATCB.

#### Structure Identification of the Trypsin Inhibitors

MALDI-TOF measurement of reduced and *s*- $\beta$ -pyridylethylated ATCA (16869 Da) and ATCB (16545 Da) and the comparison with mass measurements of the

TABLE II Amino acid composition of the anti-trypsin-chymotrypsin inhibitors from the rhynchobdellid leech *T. tessulatum* and the bdellin c from *Hirudo medicinalis*.

AA	ATCA (Moles%)	ATCB (Moles%)	Bdellin c (Moles%)
Asp	16.2	14	15.2
Thr	9.3	6.4	8.6
Ser	5.4	4	4.3
Glu	13.9	13.8	13
Pro	6.6	5.8	0
Gly	11	9.5	6.5
Ala	2.3	7.4	8.6
Cys/2	10	12.5	11
Val	1.2	2	8.6
Met	1.1	0.5	0
Ile	1.5	1.5	0
Leu	3.9	4.6	6.5
Tyr	4	4.2	2.2
Phe	1.7	2.6	0
His	1	0.8	13
Lys	4.1	5.3	0
Arg	3.5	5.3	2.17

native inhibitors revealed that they possess 20 cysteines. Furthermore, amino acid compositions (Table II) show that these inhibitors are rich in the dicarboxylic amino acids, cysteine and glycine. A slight difference exists between the two proteins; ATCB seems to be richer in alanine. These data demonstrate that the inhibitors are different from bdellins, isolated from the jaw leech *H. medicinalis* (Table II). In fact, bdellin c is rich in cysteine and histidine but is devoid of proline in contrast to the *T. tessulatum* trypsin inhibitors.<sup>8</sup> The hypothesis that *T. tessulatum* trypsin-chymotrypsin inhibitors are novel leech trypsin inhibitors is also demonstrated by the N-terminal sequence (MELCELGQSCSRDNPQPSNM) obtained on each (30 pmol) of the s-β-pyridylethylated purified inhibitors with a repetitive yield of 95%.

### Specificity of ATCA and ATCB

Characterization of their activity and their specificities towards various serine proteases e.g. chymotrypsin, trypsin, cathepsin G, elastase, thrombin and factor Xa reveals that these inhibitors are specific for trypsin and chymotrypsin (Table III). ATCA and ATCB present the same high affinity towards trypsin ( $K_i$  of around 400 fM). However, a difference exists between these inhibitors in regard to

TABLE III Trypsin-chymotrypsin inhibitors specificities.

<i>Enzymes</i>	<i>K<sub>i</sub> (fM) ATCA</i>	<i>K<sub>i</sub> (fM) ATCB</i>
Chymotrypsin	350 ± 30 fM	400 ± 35 fM
Trypsin	360 ± 28 fM	75 ± 12 fM
Cathepsin G	n.i	n.i
Thrombin	n.i	n.i
Elastase	n.i	n.i
Factor Xa	n.i	n.i

n.i.: no inhibition.

chymotrypsin inhibition. ATCB is more potent than ATCA towards this enzyme (75 fM vs 400 fM, respectively). In order to determine if a link between the two inhibitors exists, a trypsin mapping with an excess of trypsin was performed on these enzymes (Figure 4). After reversed-phase HPLC separation, the same elution profile was found except for the presence of two peptides (Pa, Pb) at the retention time of respectively 16 min and 15.49 min (Pa : m/z = 2456 Da) in ATCA (Figure 4a) and at 16.41 min (Pb : m/z = 1061 Da) in ATCB (Figure 4b). This suggests that the two inhibitors are very closely related. This hypothesis was confirmed by the sequencing of Pa and Pb. They give a related primary sequence i.e. CSDWPCFQGCNRYAGCMITCK for Pa and AYAGCMITCK for Pb. These data reveal that the Arg-Ala link in Pa was not cleaved by the trypsin enzyme. Two hypothesis could account for this, (1) the enzymatic digestion cleavage yield is different between the two inhibitors, (2) the CSDWPCFQGCNR sequence in Pa is not present in Pb. This last hypothesis allows us to postulate that ATCB results from ATCA post-translational processing or degradation. We surmise that the sequence difference between the two inhibitors may provoke a difference in the structure folding in the two inhibitors. This difference could explain why ATCB is a more active chymotrypsin inhibitor than ATCA.

## CONCLUSION

This is the first report of the isolation and the characterization of two highly specific and novel trypsin-chymotrypsin inhibitors from the rhynchobdellid leech *T. tessulatum*. Among the serine protease inhibitors found in jawed leeches, bdellins, trypsin-plasmin inhibitors found in *H. medicinalis*, are small proteins (20–30 kDa) containing a relatively large number of cysteine residues. They also contain many histidine residues but are devoid of any proline residues. These inhibitors reveal a strong homology with pancreatic trypsin inhibitors found in mammals.<sup>8</sup>

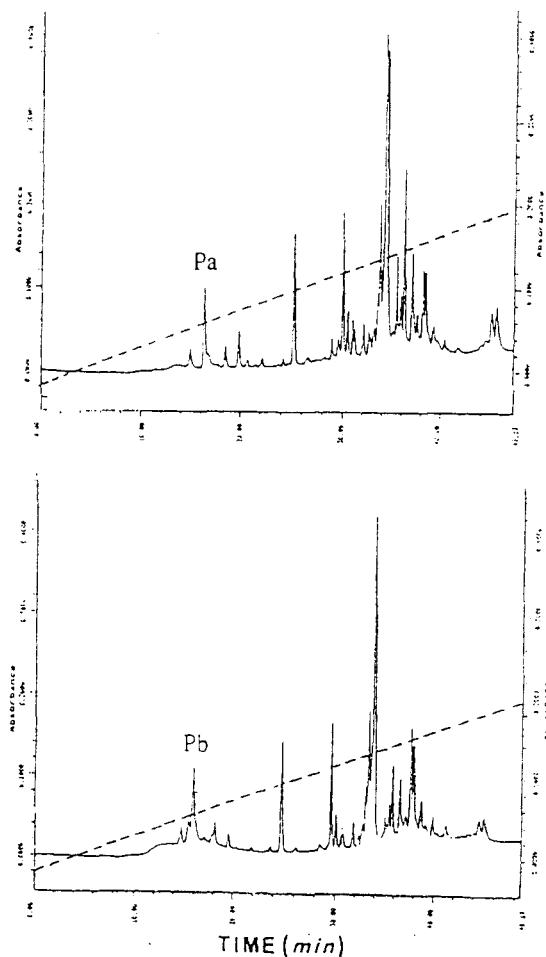


FIGURE 4 Tryptic digestion profiles of ATCA (A) and ATCB (B) after reversed-phase HPLC separation. The inhibitor/trypsin ratio used was 1 to 100, with digestion conducted during 17 h at 37°C. Elution position of peptides (Pa and Pb) are indicated in the graphs.

A hypothetical role for these inhibitors may be found in the preservation of the blood stored in the foregut.<sup>20</sup> In this regard, leeches are able to ingest large quantities of blood (8 fold the initial volume of their body) and store it over a period of several months. Conservation of the stored blood would require inhibition of proteases present in macrophages and granulocytes, since lysis of these cells could induce an untimely and uncontrolled digestion of their food, destroying

its nutritive value. We postulate that ATCA and ATCB may also be involved in such a phenomenon. Furthermore, this action would imply that these molecules may be used to diminish the action of mammalian serine proteases activated in abnormal circumstances.<sup>21</sup> The involvement of proteolytic enzymes in a number of degenerative diseases e.g. pancreatitis {zymogenic forms of proteolytic enzymes (trypsin 1 and 2, chymotrypsin A<sup>22,23</sup> and elastase<sup>24</sup>)}, is becoming more evident as is the need for curtailing this activity in uncalled for situations.<sup>25-27</sup> In this regard, aprotinin, a trypsin and kallikrein inhibitor isolated from bovine organs<sup>28</sup> has been used for more than three decades as an intensive care drug for acute pancreatitis<sup>29</sup>, demonstrating the significance of this class of enzyme.

#### Acknowledgements

We are indebted to Dr. A. Van Dorsselaer (Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique, UA 31 CNRS, Strasbourg, France) for the mass spectrometry determination. This work was in part supported by the following grants: NIMH COR 17138, NIDA 09010 and the Research Foundation and Central Administration of the State University of New York (GBS) and NIH Fogarty INT 00045 (MS and GBS). The technical assistance of A. Desmons and R. Leroux is kindly appreciated.

#### References

- [1] Roston, D., (1996). *Int. J. Cardiol.*, **53**, S11-S37.
- [2] Wulfsberg, E.A., Diane, E., Hoffman, J.D. and Marmon, M. (1994). *J. Biol. Chem.*, **271**, 217-222.
- [3] Quian, F. (1990). *Biomed. Biochim. Acta*, **50**, 531-540.
- [4] Markwardt, F. (1970). *Meth. Enzymol.*, **19**, 924-932.
- [5] Strube, K-H., Kröger, B., Biolojan, S., Otte, M. and Dodt, J. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 8590-8595.
- [6] Gasic, G.J., Viner, E.D., Budzynski, A.Z. and Gasic, G.P. (1983). *Cancer Res.*, **43**, 1633-1636.
- [7] Blankenship, D.T., Brankamp, R.G., Manley, G.D. and Cardin, A.D. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 1384-1389.
- [8] Fritz, H. and Krejci, K. (1976). *Meth. Enzymol.*, **45**, 797-805.
- [9] Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H.-P. and Fritz, H. (1977). *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.*, **358**, 1105-1117.
- [10] Electricwala, A., Von Sicard, N.A.E., Sawyer, R.T. and Atkinson, T. (1993). *J. Enz. Inhib.*, **6**, 293-302.
- [11] Söllner, C., Mentele, R., Eckerskorn, C., Fritz, H. and Sommerhoff, C.P. (1994). *Eur. J. Biochem.*, **219**, 937-943.
- [12] Goldstein, A.M., Murer, E.H. and Weinbaum, G. (1986). *Comp. Biochem. Physiol.*, **84B**, 117-121.
- [13] Swedensen, I., Boisen, S. and Heijgaard, J. (1992). *Carlberg Res. Commun.*, **47**, 45-51.
- [14] Malecha, J., Verger-Bocquet, M., Leprétre, A. and Tramu, G. (1989). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **309**, 127-130.
- [15] Bradford, M.M. (1976). *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- [16] Laemmli, U.K. (1970). *Nature (Lond.)*, **227**, 680-685.
- [17] Lowenberger, C., Bulet, P., Charlet, M., Hetru, C., Hodgeman, B., Christensen, B.M. and Hoffmann, J.-A. (1995). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 867-873.
- [18] Bieth, J.G. (1980). *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.*, **16**, 183-195.

- [19] Morisson, J.F. (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 269–286.
- [20] Bode, W. and Huber, R. (1992). *Eur. J. Biochem.*, **204**, 433–451.
- [21] Bilfinger T.V. and Stefano, G.B. (1995). *J. Cardio. Surg.*, **34**, 129–133.
- [22] de Caro, A., Figarella, C. and Guy, O. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 439–443.
- [23] Guy, O., Lombardo, D., Bartelt, D.C., Amic, J. and Figarella, C. (1978). *Biochemistry*, **17**, 1669–1675.
- [24] Larman, C., Brodrick, J.M. and Geokas, M.C. (1976). *Biochemistry*, **15**, 2491–2500.
- [25] Fancom, G., Uchlinder, E. and Knauer, C. (1936). *Win. Med. Wochenshr.*, **86**, 753–762.
- [26] Hopkins, R.L. (1993). In *Textbook of Pediatric Nutrition* (Lewinter-Suskind, L., ed.), pp. 375–382. Raven Press, New York.
- [27] Lasson, A. (1994). *Scan. J. Gastroenterol.*, **19**, 1–57.
- [28] Grebhart, W., Tschesche, H. and Fritz, H. (1986). In *Protease Inhibitors* (Barrett, A.J. and Salvesen, G., eds.), pp. 375–388. Elsevier Science, Amsterdam.
- [29] Coan, M.H. and Travis, J. (1970). In *Proc. Int. Res. Conf. Proteinase Inhibitors* (Fritz, H. and Tschesche, H., eds.), pp. 294–298. Walter de Gruyter, Berlin.

**Amino-acid-sequence determination and biological activity of tessulin, a naturally occurring trypsin-chymotrypsin inhibitor isolated from the leech *Theromyzon tessulatum***

**Vincent Chopin<sup>1</sup>, George B. Stefano<sup>1, 2</sup> and Michel Salzet<sup>1,2\*</sup>**

1 :Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, Groupe de Neuroimmunité des Hirudinées, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

2 : Neuroscience Research Institute, State University of New York, College at Old Westbury, Old Westbury, NY 11568-0210, USA.

\* To whom correspondence should be addressed : Professeur M. Salzet, Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, groupe de Neuroimmunité des Hirudinées, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France. Tel : (33)-3- 2043-6839, Fax : (33)-3-2004-1130. E-mail : salzet@pop.univ-lille1.fr or msalzet@worldnet.fr

*Abbreviations* : Tessulin, tessulatum inhibitor; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption Time of fly; LPS, lipopolysaccharides.

*Enzymes.* Chymotrypsin (EC 3.4.21.1); trypsin (EC 3.4.21.4); coagulation factor Xa (EC.3.4.21.6); thrombin (EC 3.4.21.5); porcine pancreatic elastase (EC. 3.4.21.11), cathepsin G (EC 3.4.21.20).

**Abstract :** We purified a new trypsin-chymotrypsin inhibitor, designated tessulin, from the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. This 9 kDa peptide was purified to apparent homogeneity by gel-permeation and anion-exchange chromatographies followed by reversed-phase HPLC. The structure of tessulin was determined by reduction, s- $\beta$ -pyridylethylation, trypsin digestion, automated Edman degradation and Matrix assisted laser desorption mass spectrometry. The 81 amino-acid residues peptide possesses 16 cysteines.. Tessulin exhibits a 16% sequence homology with antistasin-type inhibitors. Tessulin inhibits trypsin ( $K_i$  of 1 pM) and chymotrypsin ( $K_i$  of 150 pM). It exhibits no activity with thrombin, factor Xa, cathepsin G and elastase. This is the first trypsin-chymotrypsin inhibitor isolated from leeches that does not inhibit elastase or cathepsin G, except for cytisin and therin. Furthermore, tessulin, in conjunction with other serine-proteases inhibitors isolated from *theromyzon* (therin, theromin), significantly diminishes the level of human granulocytes and monocytes activation induced by lipopolysaccharides (1  $\mu$ J/ml). The combined level of inhibition is higher than that of aprotinin, another serine-protease inhibitor used biomedically. Thus, tessulin may be clinically significant in reducing inflammatory events.

## Introduction

In numerous pathological processes, the crucial role played by proteases is becoming more apparent. This critical role creates a need for the development of non-toxic protease inhibitors for *in vivo* clinical applications. Because of the specific recognition by proteases of defined amino acid sequences, it is possible to inhibit these enzymes when they are involved in pathological processes [1]. The involvement of proteolytic enzymes in a number of degenerative diseases *e.g.* pancreatitis {zymogenic forms of proteolytic enzymes (trypsin 1 and 2, chymotrypsin A [2, 3] and elastase [4])}, is becoming more evident as is the need for curtailing this activity in uncalled for situations [5-7]. In this regard, aprotinin, a 6.5 kDa trypsin and kallikrein inhibitor isolated from bovine organs [8] has been used for more than three decades as an intensive care drug for acute pancreatitis [9], demonstrating the significance of this class of enzyme.

In hematophagous leeches, animals that must escape host-immune surveillance, studies on serine-protease inhibitors have yielded significant findings relating to the clinical importance of these enzyme inhibitors. Of two groups of serine-protease inhibitors, one is related to specific inhibitors of proteases interfering in the activation of blood clotting processes, thrombin inhibitors, *i.e.*, hirudin [10], haemendin [11] and inhibitors of Factor Xa, *i.e.*, antistasin [12] or ghilanten [13]. The second group is related to inhibitors of proteases acting on the extracellular matrix, *i.e.*, Bdellin [14], eglin [15], gelin [16], guamerins [17, 18] and hirustasin [19]. However, some of these inhibitors exhibit different amino acid sequences and inhibitory activities, their three-dimensional structures share the same structural motif with the Leech Antihemostatic Protein (L.A.P.) [20]. Interestingly, their mechanisms of action and epitopes important for binding to their respective targets are distinct as well [20], suggesting that through evolution different strategies emerged to deal with a similar problem.

Among the second group of serine-protease inhibitors, the antistasin-type shares a common sequence identity (30%-35%). In fact, in jawed leeches (*Hirudo medicinalis*), hirustasin (5.866 kDa) exhibits *ca.* 35% sequence identity with the first and the second domain of antistasin [19]. In the *Hirudo nipponia* and in the non-blood sucking leech *Whitmania edentula*, guamerins I and II respectively, cysteine-rich serine-protease inhibitors of 6 kDa, share 48%-51% sequence identity with hirustasin and 30%-39% with the first domain of antistasin [17, 18]. We have already isolated from *T. tessulatum*, considered as the most primitive leech [21], therin, another cysteine rich serine-protease inhibitor, having 30% sequence identity with antistasin-type inhibitors [22]. We now report on yet another inhibitor,

designated tessulin. We also demonstrate that this molecule, modulates in conjunction with other *T. tessulatum* serine-protease inhibitors, such as therin [22], cytin [23] and theromin (thrombin inhibitor isolated from *T. tessulatum*, Matias *et al.*, unpublished data), the activity in human immunocytes in a higher manner to aprotinin, a serine-protease inhibitor used to diminish the diffuse inflammatory response associated with major surgery [24, 25]. Thus, leeches represent a reservoir of serine-protease inhibitors which are so essential for a parasitic life style involving fluid acquisition when clotting processes are present in the host.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Starved *T. tessulatum* leeches were maintained in the laboratory under standard laboratory conditions described elsewhere in detail [26]. Chromogenic substrates S-2765, S-2238, S-2586 were purchased from Kabi Diagnostica. Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Baker. Trifluoroacetic acid (TFA) was from Pierce, porcine pancreatic elastase, chymotrypsin, trypsin, cathepsin G, thrombin and chromogenic substrates, (Benzoyl-arginine *p*-nitroanilide, *N*-succinyl Ala-Ala-Ala *p*-nitroanilide, *N*-succinyl Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide) were obtained from Sigma. Molecular mass calibration for SDS/PAGE were purchased from Pharmacia. All other reagents were of analytical grade.

