

2m11. 2968. 11

Université de Montréal

**Synthèse de peptides cycliques dérivés de BSPI-2 comme
inhibiteurs potentiels des proprotéines convertases PC1/3 et
furine.**

par

Michèle VILLEMURE

**Programme de sciences biomédicales
Faculté de médecine**

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

Décembre 2001

© **Michèle VILLEMURE, 2001**



W
4

U58

2002

V.073

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Ce mémoire intitulé:

**Synthèse de peptides cycliques dérivés de BSPI-2 comme
inhibiteurs potentiels des proprotéines convertases PC1/3 et
furine.**

présenté par:

Michèle VILLEMURE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Gaétan Thibault, Ph.D.

Président-rapporteur

Claude Lazure, Ph.D.

Directeur de recherche

Alain Fournier, Ph.D.

Membre du jury

Mémoire accepté le

RÉSUMÉ

Les proprotéines convertases (PC's) sont des protéases à sérine impliquées dans la conversion des précurseurs hormonaux en leur forme active. Le but de notre recherche était de concevoir des peptides cycliques pouvant inhiber spécifiquement deux des enzymes de cette famille, PC1/3 et furine; la première n'est présente que dans les granules de sécrétion des cellules endocriniennes, comparativement à la seconde qui est exprimée de façon ubiquiste. Les séquences peptidiques étudiées sont dérivées de la structure en boucle de 18 résidus identifiée comme étant le site actif d'un inhibiteur naturel de la subtilisine, BSPI-2, une molécule de 83 acides aminés. Les peptides, incorporant certaines mutations à des positions stratégiques dans la séquence, ont été synthétisés sur phase solide et purifiés par HPLC. Ils ont été cyclisés grâce à la formation d'un pont disulfure entre les deux résidus Cys des extrémités N et C-terminales. Tous les peptides ont ensuite été testés pour leur pouvoir inhibiteur de l'activité enzymatique de PC1/3 et furine recombinantes envers un substrat fluorescent. Les peptides I-B (P4Arg/P1Arg/P2'Lys), et I-D (P4Arg/P2Lys/P1Arg/P2'Lys), tant sous leur forme cyclique que linéaire, se sont avérés être les meilleurs candidats, avec des K_i respectivement autour de 10 et 4 μM pour la furine, et autour de 0,4 et 0,6 μM pour PC1/3. Le peptide I-D cyclique apparaît de nature compétitif, alors que son analogue linéaire semble au contraire agir selon un mécanisme non-compétitif. Selon la séquence, les autres peptides semblent présenter des modes d'action compétitifs ou mixtes. Tous les peptides sont clivés après de plus ou moins longues durées d'incubation avec les enzymes, aussi nous avons repris la synthèse des séquences I-B et I-D, mais en incorporant au site de clivage un lien méthylèneamine ($\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$) que les enzymes ne peuvent hydrolyser. Ces pseudopeptides, cyclisés, inhibent à long terme la furine, mais à des concentrations plus élevées, et n'ont aucun effet inhibiteur envers PC1/3. Ces résultats démontrent la validité de l'approche pour le développement d'inhibiteurs efficaces des convertases, possédant un certain niveau de discrimination entre PC1/3 et furine.

ABSTRACT

Proprotein convertases (PCs) are serine proteases involved in the conversion of hormone precursors into their active form. They contain a subtilisin-like catalytic domain. The aim of our research was to design small cyclic peptides that would specifically inhibit two members of this family of enzymes: PC1/3 and furin. The first one is only located in secretory vesicles of endocrine cells, while the other is ubiquitously expressed. We studied peptide sequences derived from the 18 residues loop previously identified as the active site of the Barley Serine Protease Inhibitor-2 (BSPI-2), an 83 amino acids molecule. Peptides containing mutations at strategic positions in the sequence, that is P1, P2, P4 and P2' sites, were synthesized on a solid phase and purified by HPLC. Cyclization was achieved by the introduction of a disulfide bridge between the two Cys residues of both N and C-terminal ends. The inhibiting potential of all the peptides towards recombinant PC1/3 and furin was then assayed using a fluorescent substrate. Peptides I-B (P4Arg/P1Arg/P2'Lys) and I-D (P4Arg/P2Lys/P1Arg/P2'Lys), both in their cyclic and linear form, were observed to be the most potent candidates, showing respectively K_i around 10 and 4 μM for furin, and around 0,4 and 0,6 μM for PC1/3. Peptide I-D appears to be a competitive inhibitor, while the kinetics of its linear analog seems to follow a non-competitive pattern. Depending on the sequence, other peptides show either competitive or mixed inhibition. All peptides were cleaved after variable incubation times depending on the enzyme. To avoid this problem, we synthesized the exact same peptides, but this time incorporating at the cleavage site a non scissile aminomethylene bond ($\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$). Those pseudopeptides, once in their cyclic form, were shown to inhibit furin during long incubation periods without being cleaved, but at higher concentrations than previously observed. Conversely, they are not able to inhibit PC1/3 at all. Those results show the validity of this approach in designing new PCs inhibitors that are effective and showing a certain level of discrimination between PC1/3 and furin.

MOTS CLÉS

Subtilisine; protéase; sérine; compétitif; non-compétitif; mixte; pseudopeptide; méthylèneamine.

KEY WORDS

Peptide; synthesis; cyclic; inhibitor; proprotein; convertase; PC1/3; furin; pseudopeptide; aminomethylene.

1.3 Les inhibiteurs des PCs.....	24
1.3.1 Les inhibiteurs réversibles.....	24
1.3.1.1 Les inhibiteurs compétitifs.....	26
1.3.1.2 Les inhibiteurs incompétitifs.....	29
1.3.1.3 Les inhibiteurs mixtes.....	30
1.3.1.4 Les inhibiteurs non-compétitifs.....	30
1.3.2 Les inhibiteurs irréversibles.....	30
1.3.3 Inhibiteurs endogènes des PCs.....	31
1.3.3.1 La prorégion.....	31
1.3.3.2 7B2.....	32
1.3.3.3 proSAAS.....	33
1.3.4 Les serpinés.....	34
1.3.4.1 PI8.....	35
1.3.4.2 α_1 - antitrypsine Portland.....	35
1.3.5 Les andrographolides.....	35
1.3.6 Altérations des liens peptidiques au site de clivage.....	36
1.3.6.1 Le groupement chlorométhyle.....	36
1.3.6.2 Les liens isostères.....	36
1.3.7 Inhibiteurs issus de librairies combinatoires.....	37
1.3.7.1 Spécificité de la furine de P1 à P4.....	37
1.3.7.2 Identification d'hexapeptides.....	38
1.3.7.3 Les polyarginines.....	38
1.3.8 Modifications des boucles réactives d'autres inhibiteurs connus des protéases à sérine.....	39
1.3.8.1 Troisième domaine de l'ovomucoïde.....	39
1.3.8.2 α_2 -macroglobuline.....	40
1.3.8.3 Le BSPI-2.....	40
1.4 But et définition du projet de recherche.....	42
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	43
2.1 Synthèse des peptides.....	43
2.1.1 Synthèse des peptides I-A, I-B, I-C et I-D.....	43
2.1.2 Synthèse des peptides ψ -B et ψ -D.....	46
2.1.2.1 Formation d'un acide aminé argininal.....	46
2.1.2.2 Synthèse.....	46
2.2 Purification des peptides.....	48
2.2.1 Purification des peptides bruts.....	48
2.2.1.1 Peptides I-A, I-B, I-C et I-D.....	48
2.2.1.2 Peptides ψ -B et ψ -D.....	49