### Isolation of the trypsin-chymotrypsin inhibitor

*Chromatography on Superdex G75 column* - After anesthesia of the animals in 0.01% chloretone, posterior parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. 8 g. of posterior parts were placed in 25 ml 20 mM Tris/HCl, pH 8.4, 200 mM NaCl (Tris/NaCl) and homogenized at 4°C with a polytron (five 15s bursts on setting 9). After centrifugation (30 min at 12,000 rpm on sigma 2K15 rotor at 4°C), the pellet was extracted six-fold with Tris/NaCl. Supernatants were combined and filtered on nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size; Millipore). The extract was applied onto a FPLC column (Superdex G75, 16/60, Pharmacia; equilibrated with Tris/NaCl) at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by absorbance at 280 nm. All column fractions (1 ml) were assayed for protease inhibitor activity against chymotrypsin and trypsin.

*Chromatography on Mono Q* - Pooled active fractions were concentrated 20-fold in a vacuum centrifuge (Savant) before loaded onto a Mono Q column (FPLC, HR 5/5, Pharmacia; equilibrated in 20 mM Tris/HCl, pH 8.8). The column was washed with the same buffer and eluted with a linear gradient of 0-0.15 M NaCl in 18 min followed by a step at 1.5 M NaCl at a flow rate of 1ml/min.

*Final purification* - Fractions containing the trypsin-chymotrypsin inhibitor were applied to a C8 Lichrosphere Rp100 column (125 mm x 4.6 mm, Merck) with a linear gradient of acetonitrile in water acidified with 0.1 % trifluoroacetic acid from 0 to 60 % in 60 min at a flow rate of 1 ml/min. All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a photodiode array detector (Beckman 168).

### **Chromogenic assay**

During the purification procedure, inhibitory activity was assayed by measuring the inhibition of the release of p-nitroanilide from the synthetic substrate catalyzed by trypsin or chymotrypsin. Samples were incubated with a known amount of trypsin or chymotrypsin in Tris/NaCl for 15 min at room temperature. The assay was started by addition of the chromogenic substrate. The released nitroaniline was monitored photometrically at 405 nm for 3.5 min using a Dynatec MR-5000 at room temperature. A control reaction, in the absence of tessulin, was carried out under identical conditions. The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml 50% glacial acetic acid. 1 U protease inhibitory activity is as defined 1 $\mu$ g of protease inhibited, and specific activity as U/mg protease inhibited [16].

### **Protein assay**

Protein concentrations were determined with the Bradford procedure [27] using  $\gamma$  globulin as a standard.

### **Electrophoresis**

Electrophoresis analysis of reduced and denatured proteins was performed in SDS/polyacrylamide gradient gels (from 10% to 25% polyacrylamide) as described [28].

### **Structural analysis of the trypsin-chymotrypsin inhibitor**

*Capillary zone electrophoresis* - Prior to sequencing, the purity of the peptide was evaluated by capillary electrophoresis. Samples (2 nl) were injected under vacuum into a

PACE capillary electrophoresis system (Beckman) equipped with a fused-silica capillary (72 cm length). Separation from anode to cathode was carried out in 20 mM sodium citrate, pH 2.5 at 20 kV and 30°C. Capillary effluent was monitored by its absorption at 200 nm.

*Reduction and s-β-pyridylethylation* - 10 µl of isolated protein (50 pmol) was dissolved in 40 µl 0.5 M Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, containing 6 M guanidine hydrochloride and 2 µl 2 M dithiothreitol were added in the dark. The sample was flushed with nitrogen and the mixture incubated at 45°C for 1 h. Freshly distilled 4-vinylpyridine (2µl) was added and incubated for 10 min at 45°C in the dark. The pyridylethylated peptide was separated by reversed-phase HPLC prior to microsequencing.

*Microsequence analysis* - Automated Edman degradation of both native and pyridylethylated peptides and detection of phenylthiohydantoin derivatives were performed on a pulse-liquid automatic sequencor (Applied Biosystems, model 473A).

*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS)* - Purified peptide (1 µl) was deposited on a thin layer of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid crystals made by fast evaporation of a saturated solution in acetone. The droplet was allowed to dry under a gentle vacuum before introduction into the mass spectrometer. MALDI-MS measurement was performed in a Bruker BIFLEX™ (Bruker, Bremen, Germany) operating in the positive linear mode. Ions were formed by a pulse ultraviolet laser beam (nitrogen laser,  $\lambda = 337$  nm). Mass spectra were obtained by averaging 50-100 laser shots. External mass calibration was provided by the  $[M + H]^+$  ion of angiotensin II (1047.20 Da), ACTH (18-39) (2466.73 Da), and bovine insulin (5734.56 Da) and/or using matrix peaks  $[M + H]^+ : 190.05$ ;  $[2M + H]^+ : 379.09$  Da).

*Enzymatic Digestions and Separation of Products of Digestion* - A fraction aliquot of the s-β-pyridylethylated tessulin was treated with trypsin (TPCK treated, Takara, Koyo, Japan, in a ratio of 25%). The material was digested according to the manufacturer's directions (37°C, 16h); the reaction was stopped by acidification and the peptide fragments were separated on a RP100 C18 column (250 x 4.6 mm, Merck) equilibrated with acidified water. Fractions were eluted with a linear gradient, 0-80%, of acetonitrile in acidified water over 80 min at a flow rate of 1 ml/min. Emerging peaks were concentrated in a vacuum centrifuge (Savant) prior to sequencing.

### **Determination of equilibrium constant**

To determine the specificity of tessulin, its inhibitory activity towards different serine-proteases was compared using established chromogenic assay methods. Equilibrium dissociation constants ( $K_i$ ) for the complexes of tessulin with individual proteases were determined essentially as described by the method of Henderson [29] and simplified by Bieth [30]. In brief, increasing amounts of tessulin were incubated with a constant amount of protease in Tris/NaCl for 30 min at 37°C and the remaining protease activity was measured by the addition of the chromogenic substrate. Remaining protease activity was monitored by absorbance at 405 nM. Graphical analysis yielded an apparent  $K_i$  using the equation :  $[I]/(1-a) = K_{iapp} (1/a) + [P]$ , where  $[I]$  and  $[P]$  are the initial concentration of inhibitor and protease respectively, and  $a$  is the remaining fractional protease activity (100% control activity equals fractional activity of 1.0) [30].

### **Sequence identity and sequence alignment**

The sequence identity of tessulin with other serine-protease inhibitors was determined using the BLITZ database search (<http://www.ebi.ac.uk/searches/blitz.html>). The amino acid sequences of the various antistasin-type protease inhibitors were aligned using MPSrch version 1.5 algorithm (Shane S. Sturrock & John F. Collins, 1993. Biocomputing Research Unit, University of Edinburgh, UK).

### **Immunocyte Assay**

Human leucocytes for cellular analyses were obtained from the Long Island Blood Services (Melville, NY). Cells were separated by the standard Ficoll-Hypaque method as noted elsewhere in detail [31-33]; they were washed three times in RPMI medium (RPMI, 25 mM Hepes, Grand Island Biological Co., NY). Lipopolysaccharides (LPS) were obtained from Sigma (St. Louis, Mo).

In this assay, immunocytes were analyzed for their ability to change shape in response to LPS. Both granulocytes and monocytes were diluted (406 cells  $\pm$  13 /100  $\mu$ l) and exposed to LPS, at a previously determined effective dose (1 U/ml), on precoated (1% BSA) glass slides; changes in cell shape were monitored over a 60 min period. Besides LPS, the cells were coincubated with either aprotinin, a serine-protease inhibitor, tessulin, therin or theromin.

*Analysis of cellular activity* - The analysis of immunocyte activation was determined as reported elsewhere [33]. Briefly, cells, with or without the various agents were analyzed

using computer-assisted microscopic image analysis (Image Analytics, Inc. Hauppauge, NY). About 45-51 activated cells (ameboid and exhibiting form factors below 0.5) were observed for each 400- $\mu$ m viewing diameter, and four additional viewing diameters were observed/slide constituting a single mean value. The entire process was repeated three times and the resulting mean of the mean (% immunocyte activation) ( $\pm$  SEM) was plotted against time. The variation for individual readings was between 5% and 9%.

Human immunocytes were analyzed every 15 min following the initial exposure to the various agents. Changes in cellular conformation ranging from inactive-rounded to active-amoeboid were determined by measurements of cellular area and perimeter and were expressed mathematically using the shape-factor formula ( $4 \times \pi \times \text{area} / \text{perimeter}^2$ ). The proportion of activated cells was determined as described elsewhere [34]. Activated cells not only change their conformation in response to a pharmacological stimulus, they also become mobile, capable of phagocytosis and secrete various signaling molecules [34, 35].

*Statistics* -Analysis was performed using the two-tailed Student's-t-test to compare controls with LPS stimulated cells and those stimulated with LPS in the presence of tessulin, therin, theromin and/or aprotinin. Each experimental sample was compared to its own control so as to reduce variability due to spontaneous activation.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Purification of tessulin

The result of the stepwise purification of tessulin are summarized in Table 1. After extraction, filtered supernatants were subjected to a gel-permeation chromatography on Superdex G75 column. A single zone at a retention time between 44-55 min corresponding to proteins having a molecular mass less than 14.4 kDa, was found (Fig. 1a). The peptide was then purified by anion exchange chromatography on a Mono Q column using a stepwise gradient of NaCl from 0-1.5 M. Under these conditions, the trypsin-chymotrypsin inhibitor peptide eluted at 1.5 M NaCl. Then it was purified to homogeneity by reversed-phase HPLC on a C8 Lichrosphere column using a linear gradient of acetonitrile in acidified water (0.1% trifluoroacetic acid). A single peak exhibiting the inhibitory enzyme activity was obtained at a retention time of 33 min (Fig. 1b). After the final reversed-phase HPLC, the purity of the material was checked in SDS-PAGE (Fig. 1b see inset) and in capillary zone electrophoresis (Fig. 2).

### **Determination of the primary structure**

Prior to its microsequencing, the purified peptide was reduced and s- $\beta$ -pyridylethylated, then subjected to automated Edman degradation. The complete amino acid sequence was obtained by N-terminal sequence determination followed by a trypsin treatment of the s- $\beta$ -pyridylethylated peptide. The separation of the digested fragments was on reverse-phase HPLC and a mass determination with MALDI-MS of each peptides after microsequencing was performed (Fig. 3). The peptide, designated tessulin, sequence is the following : MCENTECPRACPGEYEFDEDGCNTCLCKEPCYLCVGEYDFFEGGCNRLCKCGRAQCRARVGCDFFLDANGCEGGNTRCTCN. Its molecular mass measured by MALDI-MS is  $8985.5 \pm 1.1$  Da (Fig. 4a) which is in agreement with the monoisotopic molecular mass of the oxidized tessulin calculated from the amino acid sequence with 16 cysteines residues (8970 Da). This was verified by MALDI-MS performed on the s- $\beta$ -pyridylethylated molecule ( $10679.4 \pm 1.3$  Da) (Fig. 4b).

### **Structure comparison**

Tessulin exhibits only ca. 16% sequence homology with antistasin-type protease inhibitors. Furthermore, when tessulin is aligned with the potentially homologous inhibitors, the position of their cysteines matches best with all antistasin-type protease inhibitors. The P1 residue of the reactive site of the inhibitor generally determines its specificity. In antistasin, only the N-terminal domain is inhibitory and the P1 residue is Arg34 [36]. This residue corresponds to Arg30 in hirustasin, Met35 in guamerin (I and II) [17,18] and it also may represent Lys28 in therin [22] and Lys29 in tessulin (Table 2). Additionally, an amino acid sequence comparison between antistasin, hirustasin, hirudin, decorsin [37] and ornatin [38], demonstrates the sharing of the same structural motif. This motif involves the spacing of six cysteine residues : Cys-X6-12-Cys-X-Cys-X3-6-Cys-X3-6-Cys-X8-14; where Xn is a string of any n residues except cysteine. With regard to tessulin's amino acid sequence, only its C-terminus exhibits homology with this structural motif L.A.P. [20].

### **Specificity and Activity of Tessulin (Table 3)**

Tessulin inhibits bovine chymotrypsin with high affinity ( $K_i$  value of 150 pM). This value is similar to those obtained for eglin and gelin, potent chymotrypsin inhibitors isolated from jawed leeches [15, 16]. Tessulin activity is greater in inhibiting chymotrypsin compared to  $K_i$  values obtained for guamerin II and hirustasin [18, 19]. Tessulin also is a more potent trypsin inhibitor ( $K_i$  value of 1 pM) compared to chymotrypsin, also having higher  $K_i$  values compared to hirustasin [19] and bdellins [14].

Interestingly, the sequence surrounding the putative reactive site, may explain the specificity of tessulin (Table 2). The preference for trypsin may be explained by the lysine residue found at the P1 position. Such a residue also is present in therin, another potent and specific trypsin binding inhibitor ( $K_i$  : 600 fM) [22]. By contrast, guamerins that have a Met in P1 and are highly specific for neutrophil elastase and chymotrypsin than the other antistasin-type protease inhibitors. Domains I of antistasin, which is a factor Xa inhibitor, possesses an Arg in P1. Taken together, it appears unlikely that the major differences in specificity are caused by differences in the amino acid sequences surrounding the putative reactive site of these serine-protease inhibitors.

We surmise that the role for these protease inhibitors may be found in the preservation of the blood stored in the foregut [40]. In this regard, leeches are able to ingest large quantities of blood (8 fold the initial volume of their body) and store it over a period of several months. Preservation and the slow gradual use of the stored blood requires the presence of these protease inhibitors which will inhibit the proteases present in macrophages and granulocytes. Enzyme digestion by these host immunocyte enzymes would induce an untimely and uncontrolled breakdown of their food, destroying its nutritive value. Furthermore, as a result of this protease inhibitory action, leeches require fewer hard to find hosts since they can consume more and preserve it, thus enhancing their survival.

### **Biological Activity of tessulin**

In order to determine if tessulin is biologically active in diverse cell systems, we examined it for its ability to diminish LPS-induced excitation of human leucocytes. These immunocytes, *i.e.*, granulocytes and monocytes, were chosen for their ability to release numerous enzymes and signal molecules that require processing to liberate immunocyte excitatory molecules, *i.e.*, opioid peptides that may participate in a further enhancement of immunocyte activation [31-35]. As previously observed, once human immunocytes are

separated and placed on a slide, they exhibit a low level of spontaneous activation as noted by an increase in the number of cells becoming ameoboid and moving (see [35], Fig 5). In the presence of a previously demonstrated effective dose of LPS (1 U /ml) the number of activated cells significantly increases ( $P<0.005$ ; Fig.5). Interestingly, this response to LPS continues after it is washed off (Fig 5); this suggests that a cascading process may have been initiated which serves to further activate the cells [23]. The results shown in Figures 5 and 6 demonstrate that pre-incubation of immunocytes with LPS followed by the serine-protease inhibitor aprotinin, significantly ( $P< 0.005$ ) diminished the immunocyte excitation caused by LPS in a concentration-dependent manner, suggesting that enzymes were present that may be processing released signaling molecules that would lead to the higher level of activation in the absence of aprotinin ( $P<0.01$ ; Figures 5, 6). Furthermore, the level of activation that occurs in the presence of aprotinin is higher than that found in non-LPS exposed cells ( $10.8 \pm 3.4$ ; compared to  $10^{-6}$  M aprotinin  $21.1 \pm 3.7$ ,  $P <0.05$ ). This last result also supports the hypothesis that the higher level of cellular activation seen in the presence of aprotinin is due to a cascade of signaling molecules post-LPS stimulation.

In this regard, concomitant exposure to tessulin, therin [22], theromin (*Theromyzon* thrombin inhibitor, Matias *et al.*, unpublished data) also resulted in a concentration dependent inhibition of cell activation, higher than that by aprotinin alone in response to LPS (Figs. 5, 6). Exposure of the cells to tessulin, therin or theromin alone significantly diminished the immunocyte activation, however, it was lower than that of aprotinin. Taken together, these results demonstrate that after a primary stimulus is given the cells are capable of enhancing their own level of stimulation by generating signaling molecules that must be processed. In this regard, the leech protease inhibitors are able to significantly lower the level of activation, indicating their biomedical relevance

#### **4.0 Conclusion**

Despite the sequence homology and characteristic spacing of the cysteines among guamerins, hirustasin and antistasin, these serine-protease inhibitors act on different target proteases. One hypothesis regarding the significance of the sequence identity between all these molecules is that they evolved from a common ancestral gene. This gene evolved by gene duplication to give rise to antistasin and many other serine-protease inhibitors.

The second group of serine-protease inhibitors found in leeches is the trypsin-chymotrypsin-elastase inhibitors. This group is represented by the potent inhibitors eglin,

bdellins, and gelin [14-16]. They share a common molecular weight of 8 kDa. Regarding their activities, eglin and gelin inhibit elastase, cathepsin G and chymotrypsin and they exhibit little or no activity toward plasmin, thrombin, pepsin and trypsin. Amino-terminal sequence analysis of the first 29 residues of the gelin reveal no sequence homology with eglin, bdellins or any other serine-protease inhibitors. These results have allowed Electricwala *et al.* [16] to suggest that elastase/chymotrypsin inhibitors are fundamentally different in structure, indicative of an independent evolutionary origin.

Taken together, at the present time we can not conclude that tessulin belongs to any of the known serine-protease inhibitor groups. It does not share the L.A.P. motif nor does it exhibit sequence homology with eglin and gelin. However, the present study clearly establishes that tessulin is a new, unique and potent trypsin-chymotrypsin inhibitor. In regard to tessulin's biological activity, we have demonstrated that it can, as noted for other serine protease inhibitors, diminish immunocyte activation following LPS exposure. The study also demonstrates that « primitive » organisms, i.e., leeches have devised highly specific mechanisms to communicate with their hosts. These mechanisms, at the same time, serve to indicate the significance of various host processes as well as to shed light on their vulnerable steps. Indeed, these vulnerable points of alteration may well be used in medicine to curtail these processes where deemed appropriate [40, 41].

### ***Acknowledgments***

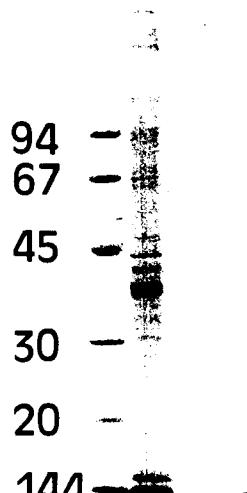
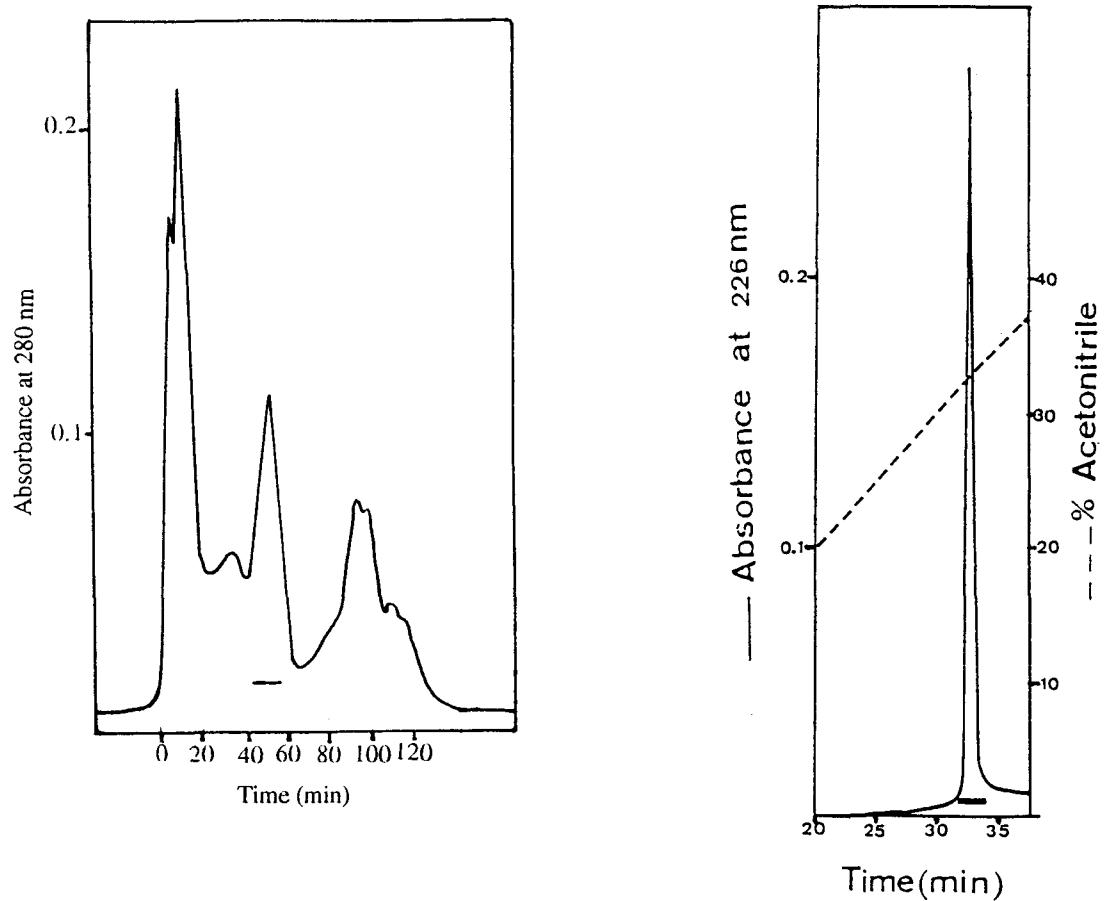
We would like to thank Dr. A. Van Dorsselaer, (Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique, UA 31 CNRS, Strasbourg, France), for the mass spectrometry determination and also to Dr. P. Bulet (UPR 9022 CNRS, Strasbourg) for his help in the beginning of the microsequencing of tessulin. This work was in part supported by the following grants: NIMH COR 17138, NIDA 09010 and the Research Foundation and Central Administration of the State University of New York (GBS) and NIH Fogarty INT 00045 (MS and GBS).

## REFERENCES

- [1] Roose, J. P. and Van Noorden, C.J.F. (1994) *Europ. Microsc. Analys.*, May, 5-7.
- [2] de Caro, A., Figarella, C. and Guy, O. (1975) *Biochem. Biophys. Acta.* **379**, 439-443.
- [3] Guy, O., Lombardo, D., Bartelt, D.C., Amic, J. and Figarella, C. (1978) *Biochemistry* **17**, 1669-1675.
- [4] Larman, C., Brodrick, J.M. and Geokas, M.C. (1976) *Biochemistry* **15**, 2491-2500.
- [5] Fancom, G., Uchlinger, E. and Knauer, C. (1936) *Win. Med. Wochenshr.* **86**, 753-762.
- [6] Hopkins, R.L. (1993) in textbook of pediatric nutrition (lewinter-Suskind, L. (ed.), pp. 375-382, Raven Press, New York.
- [7] Lasson, A. (1994) *Scan. J. Gastroenterol.* **19**, 1-57.
- [8] Grebhart, W., Tschesche, H. and Fritz, H. (1986) in protease inhibitors (Barrett, A.J. and Salvesen, G., (eds.), pp375-388, Elsevier Science, Amsterdam.
- [9] Coan, M.H. and Travis, J. (1970) in Proc. Int. Res. Conf. proteinase inhibitors (Fritz, H. and Tschesche, H., eds.), pp 294-298, Walter de Gruyter, Berlin.
- [10] Markwardt, F. (1970) Hirudin as an inhibitor of thrombin. Proteolitic enzymes (ed. Perlman G.E. and Lorand L.) *Meth. Enzymol.* **19**, 924-932.
- [11] Strube, K-H., Kröger, B., Biolojan, S., Otte, M. et Dodt, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 8590-8595.
- [12] Gasic, G.J., Viner, E.D., Budzynski, A.Z. et Gasic, G.P. (1983) *Cancer Res.* **43**, 1633-1636.
- [13] Blankenship, D.T., Brankamp, R.G., Manley, G.D. et Cardin, A.D. (1990) *Biochem. Biophys. Commun.* **166**, 1384-1389.
- [14] Fritz, H. et Krejci, K. (1976) *Meth. Enzymol.* **45**, 797-805.
- [15] Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Muller, H.-P. et Fritz, H. (1977) *Hoppe-seyler Z. Physiol. Chem.* **358**, 1105-1117.
- [16] Electricwala, A., Von Sicard, N.A.E., Sawyer, R.T. et Atkinson, T. (1993) *J. Enzyme Inhibition* **6**, 293-302.
- [17] Kim, D.R., Hong, S.J., HA, K.-S., O Joe, C. and Kang, K.W. (1996) *J. Enz. Inhibit.* **10**, 81-91.
- [18] Jung, H.I., Kim, S.I., Ha, K.S. and Kang, K.W. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13879.
- [19] Söllner, C., Mentele, R., Eckerskorn, C., Fritz, H. And Sommerhoff, C. P. (1994) *Eur. J. Biochem.* **219**, 937-943.

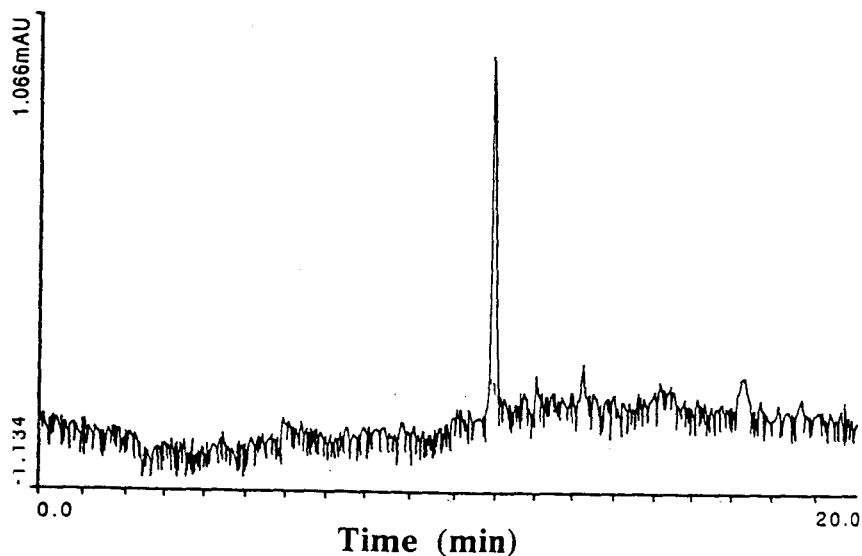
- [20] Krezel, A.M., Wagner,G., Seymour-Ulmer, J. and Lazarus, R.A., (1994) *Science* **264**, 1944-1947
- [21] Sawyer, R.T. (1986) Leech biology and behavior. Clarendon Press, Oxford.
- [22] Chopin, V., Matias, I., Stefano, G.B., Salzet, M. *Eur. J. Biochem.*, submitted for publication.
- [23] Chopin, V., Bilfinger, T.V., Stefano, G.B., Matias, I., Salzet, M. (1997) *Eur. J. Biochem.* **249**, 733-738.
- [24] Royston, D. (1996) *Int. J. Cardiol.* **53 suppl**, S11-S37.
- [25] Soeparwata, R., Hartman, A.R., Frerichmann, U., Stefano, G.B., Scheld, H.H., and Bilfinger, T.V., (1996) *Int. J. Cardiology* **53 suppl**, S55-S63.
- [26] Malecha, J., Verger-Bocquet, M., Leprêtre, A., and Tramu, G. (1989) *C. R. Acad. Sci. Paris* **309**, 127-130.
- [27] Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- [28] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- [29] Henderson, P. (1972) *Biochem J.* **127**, 321-333.
- [30] Bieth, J. G. (1980) *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **16**, 183-195.
- [31] Salzet, M., Stefano, G.B. (1997) *Brain Res.* **768**, 224-232.
- [32] Salzet, M., Salzet-Raveillon, B., Cocquerelle, C., Verger-Bocquet, M., Pryor S.C., Rialas, C.M., Laurent, V., Stefano, G.B. (1997) *J. Immunol.* **159**, 5400-5411.
- [33] Salzet, M., Stefano, G.B., *Mol. Brain Res.* **52**, 47-55
- [34] Stefano, G.B., Bilfinger, T.V., and Fricchione, G.L., (1994) *Prog. Neurobiol.* **42**, 475-488.
- [35] Stefano, G.B., Scharrer, B., Smith, E.M., Hughes, T.K., Magazine, H.I., Bilfinger,T.V., Hartman,A.R., Fricchione, G.L., Liu,Y., and Makman, M.H., (1996) *Critical Reviews in Immunology.***16**, 109-144.
- [36] Tuzynski, G.P., Gasic, T.B.and Gasic, G.J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9718-9723.
- [37] Seymour, J.L., Henzel, W.J., Neving, B., Stults, J.T., Lazarus, R.A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265(117)**, 10143-10147.
- [38] Mazur, P., Henzel, W.S., Seymour, J.L., Lazarus, R.A. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202(3)**, 1073-1082.
- [40] Bode, W. and Huber, R. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 433-451.
- [40] Stefano, G. B., Leung, M. K., Zhao, X. , Scharrer, B. (1989)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 626-630.





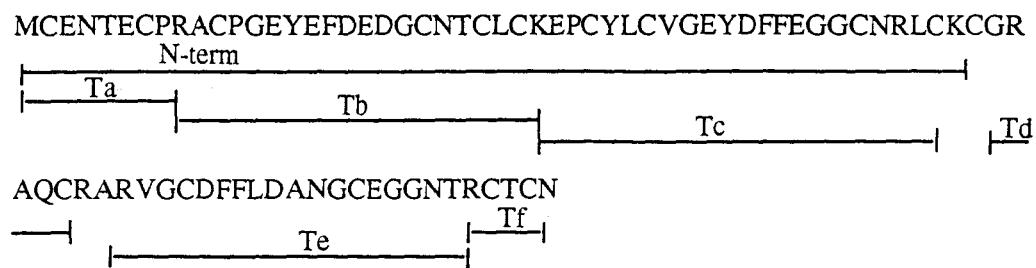
**Figure 1 :** Elution profiles of tessulin following purification steps.

- (a) Elution profile on Superdex G75 column of 3 ml of extract;
- (b) Final step of purification on C8 reversed-phase column of the trypsin-chymotrypsin inhibitor. Inset photograph represents the fractions containing the tessulin separated by SDS-PAGE in reducing conditions (a) crude extract; (b), final step of purification. Small arrow indicate position of the tessulin; arrowheads to the left of the gel indicate molecular mass standards. The solid bars indicate the fractions containing the tessulin.

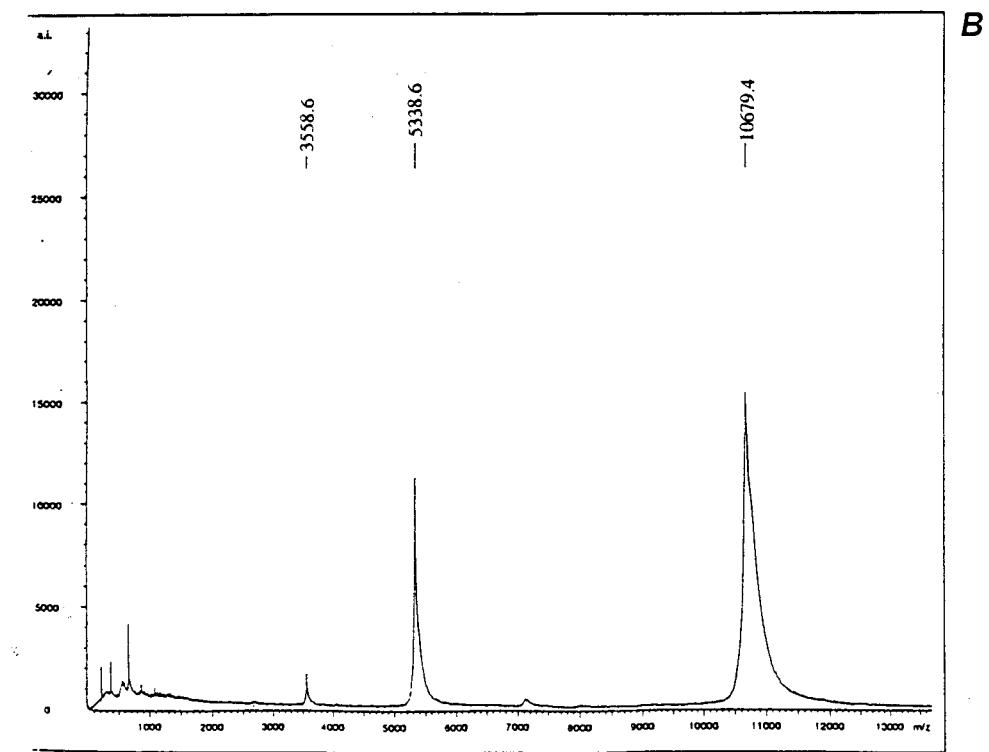
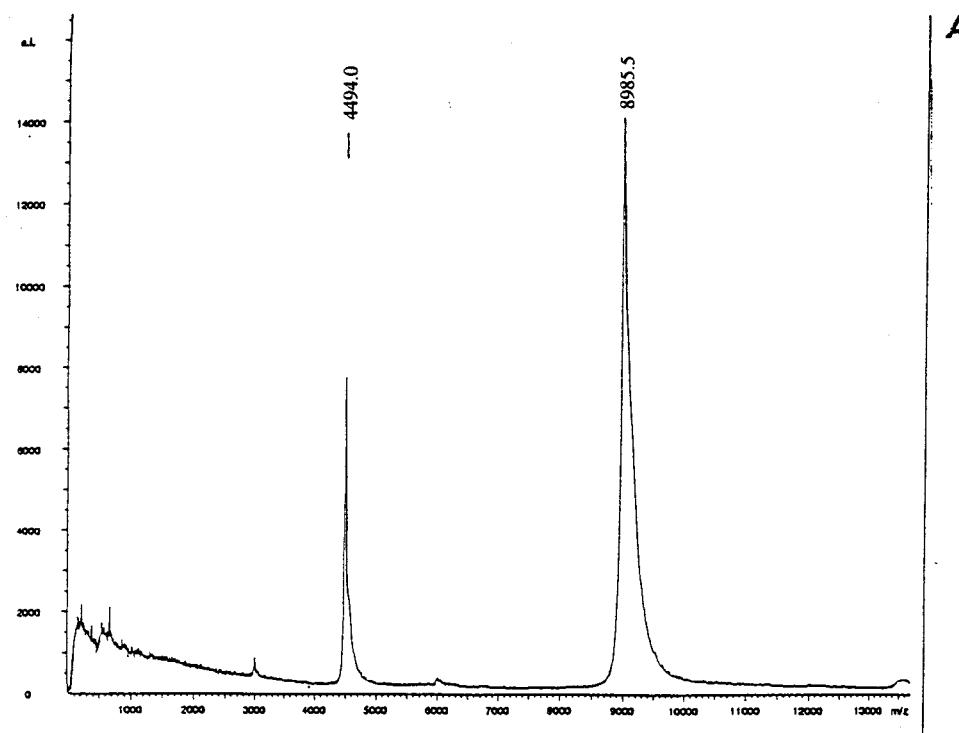


**Figure 2 :** Capillary zonal electrophoresis of isolated tessulin.

Analyses were performed using a 72 cm capillary with 20 mM citrate buffer at pH 2.5.



**Figure 3 :** Schematic representation of the tessulin sequence following Edman degradation (N-terminal sequence) and after enzymatic treatment.

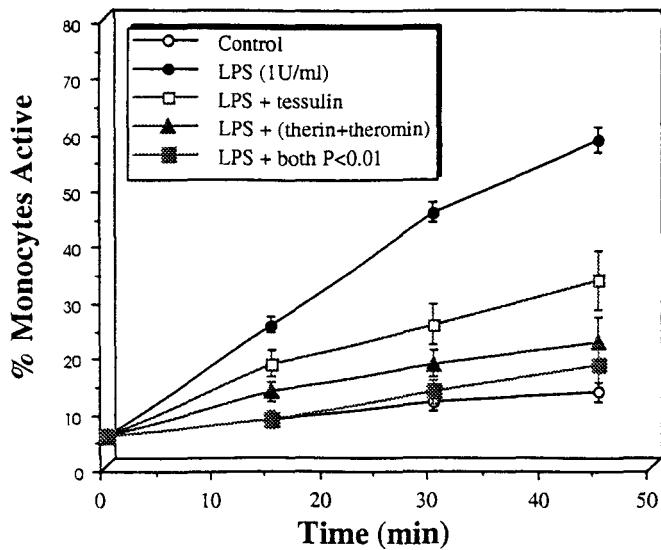


**Figure 4 : Mass measurement by MALDI.**

*MALDI- measurement of tessulin at the final step of purification.*

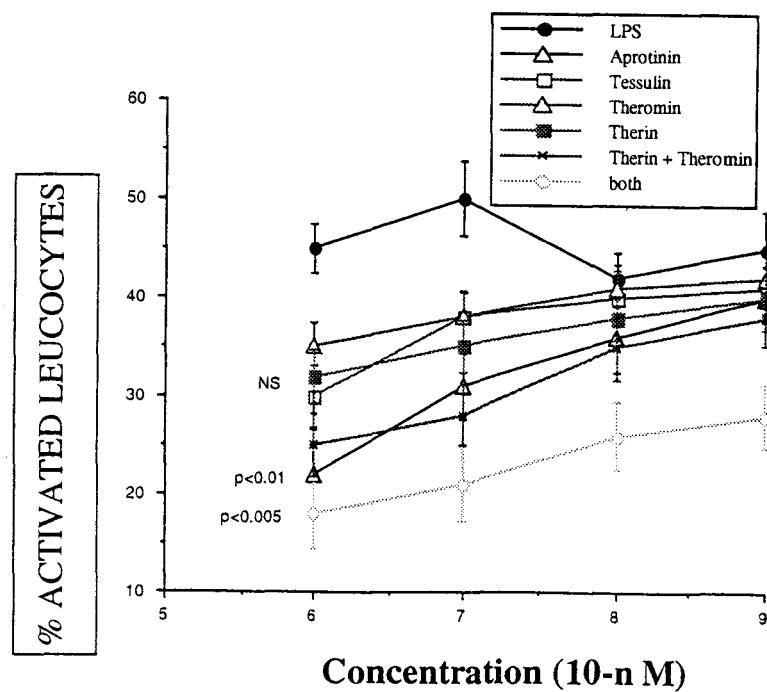
a- on native molecule : Peak at  $m/z = 4494$  is a double charged ions.

b- on reduced and alkylated molecule : Peak at  $m/z = 5338.6$  is a double charged ions.