2.3 Cyclisation des peptides	49
2.4 Alkylation des peptides linéaires.....	50
2.5 Analyse par spectrométrie de masse.....	50
2.5.1 Préparation des échantillons	51
2.5.2.1 Méthode "dried-droplet"	51
2.5.2.2 Échantillon élué d'un "ZipTip"	51
2.5.2.3 Méthode à la nitrocellulose.....	51
2.6 Analyse d'acides aminés.....	52
2.7 Essais enzymatiques.....	52
2.7.1 Essais avec hFurin et hSPC1.....	53
2.7.2 Essais avec mPC1/3	54
2.7.3 Essais avec hSPC7	54
2.8 Modélisation du complexe PC1/3 et de la boucle BSPI-2	54
CHAPITRE III: RÉSULTATS	56
3.1 Synthèse et purification des peptides.....	56
3.2 Cyclisation et linéarisation des peptides	58
3.3 Essais d'inhibition enzymatique.....	63
3.3.1 Résultats préliminaires	63
3.3.2 Détermination des conditions expérimentales.....	65
3.3.3 Détermination des K_i et mécanismes d'inhibition	66
3.3.4 Clivage des peptides	73
3.4 Synthèse et purification des pseudopeptides	77
3.5 Inhibition par les pseudopeptides	82
CHAPITRE IV: DISCUSSION	84
4.1 Synthèse et purification des peptides.....	84

4.2 Structure de la boucle de BSPI-2 et implication des résidus P4Arg, P2Lys et P2'Lys dans l'inhibition	89
4.3 Effet de la cyclisation des peptides et accessibilité du site actif de l'enzyme	93
4.4 Inhibition par les pseudopeptides	97
4.5 Validité de l'approche expérimentale	98
4.6 Perspectives	99
4.6.1 Poursuite de la caractérisation des inhibiteurs	99
4.6.2 Études d'inhibition <i>in vivo</i>	100
4.6.3 Modélisation moléculaire et préparation de nouveaux inhibiteurs	101
4.7 Conclusion.....	105
BIBLIOGRAPHIE.....	106
ANNEXE 1	xviii
« Characterization of ostrich (<i>Struthio camelus</i>) β -microseminoprotein (MSP): identification of homologous sequences in EST databases and analysis of their evolution during speciation »	xviii

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure 1:	Maturation de la proinsuline.....	2
Figure 2:	Comparaison des éléments structuraux des proprotéines convertases de mammifères, de la subtilisine BPN' et de la kexine de levure.....	6
Figure 3:	a) Représentation schématique de la liaison d'un substrat/inhibiteur au site actif d'une protéase à sérine de type subtilisine; b) Représentation schématique de la cavité catalytique de la furine.....	10
Figure 4 :	Maturation post-traductionnelle de PC1/3.....	18
Figure 5 :	Activation de PC1/3 mesurée par fluorimétrie dans différentes conditions.....	19
Figure 6:	Maturation de la POMC par PC1/3 et PC 2.....	22
Figure 7 :	Représentations schématiques et équations des mécanismes d'inhibition réversibles.....	25
Figure 8 :	Représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden des modes d'inhibition réversibles.....	27-28
Figure 9:	Structure tridimensionnelle de BSPI-2 et de sa boucle réactive.....	41

Chapitre II

Figure 10 :	Schéma de synthèse du peptide I-A en chimie Fmoc.....	44
-------------	---	----

Chapitre III

Figure 11:	Séquence en acides aminés des peptides synthétisés.....	57
Figure 12:	Spectre de masse des peptides purifiés.....	59
Figure 13:	Superposition des spectres de masse des formes cyclique et linéaire du peptide I-A.....	61
Figure 14:	Profils d'HPLC des formes cyclique et linéaire du peptide I-A.....	62
Figure 15:	Résultats préliminaires d'inhibition de furine et de PC1/3.....	64
Figure 16:	Détermination de la constante et du mécanisme d'inhibition du peptide I-D cyclique envers la furine à l'aide des représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden.....	67
Figure 17:	Détermination de la constante et du mécanisme d'inhibition du peptide I-D linéaire envers la furine à l'aide des représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden.....	68
Figure 18:	Détermination de la constante et du mécanisme d'inhibition du peptide I-D cyclique envers PC1/3 à l'aide des représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden.....	69
Figure 19:	Détermination de la constante et du mécanisme d'inhibition du peptide I-D linéaire envers PC1/3 à l'aide des représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden.....	70
Figure 20 :	Variation des courbes d'inhibition de PC1/3 par différentes concentrations du peptide I-B linéaire et de 100 μ M de substrat pERTKR-MCA.....	74
Figure 21 :	Spectres de masse des échantillons peptidiques clivés par la furine.....	75-76
Figure 22:	Schéma réactionnel de la synthèse de l'argininal et de la formation du lien isostère.....	78
Figure 23:	Spectre RMN du composé BOC-(Z) ₂ -Arg-N(Me)OMe synthétisé.....	79

Figure 24:	Spectres de masse des pseudopeptides synthétisés.....	81
Figure 25:	Inhibition de PC1/3 et de furine par les pseudopeptides cycliques.....	83
 Chapitre IV		
Figure 26:	Aminal cyclique résultant de la réduction du BOC-Arg(Tos)-N(Me)Ome.....	86
Figure 27:	a) Modélisation du site actif de la furine; b et c) Étude de dynamique moléculaire par minimisation des structures.....	92
Figure 28:	Modélisation de la boucle BSPI-2 insérée dans le site actif de PC1/3.....	102
Figure 29:	Modélisation de la boucle de BSPI-2 et des interactions qui maintiennent son intégrité structurelle.....	103

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau I : Précurseurs des protéines virales et bactériennes maturés par la furine.....	16
--	----

Chapitre III

Tableau II : Analyse des acides aminés des peptides cycliques (C) et linéaires (L), en comparaison avec les résultats attendus.....	60
---	----

Tableau III : Comparaison des constantes et mécanismes d'inhibition des peptides envers la furine, déterminés à partir des représentations de Dixon et de Cornish-Bowden.....	71
---	----