**Figure 5 : Demonstration of the dual nature of LPS activation of human monocytes.**

LPS (1U/ml) stimulates monocytes in a manner that can be diminished by tessulin ( $10^{-6}$  M) and by therin + theromin ( $10^{-6}$  M) and by both three (tessulin, therin and theromin). The percent activation is noted by computer-assisted microscopy where the number of cells exhibiting form factors below 0.50 are compared to those exhibiting this factor at 0.70 and above. Details of the assay are found in the text.



**Figure 6 : Concentration dependant inhibition of LPS-activated human monocytes by aprotinin, tessulin, theromin and therin.**

Details are in the text and the legend to figure 5. Both : tessulin, therin and theromin

**Table 1** Purification of tessulin. 8g leech extract was used as the starting material. One Inhibition Unit (IU) was defined as the amount ( $\mu\text{g}$ ) of chymotrypsin inhibited at 100% (see Materials and Methods section).

	Total protein (mg)	Total activity (IU)	Specific Activity (IU/mg)	Recovery (%)	Purification Fold
Leech extract	600	300	0.5	100	1
Superdex G75	63	252	4	84	8
Mono Q-FPLC	5.7	85	15	28	30
RP-HPLC	0.003	48	16000	16	32000

**Table 2.** Comparison of putative active site sequences of tessulin with those of antistasin-type protease inhibitors.

	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
Tessulin	T	C	L	C	K	E	P	C
Therin	G	Y	L	C	K	M	A	C
Ghilanthen	E	V	R	C	R	V	Y	C
Antistasin I	G	V	R	C	R	I	H	C
Antistasin II	D	I	N	C	R	K	T	C
Hirustasin	E	V	H	C	R	I	R	C
Hydra Antistasin	K	I	Q	C	R	M	F	C
Guamerin	A	I	R	C	M	I	F	C
Guamerin II	Q	I	R	C	M	I	F	C

**Table 3 :** Comparison of inhibitory constants (Ki).

Enzymes	Tessulin	Therin	Guamerin	Guamerin II	Hirustasin	Antistasin
Chymotrypsin	150pM	φ	φ	48.7 nM	6.4 nM	φ
Trypsin	1 pM	0.6 pM	φ	φ	7.0 nM	5 nM
Cathepsin G	φ	φ	N.D.	N.D.	2.9 nM	N.D.
Plasmin	N.D.	φ	N.D.	N.D.	38 nM	N.D.
Urokinase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	13 nM	N.D.
Elastase	φ	φ	0.81 fM	9.3 mM	φ	φ
Thrombin	φ	φ	φ	φ	φ	N.D.
Factor Xa	φ	φ	φ	φ	φ	1 nM

φ : no inhibition , N.D. : not determined.

## Résultats récents.

### LA THERINE.

Sur la base de la séquence biochimique, deux amorces nucléotidiques ont été choisies dans les régions les moins dégénérées correspondant aux partie N terminale et C terminale de la protéine (Fig.9 a), en vue d'obtenir une sonde homologue par PCR. Un produit d'amplification de 117 paires de bases à été obtenu. La séquence en acides aminés déduite de ce produit correspond parfaitement à la séquence de la thérine. Ainsi cet amplifiât de 117 paires de bases a été utilisé comme sonde spécifique pour cribler la banque d'ADNc réalisée à partir de parties antérieures de *T.tessulatum* ( $\lambda$  GT 11, CLONTECH).

Après le criblage de  $6.10^5$  bactériophages, dix clones ont été isolés. les dix inserts s'avèrent de taille identiques ( $\approx 2$  kb) (Fig.10) et ont été sous clonés dans le vecteur pKS. Actuellement ces préparations sont en cours de séquençage.

### LA CYTINE.

Sur la base de la séquence en acides aminés de la chaîne B de la cytine, une sonde oligonucléotidique antisens d'une taille de 32 bases a été synthétisée (Fig.9b). Cette sonde a été utilisée pour cribler la banque d'ADNc, ceci dans des conditions moins stringentes que celles établies avec la thérine.

Après le criblage de  $6.10^5$  bactériophages, dix clones ont été isolés. les dix inserts s'avèrent de taille identiques ( $\approx 1,2$  kb) (Fig.10) et ont été sous clonés dans le vecteur pKS. Actuellement ces préparations sont en cours de séquençage.

**a** Séquence biochimique de la thérine :

RECNPPCAF**NQDCDTTLGKFCNGYLCKMACHTGFKRDKNGCEIIEPN**

→ TRPC1 ← TRPC2

Amorces nucléotidiques :

TRPC1 : 5'-TCT-AGA-TT(T,C)-AA(T,C)-CA(A,G)-GA(T,C)-TG(T,C)-GA(T,C)-3'  
Xba I

TRPC2 : 5'-GAA-TTC-(T,C)TC-(A,G)CA-(A,T,G,C)CC-(A,G)TT-(T,C)TC-(A,G)TC-3'  
Eco RI

**b** Séquence biochimique de la chaîne B de la cytine :

LKCEWDGLVGTRGEIAKETIER

Sonde oligonucléotidique antisens :

3'-CAA-CCT-TGA-TCT-CCT-CTT-TAA CGA-TTT-CTT TG-5'

Figure 9: Choix des amorces oligonucléotidiques (a) et de la sonde oligonucléotidique (b) en fonction de la séquence en acides aminés de la thérine et de la cytine.

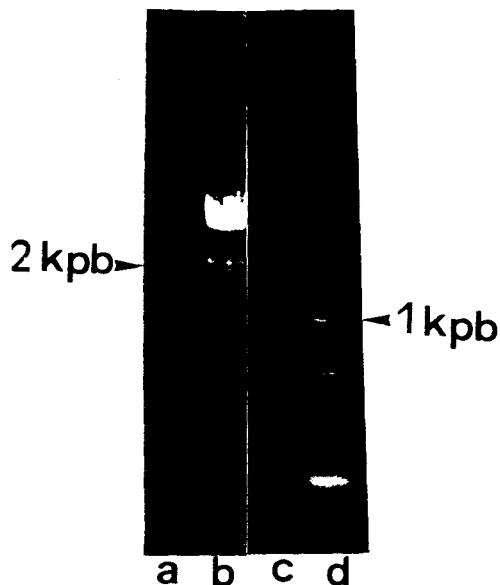


Figure 10 : électrophorèse des produits de la digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *Eco RI* de l'ADNC de l'un des clones isolés de la banque d'ADNC  $\lambda$ GT11, pour la thérine (a) et la cytine (c).

(b) : marqueur de taille  $\lambda$  *Hind III*.

(d) : marqueur de taille PCR Markers.

D'un point de vue systématique, les sangsues sont réparties dans deux ordres majeurs ; les Arhynchobdelles et les Rhynchobdelles. Ces 2 ordres comprennent des animaux hématophages qui se différencient par le fait que les Arhynchobdelles possèdent une mâchoire armée de dents avec laquelle elles incisent la peau de l'hôte et qu'elles se protègent de la coagulation du sang dans leur tube digestif en sécrétant un peptide inhibant la thrombine. Par contre les sangsues Rhynchobdelles possèdent une trompe qui s'enfonce dans les tissus de l'hôte et se protègent de la coagulation du sang par un mécanisme biochimique totalement différent : La fibrinolyse. Elles sécrètent une enzyme qui dissout le caillot sanguin en dégradant le fibrinogène telle que l'hémentine chez *H. ghiliani*. De plus la plaie résultant de la morsure par cette sangsue n'est pas associée avec un saignement prolongé comme on peut l'observer avec *H. medicinalis* (Sawyer *et al.*, 1991). Ces différences morphologiques et biochimiques suggèrent que ces deux ordres ont exploité un style de vie hématophage de façon indépendante (Sawyer., 1986). Cependant d'autres anticoagulants sont utilisés par les sangsues. C'est ainsi qu'un inhibiteur du facteur Xa nommé gilanthonè a été extrait chez la sangsue rhynchobdelle *H. ghiliani* (Brankamp *et al.*, 1990), et que chez la sangsue rhynchobdelle *T. tessulatum*, deux inhibiteurs, l'un de la thrombine et l'autre du facteur Xa, viennent d'être isolés. Ces derniers résultats montrent que le système fibrinolytique n'est pas la seule stratégie utilisée par les sangsues à trompe pour prévenir la formation du caillot sanguin. Par ailleurs, *T. tessulatum* est la première sangsue chez laquelle à la fois un inhibiteur du facteur Xa et un inhibiteur de la thrombine ont été purifiés et séquencés. Ces résultats montrent que la cible des inhibiteurs de la cascade de la coagulation des sangsues n'est pas unique, et que les inhibiteurs directs de la thrombine ne sont pas l'apanage exclusif des sangsues à mâchoires.

Avant ce travail, aucun inhibiteur de protéases n'avait été isolé chez la sangsue *T. tessulatum* car cette espèce est rare dans la nature. Nos travaux ont abouti à des résultats tout à fait originaux. La présence simultanée d'un inhibiteur de la thrombine et d'un inhibiteur du facteur Xa chez *T. tessulatum*, est une situation qui n'a été observée chez aucune autre sangsue. Ces inhibiteurs possèdent des séquences communes et sont radicalement différents de ceux de la coagulation extraits chez d'autres espèces. De plus, les inhibiteurs de sérines protéases agissant sur la matrice extracellulaire obtenus chez *T. tessulatum* sont également différents de ceux existant chez d'autres Hirudinées. Nos résultats montrent que la sangsue *T. tessulatum* a développé des molécules très actives et qui lui sont spécifiques :

- La cytine est un inhibiteur de la chymotrypsine de 7,4 kDa formé par l'association de deux chaînes protéiques (la chaîne A et la chaîne B composées respectivement de 43 et 22 acides aminés) liées par un pont disulfure. La chaîne B possède 40 à 63% de similarité de séquence avec la séquence N terminale des inhibiteurs de la subtilisine et de la chymotrypsine issus du grain d'orge, alors que la chaîne A ne possède aucune homologie avec tout autre inhibiteur connu. Cette structure en deux chaînes confère l'activité inhibitrice à la molécule, et la rupture du

pont disulfure provoque la perte de l'activité. La cytine est le premier inhibiteur de la chymotrypsine formé de 2 chaînes isolé chez les sangsues. Il diffère de l'églinc et de la geline, inhibiteurs de l'élastase et de la chymotrypsine isolés respectivement des sangsues à mâchoires *H.medicinalis* et *H. manillensis*. L'églinc et la geline ont les mêmes fonctions mais sont fondamentalement différentes par leurs propriétés physico-chimiques et leur séquence en acides aminés, ce qui suggère qu'elles n'ont pas évoluées à partir d'un gène ancestral commun. Par contre les inhibiteurs de la thrombine de ces deux sangsues sont caractérisés par 70% d'homologie (Electricwala *et al.*, 1992). La cytine pourrait donc être issue d'un gène ancestral différent de ceux codant pour les inhibiteurs de la chymotrypsine des autres sangsues.

- La thérine, inhibiteur de la trypsine de 5,4 kDa est composée de 48 acides aminés. Ses 8 résidus cystéine sont engagés dans 4 ponts disulfures. Elle n'a pas d'homologie de séquence significative avec d'autres inhibiteurs de sérine protéases. Par contre, elle possède comme l'antistasine, la ghilantène, l'hirustasine, l'hirudine, la décorsine et l'ornatine, le même motif structural que Krezel *et al.* (1994) ont appelé le motif L.A.P : Leech Antihemostatic Protein. Ce motif est le suivant : Cys-X<sub>6-12</sub>-Cys-X-Cys-X<sub>3-6</sub>-Cys-X<sub>3-6</sub>-Cys-X<sub>8-14</sub>-Cys où X<sub>n</sub> est une suite de n résidus d'acides aminés excepté le résidu cystéine. Ces protéines sont toutes issues de sangsues, elles ont en commun une action sur l'hémostase, mais leur séquence en acides aminés et leurs activités diffèrent. Ces protéines ayant en commun le motif L.A.P pourraient résulter d'une évolution divergente d'un même gène ancestral. Cependant la thérine diffère des molécules précédentes par le fait que nous ne lui avons pas trouvé jusqu'à présent d'action sur l'hémostase.

- La tessuline, inhibiteur de la trypsine de 9 kDa composé de 81 acides aminés possède une plus faible affinité envers la chymotrypsine. Contrairement aux autres inhibiteurs de protéases isolés chez la sangsue *T.tessulatum*, elle a été purifiée à partir de parties postérieures et n'est donc pas produite par les glandes salivaires. La tessuline ne possède aucune homologie de séquence significative avec les inhibiteurs isolés chez d'autres sangsues. Par contre, elle possède 57% et 51% d'homologie de séquence avec la thérostasine et la théromine, inhibiteurs respectifs du facteur Xa et de la thrombine isolés chez *T.tessulatum*.

- La thérostasine est un nouvel inhibiteur du facteur Xa. Cet inhibiteur d'une masse moléculaire de 9 kDa est composé de 82 acides aminés dont 16 résidus cystéine impliqués dans 8 ponts disulfures. L'ADNc d'une taille de 883 paires de bases comprend un cadre de lecture de 303 nucléotides précédé d'une région 5' non codante composée de 200 nucléotides, et suivi d'une région 3' non codante de 379 nucléotides. Il code pour une protéine de 101 acides aminés correspondant à la thérostasine native précédée d'un peptide signal de 19 résidus. De même que l'antistasine et la ghilantène, deux inhibiteurs du facteur Xa isolés respectivement des sangsues *H.officinalis* et *H.ghilianii*, la thérostasine inhibe faiblement la trypsine. Cependant aucune homologie de séquence n'a été observée sauf (25%) avec l'antistasine de l'hydre.

1            10            20            30            40            50            60            70            80  
Thérostasine: **D**CE**N**T**E****C**P**R**A**C**P**G**E**Y**E**F**D**E**D**G**C**N**T**C**L**C**K**G****C**ND**A****Q****C**R**I****Y**C**P**L**G****F****T****T**D**A****N****G****C****E****S****F****C****T****C****N****T****R****E****T****V****C****Q****N****V****V****C****S****G****K****R****V****C****N****P****R****S****G****R****C**

Théromine:      **E**CE**N**T**E****C**P**R**A**C**P**G**E**Y**E**F**D**E**D**G**C**N**T**C**V**C**K**G****C**D**D****A****Q****C**R**C****S**S**D****A****N****G****C****E****S****F****C****T****C****N****T****R****C****S****A****A****D****E****C****N****P****R****C****T****C****K**

Tessuline:       **M**CE**N**T**E****C**P**R**A**C**P**G**E**Y**E**F**D**E**D**G**C**N**T**C**L**C****K**E**P****C****Y****L****C****V****G****E****Y****D****F****F****E****G****G****C****N****R****L****C****K****C****G****R****A****Q****C****R****A****R****V****G****C****D****F****F****L**D**A****N****G****C****E****G****G****N****T****R****C****T****N**

Figure 11: Comparaison de la séquence en acides aminés de la thérostasine, la théromine et de la tessuline. Les acides aminés identiques sont soulignés et les résidus cystéine sont représentés en caractère gras.

L'obtention de l'ADNc a permis de transfecter des cellules CHO grâce à une collaboration avec le docteur D.PETER (Rockefeller Institute NY-USA). Sur les 13 clones obtenus, l'un semble produire la thérostasine recombinée en plus grande quantité et à donc été sélectionné. Cette molécule est actuellement en cours de purification.

- La théromine est un inhibiteur de la thrombine qui existe également chez la sangsue *T.tessulatum*. Cet inhibiteur de 7,2 kDa composé de 67 acides aminés comprend 16 résidus cystéine impliqués dans 8 ponts disulfures. Sa séquence peptidique est radicalement différente de l'hirudine. Par contre, tout comme cette dernière, son affinité vis à vis de la thrombine est très importante (12 fM vs 21 fM pour l'hirudine), et pourrait être due à une dimérisation de la molécule. Cependant, pour connaître les raisons de cette très grande affinité pour la thrombine, il est nécessaire d'avoir la théromine en quantité suffisante pour étudier ses interactions avec la thrombine.

La théromine est le premier inhibiteur de la thrombine isolé d'une sangsue à trompe. Ce résultat est particulièrement intéressant car jusqu'à présent on pensait que les antithrombotiques étaient l'apanage exclusif des sangsues à mâchoires. De plus ce travail représente la première mention d'un inhibiteur de la thrombine chez une sangsue possédant un inhibiteur du facteur Xa. Cette situation très particulière pourrait être due au fait qu'il s'agit d'une sangsue primitive (Sawyer 1986) qui aurait utilisé à la fois un antithrombotique et un inhibiteur du facteur Xa, molécules vraisemblablement présentes chez l'ancêtre commun à toutes les Hirudinées. Au cours de l'évolution, les sangsues à mâchoires auraient privilégié l'inhibition de la thrombine et les sangsues à trompe celle du facteur Xa.

Lors de notre étude nous avons montré que la thérostasine possède respectivement 61% et 57% d'homologie de séquence avec la théromine et la tessuline. Par ailleurs, la séquence en acides aminés allant du résidu cystéine en position 2 jusqu'au résidu lysine en position 28 est totalement conservée chez ces 3 inhibiteurs, de même que d'autres fragments de séquence (Fig.11). Ces inhibiteurs caractérisés par leur séquence en acides aminés similaires semblent résulter d'une évolution divergente à partir d'un gène ancestral commun et correspondent à des inhibiteurs paralogues.

En effet, deux types d'évolution divergente doivent être distingués (Fig.12). Dans le premier cas, les gènes et les protéines issus d'un gène ancestral commun évoluent séparément dans les nouvelles espèces qui se sont formées. Ces gènes et ces protéines sont dites orthologues et possèdent souvent la même fonction à l'intérieur de chaque espèce (Fitch et Margoliash, 1970). Le second type de divergence intervient après la duplication d'un de ces gènes à l'intérieur du génome d'une même espèce, ces gènes et ces protéines sont dits alors paralogues. De cette manière de larges familles de protéines peuvent être générées et les copies de ces gènes et de ces protéines sont souvent libres d'acquérir une nouvelle fonction mais apparentée à la précédente (Fitch et Margoliash, 1970). C'est ce deuxième cas de figure que l'on observe chez

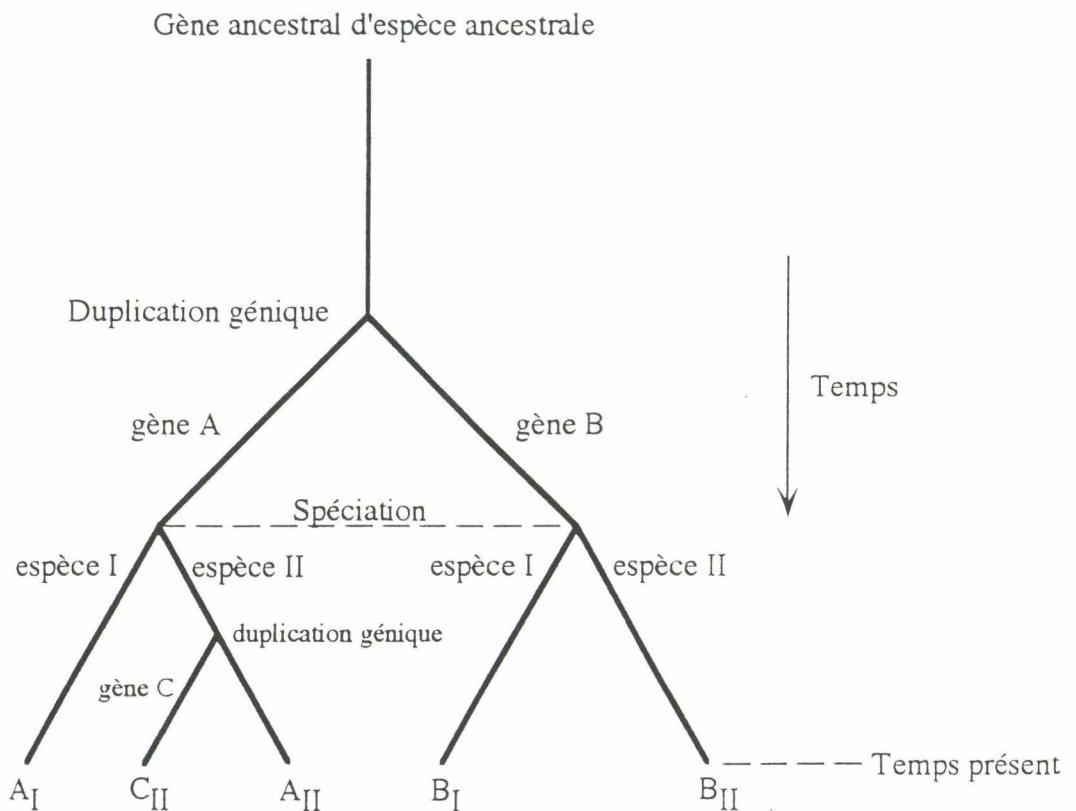


Figure 12 : Illustration de la différence entre les gènes paralogues et orthologues utilisant un hypothétique arbre phylogénétique. Après duplication du gène ancestral, deux gènes A et B sont produits et acquièrent des fonctions légèrement différentes. Plus tard, l'espèce ancestrale se sépare en deux espèces différentes I et II, et les deux gènes A et B sont retenus dans chacune des nouvelles espèces. Ensuite dans l'espèce II, le gène A se duplique pour produire un troisième gène C. Tous les gènes et les protéines sont homologues, mais seulement les deux couples A<sub>I</sub>, A<sub>II</sub>, et B<sub>I</sub>, B<sub>II</sub> sont orthologues. Tous les autres couples sont paralogues (d'après Creighton et Darby, 1989).

*T.tessulatum* avec la tessuline, la théromine et la thérostasine. Ce résultat est particulièrement intéressant puisque ce type de conservation de séquence parmi des inhibiteurs de protéases ayant chacun une spécificité différente n'a pas été observé chez d'autres espèces de sangsues.

La conservation de fragments de séquences chez ces trois inhibiteurs suggère un rôle important de ces acides aminés dans la structure de ces molécules. En effet, il est établi que les acides aminés les plus variables se retrouvent à la surface de la protéine et ne sont pas impliqués dans les interactions fonctionnelles avec d'autres molécules (Perutz et al., 1962). Par contre, les acides aminés les plus conservés sont ceux qui sont directement impliqués dans la fonction biologique de la protéine. Mais il y a aussi des contraintes structurales, et les acides aminés se trouvant à l'intérieur de la protéine et importants pour le maintien de la structure tridimensionnelle changent moins fréquemment que ceux à la surface (Perutz et al., 1962).

Cette caractéristique s'applique également aux inhibiteurs de sérine protéases isolées chez les sangsues et possédant le motif L.A.P.(Leech Antihemostatic Protein) comme la thérine, inhibiteur de la trypsine isolé chez *T.tessulatum*. En effet, ces protéines sont toutes issues de sangsues, la plupart d'entre elles interviennent dans le processus de l'hémostase, et elles ont une séquence en acides aminés, une activité et des épitopes de liaison différents. Ces inhibiteurs pourraient donc provenir d'un gène ancestral commun ayant évolué par divergence (Krezel et al., 1994).

A ce stade de notre étude, la question que l'on est en droit de se poser est : Quel est l'intérêt pour les sangsues hématophages de posséder un tel arsenal d'inhibiteurs de protéases?

Chez *H.medicinalis* le sang peut séjourner plus de 6 mois dans le tube digestif. Sa digestion est un phénomène extrêmement lent qui se produit sans l'intervention d'enzymes propres à la sangsue. Elle est assurée par des bactéries du genre *Aeromonas* dotées de propriétés protéolytiques. De plus, lorsque cette bactérie est mise en culture, elle inhibe la croissance d'autres bactéries (Büsing et al., 1953), ce qui met en évidence un rôle antibactérien à l'intérieur du tube digestif de la sangsue. Par sa présence, les réserves de sang sont protégées de la putréfaction.

Cependant d'autres molécules semblent essentielles pour assurer cette préservation du sang pendant plusieurs mois. En effet elle nécessite l'inhibition des protéases leucocytaires contenues dans le sang ingéré. La non-inhibition de ces enzymes leucocytaires pourrait conduire à une digestion prématûrée et incontrôlée consécutive à l'attaque de ces enzymes. C'est ainsi que chez *H. medicinalis*, la bdelline (inhibiteur de la trypsine) et l'églane (inhibiteur de la chymotrypsine et de l'élastase) dont les concentrations augmentent de façon significative durant les semaines suivant les repas, permettraient d'inactiver ces protéases (Roters et Zebe 1991).

Cette propriété laisse présager un rôle important de ces inhibiteurs dans la modulation de la réaction inflammatoire. Une attention particulière a été portée ces dernières années à ces substances, et il a été montré par exemple chez *H.medicinalis* que la L.D.T.I (Leech-Derived Tryptase Inhibitor) interviendrait dans le blocage de la

défense immunitaire de l'hôte initiée par les mastocytes (Sommerhoff *et al.*, 1994). De même, nous avons montré que les inhibiteurs isolés chez *T.tessulatum* sont non seulement de puissants anticoagulants, mais agissent également en conjonction pour inhiber la réaction inflammatoire. En effet, lorsque la cytine et/ou la thérine sont incubées en présence de leucocytes préalablement stimulés par les lipopolysaccharides, une diminution de l'activation de ces leucocytes est observée. Cet effet est accru lorsque la théromine est couplée à ces deux inhibiteurs de la trypsine et de la chymotrypsine. Ces différents inhibiteurs de protéases pourraient donc intervenir non seulement dans la préservation du sang ingéré mais aussi dans l'inhibition de la réaction inflammatoire.

Ces données suggèrent que ces molécules sont libérées au niveau de la plaie pour inhiber la réaction inflammatoire locale résultant de la morsure, et empêcher ainsi une arrivée massive de leucocytes dans le sang qui serait préjudiciable à sa conservation. De plus ces événements pourraient s'accompagner d'une libération d'antalgiques de type endorphines puisque ces molécules sont présentes au niveau de la ventouse et de la trompe de *T.tessulatum* (Salzet *et al.*, 1996) ainsi que d'opiacés (Stefano *et al.*, 1997a), ce qui expliquerait que les morsures de sangsues sont généralement indolores. Ces molécules « anti-douleur » stimulent également la libération du monoxyde d'azote qui joueraient un rôle antibactérien et antifongique puissant (Stefano *et al.*, 1996, 1997a, b, c).

Enfin, il faut noter que chez la sangsue *H.medicinalis*, l'église et la bdelline semblent être présentes dans la plupart des tissus et même dans le mucus recouvrant l'épiderme. De même chez *T.tessulatum* ces inhibiteurs de protéases ne sont pas uniquement localisés au niveau des glandes salivaires puisque la tessuline a été isolée à partir des parties postérieures de l'animal. Ces observations laissent supposer un rôle possible de ces inhibiteurs de protéases dans la protection de la sangsue contre les infections bactériennes ou fongiques. La présence de ces substances dans le mucus expliquerait aussi la préservation du contenu des cocons lors de la ponte (Malecha *et Vinckier*, 1983).

L'utilisation thérapeutique de ces nouvelles molécules ouvre un nouveau champ d'investigation. En effet, lors d'une lésion vasculaire, le sous-endothélium mis à nu va permettre l'adhésion et l'activation des plaquettes sanguines ainsi que l'activation de la cascade de la coagulation, permettant ainsi la formation d'un caillot sanguin capable d'obturer les brèches faites dans le vaisseau. Parallèlement, la bradikynine provenant du sous-endothélium et la thrombine résultant de l'activation de la cascade de la coagulation augmentent la perméabilité vasculaire et stimulent, de même que le thromboxane A2 libéré par les plaquettes sanguines activées, la contraction des muscles lisses. Par ailleurs, la thrombine stimule certaines molécules du complément dont le C5a, qui est un puissant facteur chimiotactique et activateur des plaquettes et des polynucléaires (Revillard, 1995). Ces différents événements vont initier l'arrivée massive des neutrophiles et des macrophages. Leur association à l'endothélium par des molécules d'adhésion de type intégrines initie l'amorçage de la phase précoce de la réaction inflammatoire (Revillard, 1995). Dans ce contexte, les propriétés inhibitrices

de la réponse immunitaire et de la coagulation des inhibiteurs de séries protéases isolés chez *T.tessulatum* correspondent à un panel d'outils médicaux supplémentaire.

Outre la théromine et la thérostatine, La sangsue *T.tessulatum* pourrait contenir d'autres inhibiteurs de la coagulation et en particulier des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire de type caline (inhibiteur de l'agrégation plaquettaire induit par le collagène, isolé chez la sangsue *H.medicinalis* ) et /ou décorsine (antagoniste de la glycoprotéine IIb /IIIa, isolé chez la sangsue *M.decora* ). En effet, lorsque l'on examine le sang qui s'écoule d'une morsure d'*H.medicinalis*, il faut 15 minutes pour que les paramètres de la coagulation et de l'agrégation plaquettaire reviennent à la normale (Munro *et al.*,1991). Néanmoins, le sang continue de couler pendant des heures. Il a été suggéré que la vasodilatation au voisinage de la morsure et la présence des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire contribuent à ce phénomène. Ces substances qui inhibent la fonction des plaquettes et qui influencent ainsi la phase initiale de l'hémostase sont également d'un grand intérêt. Ces agents agiraient comme des désintégrines, substances connues pour être très efficaces dans la prévention de la thrombose artérielle (Markwardt, 1994). Leur présence chez *T.tessulatum* est hautement probable et leur mise en évidence demanderaient des investigations complémentaires.

Les avantages thérapeutiques de l'hirudine sur l'héparine ont contribué au développement de la recherche de nouveaux anticoagulants chez les sangsues hématophages. Les études menées par différentes firmes pharmaceutiques sur les nouveaux inhibiteurs de protéases isolés chez les sangsues reflètent un enjeu économique important et les résultats obtenus avec ces molécules sont attendus avec un grand intérêt. De même, les molécules que nous avons isolées chez *T.tessulatum* ont comme nous l'espérons, un devenir non négligeable. En effet, la théromine est un nouvel inhibiteur de la thrombine caractérisé par une faible masse moléculaire, ce qui est en faveur d'une immunogénicité réduite ou absente, et par une forte affinité vis à vis de la thrombine, laissant présager une action efficace dans la lutte contre la formation des thromboses. Ces mêmes avantages caractérisent la thérostatine qui de plus, par son action inhibitrice sur le facteur Xa présenterait moins de risques hémorragiques. Quant aux inhibiteurs de la chymotrypsine et de la trypsine que nous avons isolés chez *T.tessulatum*, l'étude de leur action sur la modulation de la réponse immunitaire se poursuit et les premiers résultats obtenus sont particulièrement encourageants. La production de tous ces inhibiteurs sous forme recombinée est actuellement engagée. Il s'agit d'une étape incontournable qui nous fournira les quantités nécessaires de ces molécules pour la réalisation des différents tests permettant d'apprécier leur potentiel concurrentiel.

# I METHODES BIOCHIMIQUES.

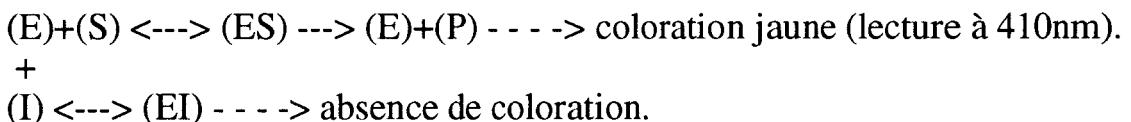
## A) PREPARATION DU MATERIEL.

Après avoir anesthésié les sangsues dans du chloréthane à 0,01%, les parties antérieures sont prélevées et congelées directement dans l'azote liquide (-180°C), puis stockées à -70°C jusqu'à leur utilisation. Des lots de 500 parties antérieures sont broyés dans 5 ml de tampon Tris/HCl 20 mM, NaCl 200 mM, pH 8,8 à l'aide d'un homogénéisateur polytron (Bioblock, Kinematica AG). L'homogénat obtenu est centrifugé pendant 15 minutes à 6000 tours/mn à 4°C (Minifuge, Heraus Christ). Après récupération du surnageant, le culot est extrait dans les mêmes conditions que précédemment. Les 2 surnageants obtenus sont ainsi regroupés, centrifugés pendant 30 mn à 12000 tours/mn à 4°C (sigma 2K15). Le surnageant clarifié est finalement filtré sur un filtre de nitrocellulose (diamètre des pores : 0,22 µm, Millipore).

## B) TESTS CHROMOGENIQUES.

### 1) L'ACTIVITE INHIBITRICE.

L'activité inhibitrice a été détectée en mesurant l'inhibition du clivage par l'enzyme du groupe p nitroaniline provenant du substrat chromogénique synthétique spécifique de l'enzyme utilisée (Fig.13).



(E) : Enzyme, (S) : substrat chromogénique, (I) : inhibiteur de l'enzyme, (P) : groupement p-nitroaniline libéré après clivage du substrat, (ES) : complexe enzyme-substrat, (EI) : complexe enzyme-inhibiteur.

Figure 13 : Représentation schématique du principe du test chromogénique (Faller et Bieth, 1991).

L'essai consiste à incuber la solution à tester avec l'enzyme dans le tampon TBS: Tris/HCl 20 mM, NaCl 200 mM, pH 8,4 pendant 5 minutes à la température du laboratoire. La réaction est déclenchée par l'addition du substrat chromogénique. Après 5 minutes d'incubation à la température du laboratoire, l'addition d'acide acétique (50%) permet d'arrêter la réaction. L'absorbance est mesurée à 410nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (MR 5000, Dynatech). Les témoins de la réaction sont réalisés en substituant la solution à tester par la solution tampon utilisée soit en présence de l'enzyme (0% d'inhibition), soit en son absence (100% d'inhibition).

## **2) DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'INHIBITION.**

Pour déterminer la spécificité des inhibiteurs, leur activité inhibitrice envers différentes séries protéases (trypsine, chymotrypsine, élastase, cathepsine G, thrombine, facteur Xa) est comparée en utilisant la méthode de l'essai chromogénique. La constante d'inhibition est déterminée selon la méthode d'Henderson simplifiée par Bieth. En bref, une concentration croissante d'inhibiteurs est associée avec l'enzyme cible dans le tampon Tris/HCl 20 mM, NaCl 200 mM, pH 8,4 pendant 30 minutes à 37°C. L'activité enzymatique restante est mesurée par l'addition du substrat chromogénique spécifique. L'absorbance est mesurée à 410nm. La constante d'inhibition est calculée en utilisant l'équation suivante :  $I/(1-a)=K_{app} \times (1/a) + P$ , où (I) et (P) sont les concentrations initiales d'inhibiteurs et d'enzymes respectivement, et (a) est l'activité enzymatique restante (100% d'activité témoin correspond à une valeur de 1).

L'unité d'activité inhibitrice est calculée comme la quantité ( $\mu\text{g}$ ) de protéases inhibées à 100%, et l'activité spécifique comme le nombre d'unité par mg d'inhibiteur de protéases (Goldstein et al., 1986).

## **C) METHODES CHROMATOGRAPHIQUES**

### **1) CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION.**

les protéines contenues dans le surnageant issue de l'extraction en tampon salin sont fractionnées en fonction de leur masse moléculaire sur une colonne de gel filtration Superdex G75 16/60 en FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia). L'élution est effectuée par le tampon Tris/HCl 20 mM NaCl 200 mM pH 8,8 à un débit de 1ml/mn. L'enregistrement est effectué en continu à une longueur d'onde de 280 nm. Les fractions obtenues sont ensuite soumises aux tests chromogéniques et analysées en électrophorèse.

### **2) CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS.**

Les fractions positives au test chromogénique sont séparées sur une colonne d'échange d'anions MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) préalablement équilibrée par le tampon A: Tris/HCl 20 mM, NaCl 200 mM, pH 8,8. L'élution des protéines est effectuée dans le même tampon à un débit de 1ml/mn. Après le passage de 5 ml de tampon A, les protéines retenues sont élues par un gradient de NaCl (0,2-1,5 M) dans le tampon B: Tris/HCl 20 mM, NaCl 1,5 M, pH 8,8. Les protéines sont détectées en sortie de colonne par leur absorbance à 280 nm, puis testées au niveau de leur activité inhibitrice et analysées en électrophorèse.

### **3) C.L.H.P (CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE).**

Les fractions positives issues de la chromatographie d'échange d'ions sont fractionnées sur une colonne de phase inverse C8 (125x4,6 mm, Lichrosphère Rp100) équilibrée avec de l'eau acidifiée par 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). L'élution est réalisée par un gradient discontinu d'acétonitrile (ACN) dans de l'eau acidifiée (0,1% de TFA) de 0-50% en 15 minutes puis de 50-80% en 10 minutes à un débit de 1ml/mn. Les protéines sont détectées en sortie de colonne à la fois par leur absorbance à 216 nm et à 280 nm. Les fractions éluées sont concentrées 20 fois à l'aide d'un évaporateur concentrateur (Speedvac, Savent) dans le but d'éliminer le solvant organique ainsi que l'acide. Les fractions ainsi obtenues sont re-suspendues dans du TBS puis soumises aux tests chromogéniques.