Tableau IV : Comparaison des indices IC_{50} d'inhibition des peptides envers PC 1/3.....	71
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH:	Hormone adénocorticotrope
α 1-AT:	α 1-antitrypsine
α 1-PDX:	α 1-antitrypsine Portland
α 1-PIT:	α 1-antitrypsine Pittsburgh
ACN:	acétonitrile
AMC:	7-amino-4-méthylcoumarine
β et γ -LPH:	β et γ -lipotropine
BCRD:	before cysteine rich domain
β -MSH:	hormone de stimulation des mélanocytes β
BOC:	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
BOP:	hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl- oxy-tris-(diméthylamino)- phosphonium
BSPI-2:	barley serine proteinase inhibitor-2
Bzl:	benzyle
CCM:	chromatographie en couche mince
2Cl-Z:	2-chlorobenzoyloxycarbonyle
CI-2:	chymotrypsin inhibitor-2
CK-II:	caséine kinase II
CT peptide:	peptide C-terminal de 7B2
DCM:	dichlorométhane
DIEA:	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF:	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO:	diméthylsulfoxyde
E:	enzyme
Fmoc:	9-fluorènylméthoxycarbonyle
HBTU:	hexafluorophosphate de 2-(1H- benzotriazol-1-yl)- 1,1,3,3-tétraméthyluronium
HOBt:	1-hydroxybenzotriazole monohydraté
I:	inhibiteur
IC50:	concentration inhibitrice 50
Ki:	constante d'inhibition
Km:	constante de Michaelis-Menten
LPC:	lymphoma proprotein convertase
MALDI-TOF:	matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
MMP-1:	métalloprotéinase de la matrice membranaire de type 1

OMTKY3:	troisième domaine de l'ovomucoïde de dinde
PACE:	paired amino acid converting enzyme
Pbf:	2,2,5,7,8-pentaméthylchromane-6-sulfonyle
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne
PCs:	proprotéines convertases
pERTKR-MCA:	pyrGlu-Arg-Thr-Lys-Arg-4-méthylcoumarin-1-amide
PI8:	protease inhibitor 8
pMeBzl:	para-méthylbenzyle
POMC:	proopiomélanocortine
PP2A:	protéine phosphatase 2A
proCCK:	procholécystokinine
proMCH:	prohormone de concentration de la mélanine
pro-MIS:	pro Mullerian inhibitor substance
proPTH:	prohormone parathyroïde
pro-SK:	pro substance K
proTRH:	prohormone de libération de la thyrotropine
PTP μ :	protéine tyrosine phosphatase μ
RE(R):	réticulum endoplasmique (rugueux)
Rf:	distance parcourue par la substance
	<hr/>
	distance parcourue par le solvant
RMN:	résonance magnétique nucléaire
RP-HPLC:	chromatographie liquide haute performance sur phase inverse
S:	substrat
S1P:	site-1 protease
SKI:	subtilisin kexin isozyme
SPCs:	proprotéines convertases reliées aux subtilisines
ST3:	stromélysine-3
tBu:	<i>tert</i> -butyle
TFA:	acide trifluoroacétique
TGF- β :	transforming growth factor β
TGN:	réseau trans-golgien
tr:	temps de rétention
Tos:	tosyle
Trt:	trityle
Z:	benzyloxycarbonyle

À ma Famille

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier avant tout mon directeur de maîtrise, le Dr Claude Lazure, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, d'abord comme stagiaire d'été puis comme étudiante à la maîtrise. Merci d'avoir eu confiance en mes capacités et mon intérêt, et de m'avoir toujours conseillée, aidée et soutenue dans mon projet.

Merci aux autres membres du laboratoire, Dany Gauthier, Nadia Rabah et Daniel Gauthier. Tout d'abord, merci à Dany de m'avoir transmis ses connaissances et ses méthodes de travail, pour sa patience et son aide précieuse dans tous les petits détails quotidiens du laboratoire, et pour la purification de PC1. Merci aussi à Nadia pour la production de PC1. Finalement, je remercie énormément tous les trois pour leur amitié, qui est allée bien au-delà des portes du labo, et qui a contribué à me faire passer deux années inoubliables.

Je remercie le Dr Alain Fournier, du Centre de recherche en santé humaine de l'INRS-Institut-Armand-Frappier, de m'avoir si généreusement accueillie dans son laboratoire pour y synthétiser et purifier mes peptides. Merci entre autres de m'avoir personnellement assistée lors des étapes de synthèse de l'argininal et du lien pseudopeptidique.

Merci à Luc Tessier, anciennement du laboratoire du Dr Fournier, qui m'a tout appris des rudiments de la synthèse en Fmoc, de l'HPLC et du MALDI-TOF, et à Myriam Létourneau pour son aide précieuse dans ce domaine. Merci également aux autres membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux et spontané.

Merci au Dr Richard Leduc et à Jean-Bernard Denault, du département de Pharmacologie de l'Université de Sherbrooke pour avoir généreusement fourni la furine BCRD. Merci également au Dr Robert Day et à Martin Fugère, du même département, pour nous avoir donné les enzymes hSPC1 et hSPC7.

Un grand merci Brian Wilkes pour les études de modélisation et toutes les discussions enrichissantes qui en ont découlé.

Merci à James Rochemont, qui m'a appris tous ses trucs pour le fonctionnement de plusieurs appareils, entre autres celui de mon précieux Varian pour l'HPLC!

Merci à Philippe Mochirian pour son aide très appréciée lors de la synthèse du dérivé diméthylhydroxamate de l'arginine et pour la spectroscopie RMN. Merci aussi à André Boutros de m'avoir assistée pour la conception des figures dans le logiciel ChemDraw.

Finalement, je voudrais remercier ma Famille, à qui j'ai dédié ce mémoire, qui constitue ma joie de vivre et mon carburant. J'ai volontairement utilisé un grand F car ce terme représente pour moi beaucoup de personnes, de ma parenté et aussi mes meilleurs amis, vous vous reconnaissez! Je vous aime tous. Par dessus tout merci à mon mari Éric, ma famille la plus proche, pour les nombreuses heures qu'il m'a consacrées à mettre au point figures et détails de mise en page. Mais bien au-delà de l'aide technique, merci d'avoir été mon inconditionnel supporteur dans cette aventure, qui a demandé quelques petits sacrifices pour nous deux... Merci de ta présence dans ma vie, je t'adore!