Les fractions contenant l'inhibiteur sont séparées sur la même colonne avec un gradient plus résolutif. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de 0-60% d'acétonitrile dans de l'eau acidifiée (0,1% de TFA) pendant 60 minutes à un débit de 1 ml/mn. Après concentration les protéines purifiées sont testées au niveau de leur activité inhibitrice. Il est à noter que pour chaque molécule, les techniques de purification, les gradients, les colonnes ont été optimisés et sont présentés dans les articles au niveau du chapitre résultats.

### **D) DOSAGE DES PROTEINES.**

La concentration des différents types d'inhibiteurs est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) à l'aide du réactif de Biorad. La méthode a été adaptée au dosage de faibles quantités de protéines en plaque Elisa : 50µl d'inhibiteurs sont placés dans 110 µl d'eau Milli Q, 40 µl de réactif de Biorad sont ajoutés à l'ensemble. La variation de l'absorbance est mesurée à 620 nm et la valeur obtenue est ensuite reportée sur la courbe étalon établie à partir d'une gamme de concentration de γ globuline (0,35µg-4,2µg). Cependant, dans certains cas la composition en acides aminés a été réalisée à l'aide d'un analyseur de type Beckman (Dr. Sautière, Institut Pasteur, Lille)..

### **E) ELECTROPHRÈSE.**

#### **1) ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE S.D.S.**

Cette électrophorèse est réalisée en milieu réducteur selon la méthode de Laemmli (1970) excepté le gel de séparation qui consiste en un gradient de polyacrylamide (10-25%).

Des gels de 0,75 mm sont utilisés. Les échantillons (34µl) sont repris par 17 µl de tampon de composition : Tris/HCl 187,5 mM, pH 6,8, SDS 6%, mercaptoéthanol 15%, bleu de bromophénol 0,03 M, sucrose 30%. Avant le dépôt , les protéines sont chauffées

1 minute au bain marie à 100°C. Les gels sont calibrés avec un mélange de protéines de masse moléculaire connue (phosphorylase B (94 kD), albumine (67 kD), ovalbumine (45 kD), anhydrase carbonique (30 kD), inhibiteur de trysine (20kD), lactalbumine (14,4kD)).

La migration se fait en 2 temps : une première migration est réalisée pendant 60 à 90 minutes à 15 mA, permettant la concentration des protéines. Elle est suivie d'une deuxième migration à un ampérage constant de 5 mA pendant 16 à 20 heures aboutissant à la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Toutes ces opérations sont effectuées en utilisant le tampon de migration : Tris /HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%.

## **2) REVELATION.**

### **A) BLEU DE COOMASSIE.**

Après migration, les protéines sont révélées par coloration du gel à l'aide du bleu de Coomassie R250 à 0,1% dans de l'isopropanol 25%, acide acétique 10% pendant 2 heures puis décolorées à l'aide de l'acide acétique (10%).

### **B) NITRATE D'ARGENT.**

Les protéines ont été révélées en utilisant la méthode de Merril (1981). La technique du nitrate d'argent est une coloration des protéines très sensible en gel de polyacrylamide permettant la détection de quantités de protéines inférieures au ng par mm<sup>2</sup>.

## **3) DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES PROTEINES EN SDS-PAGE.**

Une courbe étalon est réalisée en portant en ordonnée le logarithme de la masse moléculaire des protéines témoins en fonction de la distance de migration. Le report de la distance de migration d'une protéine analysée sur la courbe donne ainsi la valeur de la masse moléculaire apparente.

## **4) ELECTROPHORESE CAPILLAIRE.**

La pureté du peptide est controlée par une séparation sur une électrophorèse capillaire de type 270 A-HT (Applied Biosystem) ou PACE 5000 (Beckman). Un capillaire de silice (72 cm de long) est utilisé. Dans ces conditions la séparation est effectuée de l'anode à la cathode dans un tampon citrate (20 mM) à pH 2,5. La détection est réalisée à 200 nm à une température de 30°C et le volume injecté est de 2 nl.

## F) CARACTERISATION BIOCHIMIQUE

### 1) COMPOSITION EN ACIDES AMINES.

La détermination de la composition en acides aminés a été réalisée après une hydrolyse acide effectuée dans un tube scellé soudés vide à 110°C, pendant 24 heures dans l'HCl 6 N. L'ajout du phénol à 1% permet d'éviter une dégradation excessive de la tyrosine. L'analyse d'acides aminés a été effectuée sur un analyseur de type Beckman 6300. Ce travail a été réalisé par le Dr Sautière (Institut Pasteur, Lille).

### 2) RÉDUCTION ET PYRIDYLÉTHYLATION.

le but est de réduire et d'alkyler les cystéines à l'aide de la 4 vinyl-pyridine en vue du microsequençage.

Cinq microlitres de l'inhibiteur (*ca.* 100 pmol) sont ajoutés à 40 µl de milieu réactionnel contenant 1,43 g de chlorure de guanidine 6 M, 1,25 ml de Tris/HCl 1M pH 7,5 et 10 µl EDTA 0,4 M. 2 microlitres de dithiotréitol 2 M sont ajoutés à l'ensemble qui est ensuite placé au bain marie à 45°C pendant 60 minutes à l'obscurité. Ensuite, 2 µl de 4 vinyl-pyridine sont ajoutés sous azote et l'ensemble est placé au bain marie pendant 10 minutes à 45°C à l'obscurité. La réaction est arrêtée par addition de 150 µl d'ACN contenant du TFA à 0,1%. Le mélange est ensuite fractionné en CLHP sur une colonne de phase inverse C8 (125x4,6mm, lichrosphère Rp100) équilibrée avec de l'eau acidifiée (0,1% de TFA). L'élution est réalisée par un gradient linéaire de 0-60% d'acetonitrile dans de l'eau acidifiée (0,1% de TFA) pendant 60 minutes à un débit de 1 ml/mn.

### 3) MICROSEQUENÇAGE.

La dégradation automatique d'Edman de l'inhibiteur et la détection des dérivés phénylthiohydantoïne (PTH-Xaa) ont été réalisées à l'aide d'un séquenceur automatique en phase liquide, soit Beckman LF 3200, ou soit Applied Biosystem 473A (Dr. P. Bulet, IBMC, UPR 9022 CNRS, Strasbourg).

### 4) DIGESTION ENZYMATIQUE

Les inhibiteurs sont incubés avec différentes enzymes en vue de réaliser une cartographie peptidique de l'inhibiteur considéré :

- la protéase V8 *Staphylococcus aureus* (Boehringer) avec un rapport enzyme/substrat de 50% (poids/poids) dans le tampon NH<sub>4</sub>OAc pH 7,8 pendant 16 heures à 25°C. Cette protéase clive la liaison peptidique du côté C terminal d'un résidu acide glutamique.

- la trypsine (Boehringer) avec un rapport enzyme/substrat de 25% dans le tampon Tris/HCl 100 mM pH 8,5 pendant 17 heures à 37°C. Cette enzyme clive la liaison peptidique du côté C terminal d'un résidu lysine ou arginine (uniquement si l'acide aminé suivant n'est pas une proline).

La digestion enzymatique est arrêtée par l'addition d'eau acidifiée (0,1% TFA). Le mélange peptidique issu de la digestion enzymatique est fractionné en CLHP sur une colonne de phase inverse C18 (250x4,6mm, Beckman) équilibrée préalablement avec de l'eau acidifiée (0,1% TFA). L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient linéaire ACN (0-90%) dans de l'eau acidifiée (0,1% TFA) pendant 90 minutes à un débit de 1ml/mn. Les fragments peptidiques ainsi purifiés sont ensuite analysés en spectrométrie de masse avant d'être séquencés.

### **5) SPECTROMETRIE DE MASSE**

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le service de Spectrométrie de Masse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, dirigé par le Dr. Alain Van Dorsselaer.

L'échantillon protéique est dilué dans un solvant organique. Le mélange est ensuite cristallisé par séchage, puis soumis à l'énergie du laser. Au point d'impact, la température atteint quelques milliers de degrés induisant un microplasma qui contient la molécule sous différents états d'ionisation. Le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) est mesuré par le temps de vol (MALDI-TOF-MS).

## **II METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.**

Une annexe avec l'ensemble des tampons est présentée à la fin de ce chapitre.

### **A) EXTRACTION DES ARN TOTAUX.**

#### **1) PRECAUTIONS INDISPENSABLES.**

Pour éliminer toutes les traces potentielles de ribonucléases, les solutions et les récipients subissent un traitement approprié :

-Les solutions sont réalisées à partir d'eau traitée au DEPC (1/1000), puis autoclavées à 120°C pendant 20 minutes.

-Les plastiques sont plongés pendant 12 heures dans une solution d'alcool 100% contenant 0,1% de DEPC, puis autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

-La verrerie est placée 2 heures à 200°C.

#### **2) EXTRACTION DES ARN TOTAUX.**

La technique employée est celle modifiée de Glisin *et al.* (1974).

Les extractions sont réalisées sur des parties antérieures de sangsues *T.tessulatum* stade 2 à jeûn.

Trois cents vingt mg de parties antérieures sont placés dans un mortier en présence d'azote liquide, broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, puis

immédiatement placés dans 5 ml de tampon GT et homogénéisés à température ambiante à l'aide d'un homogénéisateur de type Dounce.

La dénaturation des protéines est obtenue par l'isothiocyanate de guanidium à forte concentration, action renforcée par le  $\beta$  mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures. De plus, l'isothiocyanate de guanidium permet d'inhiber les ribonucléases libérées lors de la lyse cellulaire.

2 g de chlorure de Césium (CsCl) sont ajoutés à 5 ml d'homogénat. Après dissolution complète, le mélange est passé à la seringue jusqu'à la perte de viscosité, puis déposé sur un coussin de CsCl 5,7 M.

Une ultracentrifugation est ensuite réalisée pendant 18 heures à 32000 tours par minutes (SW 40Ti, Beckman) à 20°C. Au cours de la centrifugation, un gradient de densité se forme, et à l'équilibre les ARN sédimentent au fond du tube et sont séparés de l'ADN et des protéines. Après la centrifugation, le culot est séché par retournement du tube sur du papier Whatman, puis repris par de l'eau DEPC. Les ARN sont ensuite mélangés à 4 volumes de chloroforme puis à un volume de butanol et centrifugés à 3000 tours par minute (JA 20, Beckman) pendant 10 minutes. La phase aqueuse est récupérée et les ARN sont précipités par l'addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol, puis placés à -80°C pendant 2 à 3 heures.

Après une centrifugation à 11000 tours par minute pendant 45 minutes à 4°C, les ARN sont repris par de l'eau traitée au DEPC.

Le dosage des ARN s'effectue à 260 nm et le degré de pureté est estimé par le rapport de la DO à 260 nm/280 nm qui doit être égal à 2 (Sambrook et al., 1989).

## B) AMPLIFICATION ENZYMATIQUE PAR LA REACTION DE PCR.

### 1) RT PCR

#### A) SYNTHESE DES ADNC.

les premiers brins d'ADNc sont synthétisés à partir d'une amorce oligo dT et de 2  $\mu$ g d'ARN totaux. La réaction s'effectue dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ l en présence de :

dNTP	50 $\mu$ M
Inhibiteur de RNase	20 unités
Transcriptase reverse (AMV-RT Promega)	5 unités
Tampon de réaction	
Tris/HCl pH 8,3	25 mM
KCl	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
DTT	5 mM

Le mélange est incubé pendant une heure à 42°C.

## **B) AMPLIFICATION ENZYMATIQUE PAR PCR.**

L'étude réalisée sur l'inhibiteur du facteur Xa a été initiée au laboratoire par le Dr. Salzet-Raveillon Béatrice et le criblage de la banque d'expression dans le laboratoire du Dr Kerckaert (U 124 INSERM, Place de Verdun, Lille).

### **Amorces**

Sur la base de la séquence biochimique, 2 amorces oligonucléotidiques ont été choisies dans les régions les moins dégénérées correspondant aux parties N terminale et C terminale de la protéine. Les séquences oligonucléotidiques de ces amorces sont indiquées ci-après :

TH1: 5' TCT AGA CCC GGG CA(A/G) GA(C/T) TG(C/T) GA(A/G) GA(A/G) AA(C/T) AC 3'.

TH2: 5' GAA TTC GAG CTC (C/T)TG CT(T/G) (A/C/G/T)GC (A/G)TC (A/G)TC (A/G) CA 3'

### **Réaction d'amplification**

La PCR est réalisée dans un volume final de 100 $\mu$ l contenant 1 $\mu$ l d'ADNc et dont le milieu d'amplification est le suivant:

dNTP	200 $\mu$ M
Amorces	250 nM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Taq polymérase	2 unités
Tampon de réaction:	
Tris/HCl pH 9	75 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 mM
Tween 20 (w/v)	0,01%

2 gouttes d'huile minérale sont ajoutées au dessus du mélange pour éviter l'évaporation. L'échantillon est d'abord dénaturé 5 minutes à 94°C, puis 40 cycles sont effectués; chaque cycle comprenant une dénaturation à 94°C, une hybridation à 47°C pendant une minute et une élongation à 72°C pendant 1 minute. En fin de réaction, une phase de 5 minutes à 72°C est réalisée, permettant ainsi d'assurer l'élongation complète des brins en cours d'élongation.

## **C) VERIFICATION DE L'AMPLIFICATION.**

Les produits d'amplification sont visualisés sur un gel d'agarose à 2% en présence de bromure d'éthidium après une migration à voltage constant dans un tampon Tris acétate (TAE) ou borate (TBE 1X).

## C) CLONAGE DES PRODUITS DE PCR.

### 1) PURIFICATION DE L'ADN D'INTERET.

La purification a lieu sur gel d'agarose 1% en TAE 1X. La bande d'agarose contenant l'ADN d'intérêt est découpée et mise dans un tube spinX (Costar, tube de 2 ml en polypropylène dans lequel est inséré un filtre en acétate de cellulose de 0,22 µm.). Ce morceau de gel est soumis à une succession de congélations-décongélations afin de casser les mailles du gel.

Après une centrifugation à 5000 g pendant 15 minutes, l'éluat obtenu est soumis à une extraction phénolique (phénol-chloroforme 1:1) suivie d'une extraction chloroformique. Après centrifugation, la phase supérieure aqueuse contenant l'ADN est récupérée. L'ADN est précipité par 1/10<sup>e</sup> de volume d'acétate de sodium 2 M et 2 volumes d'éthanol, puis précipité une nuit à -20°C.

Après une centrifugation à 15000 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C (Sigma 2K15), le culot d'ADN est lavé à l'alcool 70%, centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment, puis séché et repris par 10 µl de tampon TE (Tris/HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 1mM pH 8,3).

### 2) LIGATION DES PRODUITS DE PCR.

La ligation est réalisée à l'aide du Kit "TA cloning" (Invitrogen) utilisant le vecteur pCRT™ II linéarisé par l'action de l'enzyme EcoRI et dont une désoxythymidine a été ajoutée aux 2 extrémités 3'. Ce vecteur permet le clônage des produits d'amplification obtenus lors de la PCR puisque l'ADN polymérase utilisée ajoute une désoxyadénosine en 5' des brins synthétisés.

Le volume réactionnel adéquat comprenant l'insert est de 10 µl et comprend:

T4 DNA ligase (Promega)	4 unités Weiss
PCR™II	50 ng
Tampon de ligation	
Tris/HCl pH 7,5	10 mM
KCl	50 mM
NaCl	5 mM
BSA	0,1 mg/ml
β mercaptoéthanol	7 mM
ATP	0,1 mM
DTT	2 mM
Spermidine	1 mM

L'incubation s'effectue pendant un minimum de 4 heures à 16°C.

### **3) TRANSFORMATION BACTERIENNE.**

#### **A) BACTERIES COMPETENTES.**

La technique utilisée est la technique au chlorure de rubidium.

La transformation du plasmide est réalisée dans la souche bactérienne *E. coli* XL1 (*sup E44 hsd R17 rec A1 end A1 gyr A46 thi rel A1 lac -*).

Une colonie est incubée une nuit sous agitation dans son milieu de culture à 37°C. Un ml de cette culture est ajouté à 19 ml de milieu SOB et l'ensemble est incubé environ 4 heures sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,5 à 600 nm, puis refroidi pendant 15 minutes dans de la glace.

Six ml de cette culture sont centrifugés à 3000 tours par minute (Jouan GR 2000 SX). Le culot est repris par 6 ml de tampon TMN 0,15 M. Les cellules sont à nouveau centrifugées dans les mêmes conditions puis le culot est repris par 6 ml de tampon TFB. Les cellules sont refroidies dans la glace pendant 20 minutes avant d'être centrifugées. Le culot est repris par 300 µl de tampon TFB, laissé 3 minutes dans la glace avant l'ajout de 10 µl de DMSO. Cette suspension est laissée 10 minutes dans la glace, puis additionnée de 10µl de β mercaptoéthanol KMES, de nouveau placée 10 minutes dans la glace avant l'addition de 10 µl de DMSO. Les bactéries ainsi rendues compétentes sont aliquotées et conservées à -70°C.

#### **B) TRANSFORMATION PAR UN PLASMIDE.**

Un cinquième du mélange de ligation est ajouté à 50 µl de bactéries compétentes et l'ensemble est laissé 30 minutes dans la glace.

Deux cents µl de milieu SOB supplémenté de 10 µl de glucose 2 M est ajouté. L'incubation dure 1 heure à 37°C. Différents volumes sont ensuite étalés sur un milieu gélosé contenant les facteurs de sélection (ampicilline 50 µg/ml, X-gal 0,005%, IPTG 0,05 M).

### **4) SELECTION DES COLONIES ET VERIFICATION DU CLONAGE.**

Les colonies transformées par un plasmide recombiné apparaissent blanches car l'insertion modifie le cadre de lecture du gène lacZ et de ce fait empêche la synthèse de l'enzyme β galactosidase. Par contre, les vecteurs non recombinés permettent la synthèse de cette enzyme qui peut ainsi dégrader son substrat (X-gal) entraînant l'apparition de la couleur bleue.

Quelques colonies blanches mises en culture sont testées par la méthode dite de "Boiling" (Sambrook et al., 1989). Un ml et demi de cette culture sont centrifugés à 5000 g pendant 3 minutes. Le culot bactérien obtenu est resuspendu dans 300 µl de tampon de boiling auquel sont ajoutés 50 µl d'une solution de lysozyme (10 mg/ml de TE). L'ensemble est ensuite plongé dans de l'eau bouillante pendant 40 secondes puis centrifugé à 5000 g pendant 10 minutes. Le culot blanchâtre est retiré et le surnageant est précipité à l'aide de 60 µl d'acétate de sodium 2 M et 400 µl d'isopropanol. Après une centrifugation à 5000 g, le culot est repris par 50 µl de TE.