CHAPITRE I: INTRODUCTION

1.1 Les proprotéines convertases (PCs)

1.1.1 La découverte des précurseurs polypeptidiques

La plupart des hormones, des neuropeptides et autres peptides biologiquement actifs sont synthétisés sous forme de précurseurs de haut poids moléculaire. L'expression de l'activité biologique de ces composés nécessite une coupure endoprotéolytique, constituant un des nombreux mécanismes de régulation d'un très grand nombre de fonctions physiologiques. Les études menées sur les hormones insuline et γ -lipotropine (γ -LPH) ont été à l'origine de la découverte, en 1967, de l'existence de ces précurseurs polypeptidiques, et de l'immense recherche qui est faite depuis sur l'identification et la caractérisation des enzymes de conversion. Tout d'abord, Steiner et al. (1967) ont démontré, par des expériences de chasse isotopique suivant un marquage bref ("pulse-chase"), la présence d'un intermédiaire de haut poids moléculaire renfermant les deux chaînes A et B de l'insuline, reliées d'une part par deux ponts disulfures, et d'autre part par une chaîne C (ou C-peptide pour "connecting peptide") absente de la forme mature (figure 1). L'obtention de la séquence en acides aminés par Chance et al. (1968) a par la suite permis d'identifier la présence de paires d'acides aminés basiques aux deux sites de jonction avec la chaîne C. Presque simultanément, la purification et la caractérisation de la γ -LPH par Chrétien et Li (1967) leur permit de démontrer que cette hormone possédait une séquence identique aux 58 premiers acides aminés de la β -lipotropine (β -LPH) et que cette dernière était en fait

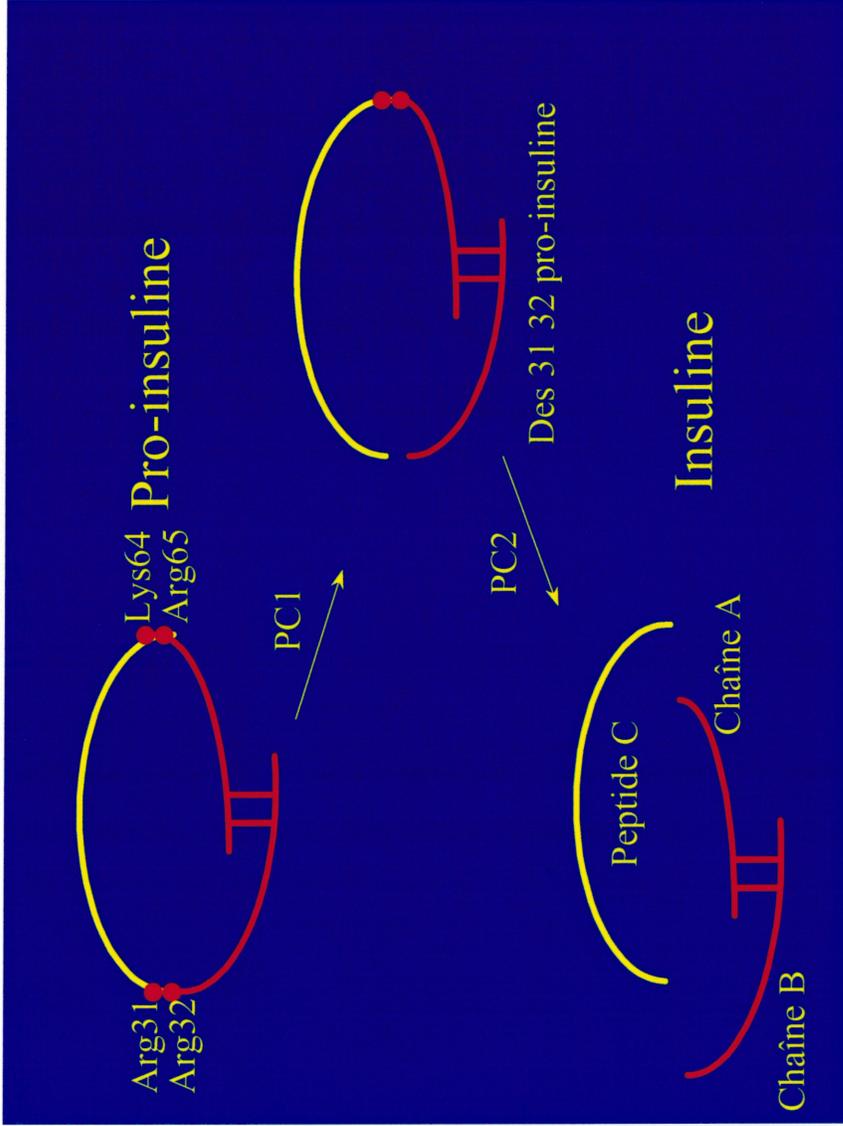


Figure 1: Maturation de la proinsuline. Cette représentation schématique montre la voie physiologique de protéolyse de la proinsuline par PC1/3 et PC2. Les cercles représentent les acides aminés basiques servant de sites de reconnaissance préférentiels pour chacune des enzymes. Le fragment intermédiaire "des 31 32 proinsuline" est produit lors de l'enlèvement des acides aminés Arg31 et Arg32 par la carboxypeptidase E, suite au clivage du lien peptidique liant ces derniers. PC2 clive ensuite la paire d'acides aminés Lys64/Arg65, et la carboxypeptidase E retire ces acides aminés pour donner l'insuline active, formée des chaînes A et B réunies par deux ponts disulfures, et le peptide C, qui sera dégradé. Il existe une voie minoritaire (non illustrée) par laquelle PC2 procède en premier lieu au clivage à son site préférentiel, ainsi PC1/3 a ensuite pour substrat l'intermédiaire "des 64 65 proinsuline".

convertie, par clivage à des paires d'acides aminés basiques, en γ -LPH et en hormone de stimulation des mélanocytes β (β -MSH).

Pour plusieurs précurseurs, les proprotéines convertases sont les enzymes responsables de ce clivage post-traductionnel, qui survient le plus souvent au niveau de paires d'acides aminés basiques: il s'agit d'une famille de protéases à sérine de type subtilisine/kexin, car leur domaine catalytique est apparenté à celui de la kexine de levure et des subtilisines bactériennes. Elles sont donc aussi appelées SPCs pour "subtilisin-related proprotein convertases". En plus des prohormones et proneuropeptides, les précurseurs ciblés par les PCs comprennent des facteurs de croissance, certaines proenzymes, des molécules d'adhésion, des toxines bactériennes et certaines glycoprotéines de l'enveloppe virale.

1.1.2 De la levure aux mammifères

La kexine (ou Kex2p) est une enzyme qui produit la forme active du facteur d'accouplement α et de la "killer toxin" chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le gène *Kex2* (pour "killer expression 2") codant pour cette enzyme a été cloné par Julius et al. (1984) au cours d'études de complémentation de souches mutantes incapables de cliver les deux précurseurs. L'analyse de la séquence primaire déduite de la kexine a démontré que son domaine catalytique était similaire à celui des subtilisines, une famille de protéases à sérine bactériennes (Mizuno et al., 1988). Ultérieurement, Roebroek et al. (1986) ont identifié la séquence du gène *fur* (pour "fes upstream region") chez les mammifères, en étudiant le promoteur du proto-oncogène *fes*. La similitude de séquence encodée par le gène *fes* et la région catalytique de la kexine fut démontrée par Fuller et al. (1989), et permit donc l'identification d'une nouvelle enzyme appelée furine (aussi appelée SPC1, ou PACE pour "paired amino acid converting enzyme").

Par la suite, les découvertes des autres enzymes de maturation des précurseurs chez les mammifères se sont enchaînées grâce à la technique de polymérisation en chaîne (PCR) utilisant des oligonucléotides dégénérés complémentaires aux séquences conservées des régions catalytiques. Seidah et al. (1990) de même que Smeekens et Steiner (1990) isolèrent d'abord l'ADN complémentaire (ADNc) de PC2, puis d'autres membres de la famille, tels PC1 (aussi appelée PC3 ou SPC3) (Seidah et al., 1991a; Smeekens et al., 1991), PACE4 (ou SPC4) (Kiefer et al., 1991), PC4 (ou SPC5) (Seidah et al., 1992; Nakayama et al., 1992), PC5 (ou PC6, ou SPC6) (Lusson et al., 1993; Nakagawa et al., 1993), et PC7 (ou PC8, SPC7, ou LPC, pour "lymphoma proprotein convertase") (Seidah et al., 1996a; Bruzzaniti et al., 1996; Meerabux et al., 1996) furent caractérisés.

1.1.3 Classification des PCs

Les subtilases, les protéases à sérine de type subtilisine dont font partie les PCs, constituent une super-famille qui a été récemment subdivisée en six familles soit Subtilisine, Thermitase, Proteinase K, Lantibiotique Peptidase, Kexine et Pyrolysine, selon l'alignement des séquences des domaines catalytiques (Siezen et Leunissen, 1997). En plus des PCs, une autre enzyme de conversion des précurseurs de type subtilase à été découverte chez les mammifères, il s'agit de SKI-1 (pour "subtilisin kexin isozyme") (Seidah et al., 1999), aussi appelée S1P (pour "site-1 protease") (Sakai et al., 1998). SKI-1/S1P est classifiée comme faisant partie de la famille Pyrolysine, et les PCs de la famille Kexine. Les membres de ces deux familles sont phylogénétiquement assez rapprochés du point de vue de la structure de leur domaine catalytique. Ils sont fort différents toutefois du point de vue des substrats qu'ils reconnaissent. Les Subtilisines, qui sont très répandues (archéobactéries, eubactéries, levures, eucaryotes), ont d'avantage de spécificité pour les sites de clivage

caractérisés par des paires ou par la présence de plusieurs acides aminés basiques, tandis que les Pyrolysines n'exigent pas un résidu basique en position P1 (Siezen et Leunissen, 1997), ayant une préférence pour les résidus non-chargés. La nomenclature des résidus environnant le site de clivage P1-P1' sur le substrat, et les résidus qui interagissent avec ces derniers sur l'enzyme a été proposée par Schechter et Berger (1967) pour désigner leurs positions relatives, sachant que P1 est le premier résidu en amont du site de clivage, et P1' le premier résidu en aval. Cette nomenclature sera celle adoptée tout au long de ce manuscrit.

1.1.4 Structure des PCs

Les différents domaines structuraux des PCs, tels que représentés schématiquement à la figure 2, sont le peptide signal, la prorégion, la région catalytique, le domaine P ou homo-B, et la partie C-terminale.

1.1.4.1 La prorégion

Le peptide signal permet à l'enzyme d'entrer dans la voie sécrétoire et est clivé par une enzyme signal peptidase suivant la translocation cotraductionnelle dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE). Ceci génère la proenzyme, un précurseur inactif de l'enzyme, ou zymogène. La prorégion, qui comprend de 83 à 90 acides aminés en N-terminal du zymogène, participerait au repliement du domaine catalytique en sa forme native à la manière d'une chaperone intramoléculaire, comme cela a été démontré d'abord chez les subtilisines (Ohta et al., 1991; Shinde et al., 1993).