Cette méthode permet un isolement rapide de l'ADN plasmidique pour s'assurer de la présence des plasmides recombinés. Les plasmides sont alors testés par des digestions enzymatiques puis visualisés sur un gel d'agarose.

Si le clonage s'avère bon, une préparation plus importante de plasmides est alors effectuée.

#### D) PREPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE.

La préparation d'ADN plasmidique est réalisée à l'aide du kit "Wizard<sup>TM</sup> Maxi preps DNA purification system (Promega). Cette technique associe le principe de la lyse alcaline à la purification sur une résine affine pour le DNA.

##### Production d'un lysat éclairci.

Dix ml de culture bactérienne sont centrifugés à 10000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est repris par 3 ml d'une solution de resuspension cellulaire, puis 3 ml de solution de lyse cellulaire sont ajoutés. Lorsque la suspension cellulaire s'est éclaircie, 3 ml de solution de neutralisation sont additionnés et l'ensemble est alors centrifugé à 14000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite filtré sur laine de verre.

##### Purification plasmidique.

Dix ml de résine sont ajoutés au lysat et l'ensemble est transféré dans une colonne. Après l'application d'un vide, seul l'ADN lié à la résine restera au fond de la colonne. Après plusieurs applications répétées de la solution de lavage et du vide, 300 µl de tampon TE sont déposés dans la colonne qui est ensuite centrifugée à 12000 tours par minute (Sigma 112) pendant 2 minutes permettant ainsi d'éluer l'ADN.

#### E) SEQUENÇAGE

Le séquençage de l'ADN a été réalisé selon la technique de Sanger *et al.* (1977).à l'aide du kit <sup>T7</sup>sequencing<sup>TM</sup> (Pharmacia). Cette méthode de séquençage est basée sur la terminaison base spécifique de réactions d'extensions d'amorces qui est catalysée par l'ADN polymérase du phage T7. Quatre réactions sont menées parallèlement, chacune contenant l'amorce, la matrice, les 4 désoxyribonucléotides et un didéoxyribonucléotide différent qui termine spécifiquement l'extension.

#### F) CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADN COMPLÉMENTAIRE.

La banque d'ADNc utilisée fut réalisée en " random priming" et en "oligo dT" à partir d'ARN totaux des parties antérieures de sangsues *T.tessulatum* enrichies en cerveaux et en glandes salivaires, puis clonée en λGT 11 ( Ce travail a été réalisé par Clontech).

## **1) MARQUAGE AVEC UN RADIOISOTOPE DE SONDES DOUBLE BRINS.**

La technique utilisée est le multiamorçage au hasard ("Random priming). Vingt cinq ng de la sonde homologue d'ADNc obtenue sont dénaturés (5 minutes à 100°C) et additonnés de  $^{32}\text{P}$  α dCTP (50 µCi, 3000Ci/nmole), d'amorces nucléotidiques, de dATP, dGTP, dTTP et de polymérase (Klenow) (Rediprime DNA labelling system, Amersham). La réaction de polymérisation incorporant l'isotope radioactif s'effectue pendant 10 minutes à 37°C. Après l'arrêt de la réaction par l'addition d'EDTA 0,2 M, la sonde est purifiée par gel filtration sur une colonne "Sephadex fine G-50 Quick-spin™ column" (Boehringer). La sonde est éluee dans le tampon STE. L'activité spécifique est calculée après comptage de la radioactivité (cpm) d'un aliquot à l'aide d'un compteur β (LKB, Pharmacia).

## **2) ETALEMENT ET REPERAGE DES CLONES.**

La banque est préalablement titrée afin de connaitre la quantité de bactériophage par ml. Celui-ci est de  $2.10^7$  bactériophages par ml.

Dans un premier temps,  $6.10^5$  bactériophages répartis en différentes dilutions sont étalés. Les boites présentant des plages de lyse à confluence sont utilisées pour le transfert. Pour ce faire, une membrane de nitrocellulose 0,45µm (Schleicher et schuell) est déposée sur chaque boite et laissée 1 minute afin de permettre la fixation des phages. La membrane est ensuite dénaturée dans une solution de NaOH 0,2 N, NaCl 1,5 M pendant 2 minutes, puis neutralisée dans une solution de NaCl 1,5 M, Tris/HCl 0,5 M pH 7,5. Ensuite, la cuisson de la membrane est réalisée pendant 1 heure à 80°C permettant ainsi la fixation de l'ADN phagique.

## **3) HYBRIDATION PAR UNE SONDE DOUBLE BRINS HOMOLOGUE.**

Tout d'abord une préhybridation s'effectue dans le tampon approprié pendant 1 heure à 42°C. Ensuite la sonde est ajoutée de façon à avoir  $10^6$  cpm par membrane de  $150 \text{ cm}^2$ . La température d'hybridation est calculée en fonction de l'homologie de la sonde, du pourcentage en base G et C, et en fonction du pourcentage de formamide selon la formule suivante:  $\text{Tm} = 79,8^\circ\text{C} + (18,5 \times \log \text{Na}^+) + (58,4^\circ\text{C} \times \% \text{ G+C}) - (820/\text{pb en duplex}) - 0,5 \times \% \text{ formamide}$  (Sambrook et al., 1989).

## **4) LAVAGES.**

La membrane est lavée 5 minutes dans du SSC 2X, SDS 0,1% à température ambiante, suivie de 1 à 2 lavages pendant 5 minutes à 45°C. Dans le cas où trop de sonde resterait fixée, la stringence du lavage peut être augmentée par une élévation de la température, et une diminution de la concentration en SSC qui peut être ramenée jusqu'à 0,1X. Ensuite, les membranes sont séchées 1 heure à 80°C puis mises en autoradiographie (Biomax™ Kodak).

## **5) ISOLEMENT DES CLONES.**

Les clones potentiels répondant par un spot autoradiographique sont purifiés de la façon suivante :

la zone correspondante est carottée avec une pipette pasteur puis placée dans du LB MgSO<sub>4</sub>. Des dilutions suivies de plusieurs étalement sont réalisées. Les boîtes les plus représentatives sont transférées sur une membrane, puis ces membranes sont hybridées et mises en autoradiographie. Au minimum, 2 étapes de purification par dilution, transfert et hybridation sont souvent nécessaires afin d'obtenir des clones parfaitement isolés.

## **6) EXTRACTION DE L'ADN PHAGIQUE.**

Les plages de lyse positives sont carrottées avec une pipette pasteur et mises en adsorption à 37°C pendant 15 minutes avec 200 µl de bactéries. Ensuite, 10 ml de milieu LB MgSO<sub>4</sub> sont ajoutés et le tout est mis en agitation à 37°C. Quatre à 5 heures plus tard, la lyse des bactéries par les phages est réalisée et ce petit stock de phages ainsi constitué servira à effectuer un stock sur un plus grand volume (250ml). Dans ce cas, après la lyse, quelques gouttes de chloroforme sont ajoutées ainsi que du polyéthylène glycol 10 % final et du NaCl 0,5 M final (permettant ainsi la précipitation des phages).

Après une nuit à 4°C, l'ensemble est centrifugé 15 minutes à 800 tours par minute (JA 14, Beckman), le culot est repris par 4 ml de TMN 0,5 M, additionné de 4 ml de chloroforme et centrifugé 10 minutes à 5000 tours par minute. La phase supérieure est transvasée dans un flacon, complétée à 4,75 g avec du TMN 0,5 M puis additionnée de 3,25 g de CsCl. Après dissolution, l'ensemble est transvasé dans un tube à ultracentrifugation (Quick-seal, Beckman) et centrifugé pendant 3 heures à 63000 tours par minute à 4°C (VTI 80 Beckman).

Après récupération de la bande correspondant aux particules phagiques, 2 dialyses de 30 minutes chacune dans du STE 10X suivies de 2 dialyses de 30 minutes dans du STE 1X à température ambiante sont réalisées. La dernière se prolongera dans le même tampon une nuit à 4°C.

L'ADN phagique est ensuite incubé avec 25 µl de protéinase K (20 mg/ml), puis 75 µl de sarcosyl 20 %, pendant 1 heure à 37°C.

Après une extraction phénolique, puis au phénol chloroforme (v/v) et enfin au chloroforme, l'ADN phagique est précipité par 0,1 volume d'acétate de sodium 2 M et 2 volume d'éthanol, puis repris par du TE 1X.

Après dissolution, la concentration en ADN phagique sera déterminée par mesure de la DO à 260 nm.

## G) SOUS CLONAGE DES INSERTS.

### 1) PREPARATION DU VECTEUR.

#### A) DIGESTION ENZYMATIQUE.

Le vecteur utilisé pour le clônage est le pKS (pBluescript II KS(+-) Stratagene).

le plasmide est digéré par la même enzyme que celle utilisée pour la digestion de l'ADN phagique (EcoR I) à raison de 2 unités par microgamme de vecteur pendant 1 heure à 37°C dans le tampon adapté.

#### B) DEPHOSPHORILATION.

Le vecteur linéarisé par une enzyme de restriction est déphosphorilé par la phosphatase alcaline de crevette (SAP: Schrimp alcalin phosphatase). Dix unités de SAP sont ajoutées à 0,5 µg de vecteur dans le tampon suivant : Tris/HCl 0,5 M, EDTA 1 mM, pH 8,5. La réaction s'effectue à 37°C pendant 15 minutes. La SAP est ensuite inactivée en amenant la température de réaction à 60°C pendant 15 minutes.

### 2) PREPARATION DE L'INSERT.

L'insert à cloner (ADNc) provient du bactériophage λGT 11 qui a été clonné au niveau du site de restriction EcoRI de ce phage lors de la synthèse de la banque d'ADNc. Cet ADNc est donc digéré par EcoRI puis purifié suite à une électrophorèse en gel d'agarose 1% comme décrit en C1.

La ligation de cet ADNc dans le vecteur pKS linéarisé et déphosphorilé au niveau des extrémités 5', et la transformation bactérienne sont réalisées comme précédemment (page 45). Ensuite cet ADN sera séquencé selon la méthode de Sanger *et al.* (1989).

## **ANNEXE.**

### **TAMPONS.**

#### **Coussin de CsCl**

CsCl                    5,7 M  
EDTA pH 7,5    0,1 M

#### **GT**

isothiocyanate de guanidium    4 M  
Tris/HCl pH 7,5                    0,1 M  
 $\beta$  mercaptoéthanol                1 %

#### **Mercaptoéthanol KMES**

Mercaptoéthanol              7 M  
KMES                        100 mM

#### **STE**

Tris/HCl ph 8  
EDTA                1 mM  
NaCl               0,1 mM

#### **TAE**

Tris acétate        40 mM  
EDTA                1 mM

#### **TBE**

Tris borate        90 mM  
EDTA                2 mM

#### **TE**

Tris                10 mM  
EDTA                1 mM

#### **TMN 0,15**

Tris/HCl pH 8        20 mM  
MgSO<sub>4</sub>                10 mM  
NaCl                150 mM

TFB

KMES	10 mM
RbCl	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	45 mM
CaCl <sub>2</sub>	50 mM
Hexamine Cobalt	3 mM

Solution de préhybridation

SSPE 20X	25%
Denhardt's 50X	10%
ADN de sperme de saumon:	20 µg/ml.

Denhardt's 50X :

Ficoll :	1%
Polyvinylpyrrolidine :	1%
Serum albumin bovin :	1%

MILIEU DE CULTURE.

LB (milieu de Luria Bertani)  
par litre, à pH 7,5

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g

LB MgSO<sub>4</sub>  
par litre, à pH 7

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
MgSO <sub>4</sub>	1%

SOB. Mg

par litre, à pH 7 :

tryptone	20 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	58,4 mg
KCl	18,6 mg
MgSO <sub>4</sub> 1M	2ml

## **SOLUTIONS POUR LA PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE.**

### **Solution de resuspension.**

Tris/HCl pH 7,5	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	10 µg/ml

### **Solution de lyse.**

NaOH	0,2 M
SDS	1 %

### **Solution de neutralisation.**

Acétate de potassium pH 4,8    1,32 M

### **Solution de lavage de la colonne.**

Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	5 mM

Cette solution est diluée dans l'éthanol 100% de façon à obtenir une concentration finale en éthanol de 55%.

- Ali, N., Villarreal-Levy, G., et Schafer, A.I. (1995) The role of thrombin and thrombin inhibitors in coronary angioplasty. *CHEST*; **108**, 1409-1419.
- Auerswald, E.A., Morenweiser, R., Sommerhoff, C.P., Piechottka, G.P., Eckerskorn, C., Gürtler, L.G. et Fritz, H. (1994) Recombinant Leech-Derived Tryptase Inhibitor: construction, production, protein chemical characterization and inhibition of HIV-1 replication. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. **375**, 695-703.
- Baskova, I.P. et Nikonov, G.I. (1985) Destabilase: an enzyme of medicinal leech salivary gland secretions hydrolyzes the isopeptide bonds in stabilized fibrin. *Biokimia*. **50**, 424-431.
- Beijering, R.J.R. ten Cate, H. et ten Cate, J.W. (1996) Clinical applications of new antithrombotics agents. *Annn Hematol*. **72**, 177-183.
- Bieth, J.G. (1980) Pathophysiological interpretation of kinetics constants of protease inhibitors. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir*. **16**, 183-195.
- Blackshear, J.L. et Ebener, M.K. (1994) *Annals of internal medecine*. **121**(2), 152.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72**, 248-254.
- Brankamp, R.G., Blankenship, D.T., Sunkara, P.S. et Cardin, A.D. (1990) Amino acid sequence of ghilanthen: anticoagulant-antimetastatic principle of the south american leech *Haementeria ghilianii*. *J. Lab. Clin. Med*. **115**, 89-97.
- Büsing, K.H., Döll, W. et Freytag, K. (1953) Die bakterenflora der medizinischen blukgel. *Arch. Mikrobiol*. **19**, 52-86.
- Cannon, C.P. et Braunwald, E. (1995) Hirudin: initial results in acute myocardial infarction, unstable angina and angioplasty. *JACC* **25**, 30-37.
- Cappello, M., Bergum, P.W., Vlasuk, G.P., Furmidge, B.A., Pritchard, D.I. et Aksoy, S. (1996) Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**, 475-480.
- Cappello, M., Clyne, L.P., McPhedran, P. et Hotez, P.J. (1993) Ancylostoma factor Xa inhibitor: partial purification and its identification as a major hookworm-derived anticoagulant *in vitro*. *J. Infect. Dis*. **167**, 1474-1477.

- Cappello, M., Hawdon, J.M., Jones, B.F., Kennedy, W.P. et Hotz, P.J. (1996) *Ancylostoma caninum* and anticoagulant peptide: cloning by PCR and expression of soluble, active protein in *E.coli*. *Molecular and biochemical Parasitology*. **80**, 113-117.
- Connolly, T.M., Jacobs, J.W. et Condra, C. (1992) An inhibitor of collagen-stimulated platelet activation from the salivary glands of the *Haementeria officinalis* leech. I Identification, isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **267**, 6893-6898.
- Cornwall, J.W. et Patton, W.S. (1914) *Indian J. Med. Res.* **2**, 569.
- Creighton, T.E. et Darby, N.J. (1989) Functional evolutionnary divergence of proteolytic enzymes and their inhibitors. *T.I.B.S.* **14**, 319-324.
- Deckmyn, H., Stassen, J.M., Vreys, I., Van Houtte, E., Sawyer, R.T. et Vermylen, J. (1995) Calin from *Hirudo medicinalis*, an inhibitor of platelet adhesion to collagen, prevents platelet-rich thrombosis in hamster. *Blood*. **85**, 712-719.
- Eldor, A., Orevi, M. et Rigbi, M. (1996) The role of the leech in medicinal therapeutics. *Haemostasis*. **10**, 201-209.
- Electricwala, A., Sawyer, R.T., Powell Jones, C., et Atkinson, T. (1991) Isolation of thrombin inhibitor from *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. **2**, 83-89.
- Electricwala, A., Von Sicard, N.A.E., Sawyer, R.T. et Atkinson, T. (1992) Biochemical characterization of a pancreatic elastase inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Journal of Enzyme Inhibition*. **6**, 293-302.
- Falenga, A. et Gordon, S.G. (1985) Isolation and characterization of cancer procoagulant: a cysteine proteinase from malignant tissue. *Biochemistry*. **24**, 5558-5567.
- Faller, B. et Bieth, J.G. (1991) Kinetics of the interaction of chymotrypsin with eglin c. *Biochem.. J.* **280**, 27-32.
- Fareed, J., Walenga, J.M., Pifarre, R., Hoppensteadt, D. et Koza, M. (1991) Some objective considerations for the neutralisation of recombinant hirudins. *Haemostasis*. **21**, (Suppl 1) 64-72.
- Fitch, W.M. et Margoliash, E. (1970) *Evol. Biol.* **4**, 67-109.
- Fortkamp, E., Rieger, M., Heisterberg-Moutses, G., Schweiser, S. et Sommer, R. (1986) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a synthetic DNA for hirudin, the blood coagulation inhibitor in the leech. *DNA*. **5(6)**, 511-517.

Fradkov, A., Berezhnay, S., Barsova, E., Zavalova, L., Lukyanov, S., Baskova, I. et Sverdlov, E.D. (1996) Enzyme from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) that specifically splits endo-epsilon (-gamma-Glu)-Lys isopeptide bonds: cDNA cloning and protein primary structure. *FEBS Lett.* **390**, 145-148.

Friedrich, T., Kroger, B., Bialojan, S., Lemaire, H.G., Hoffken, H.K., Reuschenbach, P., Otte, M. et Dodt, J. (1993) A Kazal type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 16216-16222.

Fritz, H., Oppitz, K-H., Gebhardt, M., Oppitz, I., Werle, E. et Marx, R. (1969) On the presence of a trypsin-plasmin inhibitor in hirudin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 91-92.

Fritz, H. et Wunderer, G. (1983) Biochemistry and applications of aprotinin, the kallicrein inhibitor from bovin organs. *Arzneimittelforschung*. **33**, 479-494.

Gardell, S.J., Duong, T., Diehl, L.E., York, J.D., Hare, T.R., Register, R.B., Jacobs, J.W., Dixon, R.A.F. et Friedman, P.A. (1989) Isolation, characterization and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **64**, 17947-17952.

Gardell, S.J., Ramjit, D.R., Stabilito, I.I., Fujita, T., Lynch, J.J., Cuca, G.C., Jain, D., Wang, S.P., Tung, J.S. et Mark, G.E. (1991) Effective thrombolysis without marked plasminemia after bolus intravenous administration of vampire bat salivary plasminogen activator in rabbits. *Circulation*. **84**, 244-253.