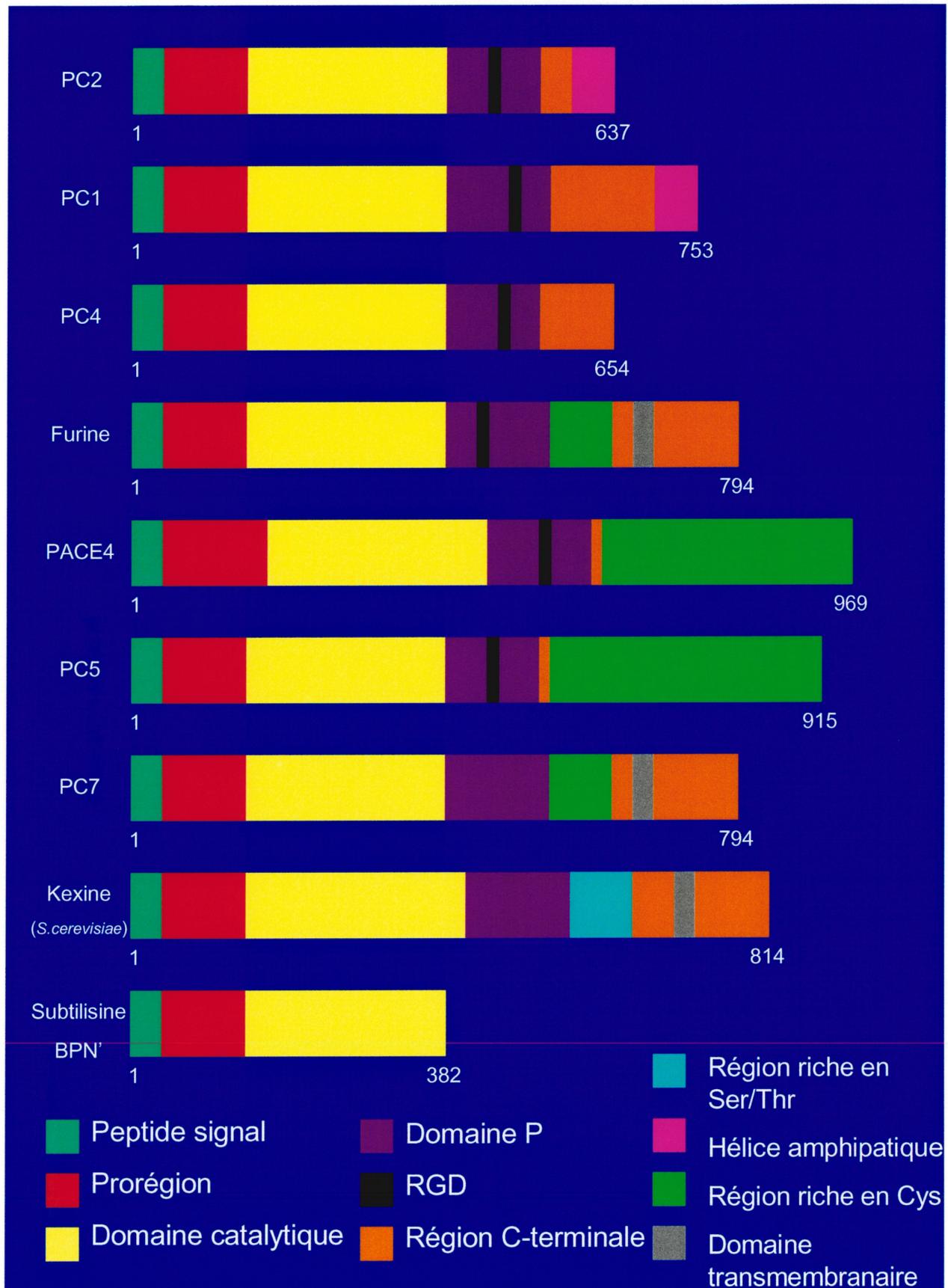


Figure 2 : Comparaison des éléments structuraux des proprotéines convertases de mammifères, de la subtilisine BPN' et de la kexine de levure.

De plus, cette prorégion interagit avec la partie exposée du site actif, constituant un inhibiteur réversible de l'activité enzymatique. De nombreuses études ont démontré, par exemple dans le cas des subtilisines, qu'il n'est pas obligatoire que la prorégion soit un inhibiteur puissant pour avoir un rôle de chaperone intramoléculaire, et inversement (Li et al., 1995). Le mécanisme d'activation des PCs comprend donc le clivage autocatalytique de la prorégion, qui devient le propeptide, à un site primaire composé d'un doublet basique de motif -Arg-X-(Lys/Arg)-Arg situé à la jonction de la prorégion et du domaine catalytique, où X représente n'importe quel acide aminé. Cette coupure a lieu au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER), à l'exception de PC2, pour laquelle la coupure survient suivant sa sortie du RE et son accumulation dans le réseau trans-Golgien (TGN) (Benjannet et al., 1992 et 1993; Shen et al., 1993; Zhou et Lindberg, 1993).

PC2 nécessite de plus l'apport d'un cofacteur spécifique pour son activation, la protéine 7B2, avec qui elle forme un complexe qui est transporté dans le TGN pour être activé selon un mécanisme possiblement intermoléculaire (Seidah et al., 1998; Benjannet et al., 1995; Matthews et al. 1994b). Il a été démontré dans le cas de la kexine (Germain et al., 1993), de la furine (Leduc et al., 1992) et de PC1/3 (Goodman et Gorman, 1994) qu'au contraire le processus est intramoléculaire. Une fois clivé, le propeptide resterait associé à l'enzyme mature dans son rôle d'autoinhibition, jusqu'à son arrivée hors du RE. La libération de l'enzyme active surviendrait alors par un changement de conformation du propeptide suite aux changements de pH et/ou à la coupure, de manière intra ou intermoléculaire, à un site secondaire du propeptide par l'enzyme. Nous discuterons davantage du rôle d'inhibition de la prorégion à la section 1.3.3.

1.1.4.2 Le domaine catalytique

Le domaine catalytique est la partie la plus conservée entre les PCs, de même qu'avec les subtilisines et la kexine (figure 2). Il comporte environ 240 acides aminés, dont les membres de la triade catalytique des protéases à sérine, c'est-à-dire Asp, His et Ser, et un résidu Asn qui joue un rôle primordial dans la stabilisation de l'intermédiaire tétrahédrique lors de la réaction enzymatique (Bryan et al., 1986). Seule PC2 ne possède pas ce résidu, qui est substitué par une Asp lui permettant de lier 7B2 (Benjannet et al., 1995). Ceci fait corrélérer le fait que PC2 soit la seule PC de la famille à ne pas posséder l'Asn nécessaire au mécanisme réactionnel d'hydrolyse, et le fait qu'elle soit aussi la seule à avoir besoin d'un cofacteur.

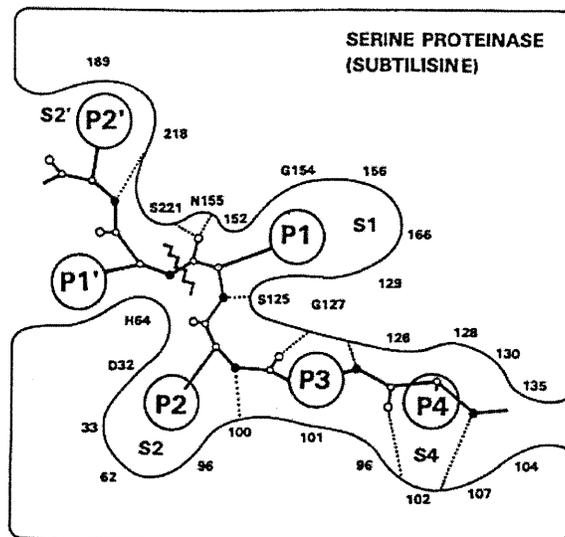
L'activité des PCs est calcium-dépendante, cependant la base structurelle de cette dépendance n'est pas bien connue. La présence de deux sites de fixation du calcium (Ca1 et Ca2) dans le domaine catalytique de la furine (Siezen et al., 1994) de même que dans celui d'autres PCs (Smeekens et al., 1992a) a été prédite par analogie avec les sites retrouvés chez d'autres protéases reliées aux subtilisines ou aux thermitases (Gros et al., 1991). Cette analogie dans la structure permettrait aussi l'analogie fonctionnelle selon laquelle, avec les concentrations de calcium physiologiques le long de la voie de sécrétion *in vivo*, le site Ca1 serait totalement occupé, tandis que le second site, Ca2, jouerait un rôle de régulateur de l'activité. Il est à noter cependant que chacune des PCs a des besoins différents en calcium, par conséquent le rôle exact de ces sites demeure inconnu. Toujours en se basant sur ces comparaisons, seulement deux ponts disulfures peuvent être prédits pour assurer la stabilisation de la structure dans le domaine catalytique (Siezen et al., 1994; Lipkind et al., 1995). La détermination des autres ponts disulfures reste à établir, considérant que le domaine catalytique des PCs comporte huit résidus Cys conservés, toutefois il a été proposé que deux de ces Cys seraient sous

forme de thiols libres, et les deux autres, deux demi-cystines (Siezen et al., 1991).

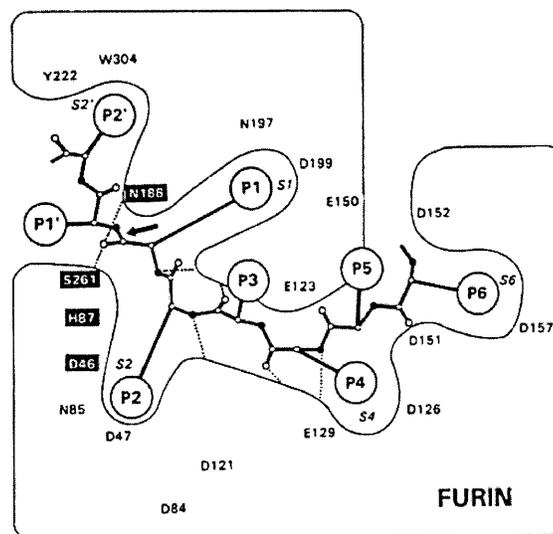
Un modèle a été présenté pour la structure tri-dimensionnelle du domaine catalytique, en se basant sur les nombreuses données cristallographiques des membres de la famille des subtilisines. Plus précisément, à partir de la structure cristalline du complexe subtilisine BPN', une sérine protéase extracellulaire provenant de *Bacillus amyloliquefaciens*, avec son inhibiteur Arg45-eglin obtenue par Heinz et al. (1991), des prédictions ont pu être faites quant aux interactions possibles entre l'enzyme et son substrat ou son inhibiteur, tel qu'illustrées à la figure 3a (Siezen et al., 1994; Siezen et Leunissen, 1997).

1.1.4.3 Le domaine P ou homo-B

Les quelques 150 acides aminés situés en C-terminal du domaine catalytique composent le domaine P, aussi appelé homo-B, qui fût d'abord identifié chez la kexine (Wilcox et Fuller, 1991) et la furine (Hatsuzawa et al., 1992), mais qui est par contre absent des subtilisines (Lipkind et al., 1998). C'est d'ailleurs ce qui lui a valu le nom de domaine P: puisque les subtilisines remplissent des fonctions dégradatives, alors que la kexine exhibe plutôt des fonctions de maturation ("processing"), ces différences fonctionnelles sont attribuées à la présence du domaine P (Fuller et al., 1991). Cette région semble nécessaire à la fois pour le repliement et le maintien de la forme native du domaine catalytique de l'enzyme, ainsi que pour la régulation de sa dépendance au calcium et à un pH acide (Zhou et al., 1998). Les PCs ont également dans le domaine P un motif RGD (Arg-Gly-Asp) conservé, à l'exception de PC7 qui possède un motif RGS (Arg-Gly-Ser). Ce motif, habituellement impliqué dans la reconnaissance par les



a



b

Figure 3: a) Représentation schématique de la liaison d'un substrat/inhibiteur au site actif d'une protéase à sérine de type subtilisine. Les chaînes latérales des résidus P2' à P4 sont représentées par de grosses sphères, tandis que les atomes du squelette peptidique sont représentés par des points noirs (azote) ou des points blancs petits (carbone) ou grands (oxygène). Les ponts hydrogènes formés entre le ligand et l'enzyme sont tracés en pointillés. Le site de clivage protéolytique est indiqué par une ligne brisée. Les résidus composant la triade catalytique (D, H et S), et le résidu N de l'oxyanion sont identifiés. La numérotation des acides aminés sur l'enzyme est celle de la subtilisine BPN'. (Adapté de Siezen et Leunissen, 1997). b) Représentation schématique de la cavité catalytique de la furine. (Tiré de Siezen et al., 1994).

intégrines, jouerait de plus un rôle dans le transport cellulaire des enzymes (Rovère et al., 1999).

1.1.4.4 Le domaine C-terminal

La région la moins conservée entre les PCs est la partie C-terminale, qui comprend divers éléments structuraux. Notamment, kexine, furine, PC7 et PC5-B possèdent un domaine transmembranaire suivi d'une queue C-terminale cytoplasmique. Cet arrangement confère à ces PCs une topologie de protéase membranaire de type I (pour revue, voir Hooper et al., 1997). PC1/3 et PC2 ont une hélice amphipathique (Seidah et al., 1991b) qui pourrait leur permettre des associations avec certains lipides (Blazquez et al., 2001); de plus leur partie C-terminale est importante pour leur entrée dans la voie de sécrétion régulée (Benjannet et al., 1993; Zhou et Lindberg, 1993), tout comme celle de PC5-A (DeBie et al., 1996). Finalement, furine, PACE4 et PC5-A et B contiennent toutes une région riche en cystéines dont la fonction reste à être déterminée.

1.2 PC1/3 et furine

Cette étude s'intéresse principalement aux proprotéines convertases PC1/3 et furine, deux membres de la famille des PCs qui, selon des observations *in vitro*, ont des spécificités enzymatiques similaires, et dont voici plus en détail les particularités.

1.2.1 La furine

1.2.1.1 Distribution tissulaire de la furine et son rôle dans le développement

Contrairement à certaines PCs telles PC1/3, PC2 et PC4, la furine est exprimée de façon ubiquiste dans une grande variété de tissus et types cellulaires, bien qu'à des niveaux variables (Schalken et al., 1987; Hatsuzawa et al., 1990; Day et al., 1993; Schafer et al., 1993; Zheng et al., 1994). Durant l'embryogénèse, son patron d'expression est très distinct de celui des autres PCs, ce qui suggère qu'elle joue un rôle critique dans la maturation des précurseurs durant le développement, entre autres celui de certains facteurs de croissance, dont ceux reliés à la famille TGF β . En effet, il a été observé que des souris dans lesquelles l'expression du gène a été abolie (souris "knock-out") commencent à présenter des défauts de croissance à d8-8,5, telle une déficience sévère au niveau de la fermeture ventrale, et meurent à d10,5-11,5 (Nakayama, 1997; Roebroek et al., 1998). Ainsi, la formation du tube cardiaque et de l'intestin primitif est empêchée par un défaut de la fusion des tissus. La rotation axiale de l'embryon est aussi déficiente, de plus il a été montré que des facteurs nécessaires à l'élaboration de ses axes d'asymétrie gauche-droite ne sont pas produits. Ces études tendent à démontrer de façon générale que le rôle de la furine durant l'embryogénèse est de promouvoir la migration et la prolifération de l'endoderme, et l'activation des signaux de développement cardiaque.