Glisin, V., Crkvenjakov, R. et Byus, C. (1974) Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*. **13**, 2633.

Gorelik, E., Wiltrot, R.H., Okumara, K., Habu, S. et Herberman, R. (1982) Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumors cells in mice. *Int. J. Cancer*. **30**, 107-112.

Haendler, A., Becker, A., Jungblut, C., Kratzschmar, J., Donner, P. et Schleuning, W-D. (1996) Expression, purification and characterization of recombinant pallidipin, a novel platelet aggregation inhibitor from the hematophagous triatomine bug *Triatoma pallidipennis*. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. **7**, 183-186.

Harant, H. et Grassé, P.P. (1959) *Traité de zoologie*. **1**, 471-593. Masson et Cie, Ed., Paris.

Heim, J., Takabayashi, K., Meyhack, B., Märki, W. et Pohlig, G. (1994) C-terminal proteolytic degradation of recombinant desulfato-hirudin and its mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **226**, 341-353.

Hellmann, K. et Hawkins, R.I. (1960) An antithrombin (maculatin) and a plasminogen activator extractable from the blood sucking hemipteran, *Eutriatoma maculatus*. *Br. J. Haematol.* **12(4)**, 376-384.

Hellmann, K. et Hawkins, R.I. (1967) The action of ticks extracts on blood coagulation and fibrinolysis. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **18**, 617.

Henderson, P. (1972) A linear equation that describes the steady-state kineticks of enzymes and subcellular particles interacting with tighter bound inhibitor. *Biochem. J.* **127**, 321-333.

Henriot, J.M., Chaillot, B., Rochette, M. et Labrude, P. (1990) La sangsue *Hirudo medicinalis*: utilisations cliniques de l'animal et perspectives thérapeutiques de l'hirudine. *J. Pharm. Belg.* **45**, 207-218.

Hoffman, A., Walsmann, P., Riesener, G., Paintz, M. et Markwardt F. (1991) Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. *Pharmazie* **46**, 209-212.

Jacobs, J.W., Cupp, E.W., Sardana, M. et Friedmann, P.A. (1990) Isolation and characterization of coagulation factor Xa inhibitor from black fly salivary glands. *Thromb Haemost.* **64**, 235-238.

Joffre, F. et Rousseau, H. (1993) *Radilogie interventionnelle vasculaire*. Collection d'imagerie-radiologie, édition Masson, 76-91.

Jordan, S.P., Waxman, L., Smith, D.E. et Vlasuk, G.P. (1990) Tick anticoagulant peptide: kinetic analysis of the recombinant inhibitor with the blood coagulation factor Xa. *Biochemistry* **29**, 11095-11100.

Jung, H.I., Kim, S.I., Ha, K.S., Joe, C.O. et Kang, K.W. (1995) Isolation and characterization of Guamerin, a new human leukocyte elastase inhibitor from *Hirudo nipponia*. *J. Biol. Chem.* **70**, 13879-13884.

Jungblut, C.N., Haendler, B., Donner, P., Alagon, A., Possani, L. et Schleuning, W-D. (1995) Triabin, a potent exocite inhibitor of thrombin. *J. Biol. Chem.* **270**, 28629-28634.

Jungblut, C.N., Krätzschmar, J., Haendler, B., Alagon, A., Possani, L., Verhullen, P., Donner, P. et Schleuning, W-D. (1994). An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *triatoma pallidipennis*. *J. Biol. Chem.* **269**, 5050-5053.

- Kellen, E.M. et Rosenfeld, G. (1975) Fibrinogenolytic substance (hementerin) of Brazilian blood-sucking leeches *Haementeria lutzi*. *Haemostasis*. **4**, 51-64.
- Keller, P.M., Schultz, L.D., Condra, C., Karczewski, J. et Connolly, C. (1992) Inhibitor of collagen-stimulated platelet activation from the salivary glands of the *Haementeria officinalis* leech. II cloning of the cDNA and expression. *J. Biol. Chem.* **267**, 6899-6904.
- Keller, P.M., Waxman, L., Arnold, B.A., Schultz, L.D., Condras, C. et Connolly, T.M. (1993) Cloning of the cDNA and expression of Moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* **268**, 5454-5456.
- Kelly, A.B., Hanson, S.R., Dunwiddie, C.T. et Harder, L.A. (1992) Safe lasting interruption of arterial thrombosis by transient intravenous administration of the Tick Anticoagulant Peptide (TAP). *Circulation*. **86** (suppl I):I-411. Abstract.
- Kelly, A.B., White, D., Hanson, S.R., Harker, L.A., Vlasuk, G.P. et Dunwiddie, C.T. (1991) Lasting interruption of arterial thrombosis by inhibition of activated factor Xa. *Blood*. **78** (suppl 1) :187a. Abstract.
- Kim, D.R., Hong, S.J., Ha, K.S., Joe, C.O. et Kang, K.W. (1996) A cysteine-rich serine protease inhibitor (Guamerin II) from the non-blood sucking *Whitmania edentula*. Biochemical characterization and amino acid sequence analysis. *Journal of Enzyme Inhibition*. **10**, 81-91.
- Kim, Y.H., Hong, S.J., Kim, D.R., Kim, S.I., Ha, K-S. et Kang, KW. (1996) A new trypsin inhibitor from *Hirudo nipponia*. *Mol. Cells*. **6**, 571-576.
- Krezel, A.M., Wagner, G., Seymour-Ulmer, J. et Lazarus, R.A. (1994) Structure of the RGD protein Decorsin: conserved motif and distinct function in leech proteins that affect blood clotting. *Science*. **264**, 1944-1947.
- Laemmli, U.K. (1970) Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.
- Leroy, J., Potron, G., Samama, M., Guillain, M., Tobelem, G. et Gruel, Y. (1994) *Hémostase et thrombose*. 7-21.
- Loison, G., Findeli, A., Bernard, S., Nguyen-Juilleret, M., Marquet, M., Riehl-Bellon, N., Carvallo, D., Guerra-Santos, L., Brown, S.N., Courtney, M., Roitsch, C. et Lemoine, Y. (1988) Expression and secretion in *S.cerevisiae* of biologically active leech hirudin. *Biotechnology*. **6**, 72-77.
- Lylle, E.M., Fujita, T., Conner, M.W., Connolly, T.M., Vlasuk, G.P. et Lynch, J.J. Jr. (1995) Effects of inhibitors of factor Xa or platelet adhesion, heparin and aspirin on

platelet deposition in an atherosclerotic rabbit model of angioplastie injury. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **33**, 53-61.

Lynch, J.J. Jr., Sitko, G.R. et Mellot, M.J. (1994) Low dose maintenance conjunctive injury therapie: a comparaison of factor Xa versus thrombin inhibition. *Cardiovasc. Res.* **28**, 78-85.

Malecha, H.(1990) *Les sangsues: une nouvelle source de médicaments*. Thèse de pharmacie de l'Université de Lille II.

Malecha, J. (1979) Mise en évidence d'une action du système nerveux central sur les échanges d'eau chez l'Hirudinée Rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M). *C. R. Acad. Sci. Paris*. **288D**, 693-696.

Malecha, J. (1983) Osmoregulation in Hirudinea Rhynchobellida *Theromyzon tessulatum* (O.F.M). Experimental localization of the secretory zone of a regulation factor of water balance. *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**, 344-351.

Malecha, J., Verget-Bocquet, M. et Tramu, G. (1989) Mise en évidence et évolution , au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motiline porcine dans le ganglion supraoesophagien de la sangsue *Theromyzon tessulatum*. *Can. J. Zool.* **67**, 636-640.

Malecha, J. et Vinckier, D. (1983) Formation du cocon chez l'Hirudinée Rhynchobdelle *Piscicola geometra*. *Arch. Biol.* **94**, 183-205.

Malinconico, S.M., Katz, J.B. et Budzynski, A.K. (1984) Hementin: anticoagulant protease from the salivary gland of the leech *Haementeria ghilianii*. *J. Lab. Clin. Med.* **103**, 44-58.

Mant, M.J. et Parker, K.R. (1985) Two platelet aggregation inhibitors in Tetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in *in vivo* platelet aggregation. *Br. J. Haematol.* **48**, 601-608.

Maraganore, J.M., Chao, B., Joseph, M.L., Jablonski, J. et Ramachandran, K.L. (1989) Anticoagulant activity of synthetic hirudin peptides. *J. Biol. Chem.* **264**, 8692-8698.

Maraganore, J.M., Bourdon, P., Jablonski, J., Ramachandran, K.L. et Fenton, J.W. (1990) Designs and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitor of hirudin. *Biochemistry*. **29**, 7095-7101.

Markwardt, F. (1967) Purification and analysis of the thrombin inhibitor hirudin. *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.* **348**(11), 1381-1386.

- Markwardt, F. (1994) Coagulation inhibitors from blood sucking animals. A new line of developing antithrombotics drugs. *Pharmazie*. **49**, 313-316.
- Markwardt, F. (1994) The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thrombosis Research*. **74**, 1-23.
- Markwardt, F. et Landmann, H. (1961) *Naturwissenschaften*. **48**, 433.
- Markwardt, F. et Leberecht, E. (1959) *Naturwissenschaften*. **46**, 17.
- Markwardt, F. et Schulz, E. (1960) *Naturwissenschaften*. **47**, 43.
- Markwardt, F. Hoffmann, A. et Landmann, H. (1964) *Thrombos. Diath. Haemorrh.* **11**, 230.
- Mazur, P., Henzel, W.J., Seymour, J.L. et Lazarus, R.A. (1991) Ornatins: potent glycoproteins IIb-IIIa antagonists and platelet aggregation inhibitors from the leech *Placobdella ornata*. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1073-1082.
- Merril, C.R. (1981) Ultrasensitive stains for proteins in polyacrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*. **211**, 1437-1438.
- Munro, R., Jones, C.P. et Sawyer, R.T. (1991) Calin-a platelet adhesion inhibitor from the saliva of the medicinal leech. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. **2**, 179-184.
- Nutt, E., Gasic, T., Rodkey, J. Gasic, G.J., Jacobs, J.W., Friedman, P.A. et Simpson, E. (1988) The amino acid sequence of antistasin. *J. Biol. Chem.* **263**, 10162-10167.
- Pawlowsky, E.N. et Chodukin, N.J. (1930) *Z. Parasitenk.* **2**, 90.
- Perutz, M.F., Watson, H.C. et Kendrew, J. (1962) *J.Mol.Biol.* **57**, 1-15.
- Radzio, R. et Kück, U. (1997) Efficient synthesis of the blood coagulation inhibitor hirudin in the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 58-65.
- Revillard, P. (1995) *Immunologie*. 2<sup>e</sup> édition. De Boeck (Ed.) De Boeck Université presse. 157-167.
- Ribeiro, J.M.C. et Garcia, E.S. (1981) Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia*. **37**, 384-386.
- Riess, F.C., Löwer, C., Seelig, C., Bleese, N., Kormann, J., Müller-Berghaus, G. et Pötzsch, B. (1995) Recombinant hirudin as a new anticoagulant during cardiac

operations instead of heparin: successful for aortic valve replacement in man. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **110**, 265-267.

Rink, H., Lieser, M., Sieber, P. et Meyer, F. (1984) A large fragment approach to DNA synthesis: total synthesis of a gene for the protease inhibitor eglin C from the leech *Hirudo medicinalis* and its expression in *E.coli*. *Nucleic Acids Res.* **12**, 6369-6387.

Roose, J.P. et Van Noorden, C.J.F. (1994) Histochemistry and microscopy in rational drug design: protease inhibitors. *European microscopy and analysis. mai* **5-7**.

Roters, F-J. et Zebe, E. (1992) Protease inhibitors in the alimentary tract of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*: *in vivo* and *in vitro* studies. *Comp. Physio. B.* **162**, 85-92.

Royston, D. (1996) Preventing the inflammatory response to open-heart surgery: the role of aprotinin and other protease inhibitors. *Int. J. Card.* **53**, (Suppl). S11-S37.

Sabbatini, L. (1899) *Arch. Ital. Biol.* **31**, 37.

Salzet, M., Verget-Bocquet, M., Bulet, P. et Beauvillain, J.C. (1996) Purification, sequence analysis and cellular localization of an opioid related to the  $\alpha$  neo-endorphin from the nervous system of the rhynchobellid leech *Theromyzon tessulatum*. *J. Biol. Chem.* **271**, 13191-13196.

Samama, M.M. et Acar, J. (1993) *Traitements antithrombotiques*. Edition Masson. 199-208.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring Harbor laboratory press.

Sanger, F., Nicklen, S. et Carlson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminal inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5464.

Sawyer, R.T. (1986) Leech biology and behavior. Vol I, Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford.

Sawyer, R.T. (1991) Thrombolytics and anticoagulants from leeches. *Biotechnology*. **9**, 513-518.

Scacheri, E., Nitti, G., Valsasina, B., Orsini, G., Visco, C., Ferrera, M., Sawyer, R.T. et Sarmientos, P. (1993) Novel hirudin variants from the leech *Hirudinaria manillensis*. Amino acid sequence, cDNA cloning and genomic organization. *European Journal of Biochemistry*. **214**, 295-304.

Schaffer, L.W., Davidson, J.T., Vlasuk, G.P. et Siegl, P.K.S. (1991) Antithrombotic efficacy of recombinant Tick Anticoagulant Peptide: a potent inhibitor of coagulation factor Xa in a primate model of arterial thrombosis. *Circulation*. **84** 1741-1748

Schiele, F., Vuillemenot, A., Mouhat, T., Kieffer, Y., Angenot, T., Bernard, Y. et Bassand, J.P. (1996) Traitements antithrombiques par hirudine recombinante chez des patients ayant une thrombopénie induite par l'héparine. *Presse Med.* **25**, 757-760.

Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H-P. et Fritz, H. (1977) Isolation and characterization of a low molecular weight inhibitor (of chymotrypsin and Granulocytic elastase and cathepsin G) from leeches. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* **358**, 1105-1117.

Seymour, J.L., Hensel, W.J., Nevins, B., Stults, J.T. et Lazarus, R.A. (1990) A potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora*. *J. Biol. Chem.* **265**, 10143-10147.

Söllner, C., Mentele, R., Eckerskorn, C., Fritz, H. et Sommerhoff, C.P. (1994) Isolation and characterization of hirustasin, an antistasin type serine protease inhibitor from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *European Journal of Biochemistry*. **219**, 937-943.

Sommerhoff, C.P., Söllner, C., Mentele, R., Piechottka, G.P., Auerswald, E.A. et Fritz, H. (1994) A Kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*, characterization and sequence analysis. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. **375**, 685-694.

Stark, K.R. et James, A.A. (1995) A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental Parasitology*. **81**, 321-331.

Stefano, G.B., Scharrer, B., Bilfinger, T.V., Salzet, M. et Fritchione, G.L. (1996) A novel view of opiate tolerance. *Advances in Neuroimmunology*. **6**, 265-277.

Stefano, G.B., Salzet, B. et Salzet, M. (1997a) Leech CNS Cannabinoïd receptor is coupled to nitric oxide release: high sequence homology with mammals. *Brain research*. **753**, 219-224.

Stefano, G.B., Bilfinger, T.V., Salzet, B., Salzet, M., Verget-Bocquet, M. et Magazine, H.I.. (1997b) Anandamine or morphine stimulate saphenous vein endothelium cNOS nitric oxyde release which dow regulates LPS and IFN- $\gamma$  iNOS by inhibiting adenylate cyclase. *J. Cardiol. sous presse*.

Stone, S.R. et Hofsteenge, J. (1986) Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*. **825**, 4622-4628.

- Strube, K-H., Kröger, B., Bialojan, S., Otte, M. et Dodt, J. (1993) Isolation, sequence analysis and cloning of Haemedin. *J. Biol. Chem.* **268**, 8590-8595.
- Swadesh, J.K., Huang, I.Y. et Budzynski, A.Z. (1990) Purification and characterization of hementin, a fibrinogenolytic protease from the leech *Haementeria ghilianii*. *J. Chromat.* **502**, 359-369.
- Talbot, M. (1989) A new prospect in the treatment of thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* **15**, 293-301.
- Topol, E.J. (1996) Determinants of the use of coronary angiography and revascularization after thrombolysis for acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1198-1205.
- Tuszynski, G.P., Gasic, T. et Gasic, G.J. (1987) Isolation and characterization of Antistasin. *J. Bioll. Chem.* **262**, 9718-9723.
- Van de Werf, F. (1991) L'infarctus du myocarde et la thrombolyse. *La Recherche*. **22**, 425-433.
- Van Zanten, G.H., Connolly, T.M., Schiphorst, M.E., Graaf, S., Slootweg, P.J. et Sixma, J.J., (1995) Recombinant leech antiplatelet protein specifically blocks platelet deposition on collagen surfaces under flow conditions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **15**, 1424-1431.
- Vlasuk, G.P., Ramjit, D., Fujita, T. et Dunwiddie, C.T; (1991) Comparison of the *in vivo* anticoagulant properties of standart heparin and the hight selective factors Xa inhibitors Antistasin and Tick Anticoagulant Peptide (TAP) in a rabbit model venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* **65**, 257-262.
- Wallis, R.B. (1996) Hirudins: from leeches to man. *Semin. Thromb. Hemost.* **22**, 185-196.
- Waxman, L. et Connolly,T.M. (1993) Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*.*J. Biol. Chem.* **268**, 5445-5449.
- Waxman, L., Smith, D.E., Arcuri, K.E. et Vlasuk, G.P. (1990) Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*. **248**, 593-596.
- Weitz, J et Hirsh, J. (1993) New anticoagulant strategies. *J. Lab. Clin. Med.* **122**, 364-373.

Weydemann, U., Keup, P., Piontek, M., Strasser, A.W.M., Schweden, J., Gellissen, G. et Janowicz, Z.A. (1995) High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* authentic processing of three different preprohirudin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 377-385.

Wilkialis, J. (1970) Investigation of biology of leeches of the Glossiphoniidae family. *Zool. Pol.* **20**, 29-54.

Wilkialis, J. et Davies, R.W. (1980a) The population ecology of the leech (Hirudinidae, Glossiphoniidae) *Theromyzon tessulatum*. *Can. J. Zool.* **58**, 906-912.

Wilkialis, J. et Davies, R.W. (1980b) The reproduction biology of *Theromyzon tessulatum* (Hirudinidae, Glossiphoniidae) with comments on *Theromyzon rude*. *Can. J. Zool.* **58**, 913-916.

Wood, S. (1974) Experimental studies on the spread of cancer, with special reference to fibrinolytic agents and anticoagulants. *J. Med Caen.* **5**, 7-22.

Wulfsberg, E.A., Hoffman, D.E. et Cohen, M.M. (1994)  $\alpha 1$  antitrypsin deficiency. *JAMA*. **271**, 217-223.