1.2.1.2 Localisation intracellulaire de la furine

À l'intérieur de la cellule, la furine est localisée dans le TGN (Molloy et al., 1994; Schafer et al., 1995). Toutefois, il a été observé qu'une certaine proportion se retrouvait à la surface cellulaire (Klimpel et al., 1992), et qu'en fait elle se déplace d'un compartiment à l'autre suivant un cycle (Molloy et al., 1994). La partie cytoplasmique comporte un motif SDSEEDE (Ser-Asp-

Ser-Glu-Glu-Asp-Glu) pouvant être phosphorylé sur les résidus Ser par la caséine kinase II (CK-II), tel que démontré par Jones et al. (1995). Ils ont proposé un modèle selon lequel l'état de phosphorylation de la queue cytoplasmique modulerait le mouvement de la furine, soit à la surface cellulaire ou à celle des endosomes lorsque phosphorylée, et dans le TGN une fois déphosphorylée par une phosphatase. Par la suite cette phosphatase a été identifiée comme la "protein phosphatase 2A" (PP2A) (Molloy et al., 1998), et le modèle a pu être confirmé (Molloy et al., 1999). À une certaine étape, l'enzyme peut subir une coupure supplémentaire en amont du domaine transmembranaire. En effet, dans le milieu des cellules qui surexpriment la furine, une forme active mais plus courte (environ 80kDa) de la furine a été observée (Vidricaire et al., 1993; Vey et al., 1994), comme quoi une forme distincte et soluble de la furine est aussi produite et sécrétée pour permettre son interaction avec des substrats extracellulaires. L'identification des acides aminés présents au site de clivage responsable du relâchement de la forme membranaire en cette forme soluble a récemment été faite (Plaimauer et al., 2001). Cependant, ce relâchement de la furine de la membrane plasmique est un phénomène controversé, considérant qu'il n'a jusqu'à présent été observé que lors d'études de surexpression. La signification biologique réelle *in vivo* demeure donc à démontrer.

1.2.1.3 Substrats de la furine

L'activité enzymatique et la spécificité de la furine envers ses substrats ont été évaluées le plus souvent par des expériences de co-expression cellulaire et des études *in vitro*. Puisque les souris nulles en furine ne sont pas viables (Roebroek et al., 1998), ces études ont pu être réalisées grâce à deux différentes lignées cellulaires incapables de produire la furine active, soit LoVo, une lignée humaine de carcinome du côlon

(Takahashi et al., 1993; 1995), et RPE.40, une lignée mutante dérivée de cellules CHO (pour Chinese-hamster ovary) (Moehring et al., 1983; Watson et al., 1991; Inocencio et al., 1993). La première lignée comporte une délétion d'un nucléotide dans l'un des allèles du gène de la furine, et la modification du cadre de lecture résulte en une enzyme tronquée dans le domaine P (Takahashi et al., 1993); l'autre allèle a une substitution Trp→Arg dans le domaine P (Takahashi et al., 1995). Les cellules de la lignée RPE.40, elles, comportent une mutation sur un des allèles de la furine causant une substitution Cys→Tyr près du résidu Asn de l'oxyanion, et l'autre allèle est muté dans un des introns, causant un défaut de l'épissage de l'ARN messenger (ARNm) (Spence et al., 1995).

Comme le patron d'expression de cette enzyme est très répandu, elle est responsable de la maturation d'une gamme de substrats très nombreux et variés, dont des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des protéines plasmatiques impliquées dans la coagulation sanguine et le système du complément, des métalloprotéases de la matrice extracellulaire, des glycoprotéines de l'enveloppe virale et des exotoxines bactériennes (pour revue, voir Nakayama, 1997).

Une représentation schématique de la cavité où a lieu l'interaction enzyme-substrat est présentée à la figure 3b. Les résidus qui composent le site de clivage des substrats ne suivent pas toujours exactement le motif - Arg-X-(Lys/Arg)-Arg, par contre les règles suivantes sont toujours respectées: 1) une Arg est essentielle en position P1; 2) au moins deux des résidus parmi les positions P2, P4 ou P6 doivent être basiques; 3) un résidu hydrophobe avec une chaîne latérale aliphatique ne peut se trouver en P1' (Takahashi et al., 1993). L'importance des résidus basiques pour la reconnaissance du substrat par l'enzyme est mise en évidence par l'abondance des acides aminés acides au site de liaison (figure 3b).

1.2.1.4 Aspects cliniques de la furine

Grâce à sa distribution tissulaire ubiquiste combinée à sa présence à la fois dans le TGN et à la surface cellulaire, la furine joue un rôle très important dans une grande variété d'événements physiologiques se déroulant à l'intérieur ou hors de la cellule. Également, elle est très bien positionnée pour participer à l'activation protéolytique de toxines bactériennes et protéines de l'enveloppe virale, dont la liste est énoncée dans le tableau I. La maturation des glycoprotéines à la surface des virus est un processus d'activation de la virulence, c'est-à-dire qu'elle permet la fusion des virus avec la membrane des cellules hôtes. Les toxines, quant à elles, sont des molécules solubles sécrétées par les bactéries pathogènes, qui interagissent avec la membrane des cellules pour changer sa perméabilité et permettre leur accès au cytoplasme. Le clivage par la furine des cellules hôtes contribue à favoriser ce processus d'insertion membranaire.

Nous avons mentionné à la section précédente que le carcinome du côlon a été identifié chez les cellules LoVo déficientes en furine. Il a aussi été démontré que la furine est impliquée dans la progression métastatique des tumeurs (Polette et Birembaut, 1998) via sa fonction de clivage de la métalloprotéinase de matrice membranaire de type 1 (MMP-1) (Maquoi et al., 1998) et de la stromélysine-3 (ST3), une autre MMP (Pei et Weiss, 1995; Santavicca et al., 1996). Récemment, Bassi et al. (2001) ont démontré que l'inhibition de l'activité enzymatique de la furine entraînait une diminution, sinon l'abolition totale, de la tumorigénicité et des propriétés métastatiques de cellules cancéreuses humaines. Cette observation serait donc en accord avec un rôle thérapeutique de l'inhibition de la furine dans le traitement des cancers.

Tableau I:
Précurseurs des protéines virales et bactériennes maturés par la furine.

Précurseurs	Références
Glycoprotéines de l'enveloppe virale	
Glycoprotéine gp160 du HIV	Hallenberger et al., 1992; Decroly et al., 1994
Glycoprotéine B du cytomégalovirus humain	Vey et al., 1995
Superantigène 7 du MMTV	Park et al., 1995
Hémagglutinine A du virus de l'influenza avine	Stieneke-Grober et al., 1992; Walker et al., 1994
Glycoprotéine de fusion F ₀ du virus de la rubéole	Watanabe et al., 1995
Glycoprotéine de fusion F ₀ du virus de la maladie de Newcastle	Moehring et al., 1993; Gotoh et al., 1992
Glycoprotéine gpE2 du virus de Sindbis	Moehring et al., 1993
Glycoprotéine de fusion F ₀ du virus parainfluenza de type 3 humain	Ortmann et al., 1994
Glycoprotéine gp72 du virus de la leucémie bovine	Zarkik et al., 1997
Exotoxines bactériennes	
Antigène protecteur de la toxine de l'anthrax	Klimpel et al., 1992; Molloy et al., 1992
Toxine de la diphtérie	Tsuneoka et al., 1993
Exotoxine A de Pseudomonas	Moehring et al., 1993
Toxine Shiga	Garred et al., 1995
Toxine proaérollysine	Abrami et al., 1998

1.2.2 PC1/3

1.2.2.1 Distribution et activation de PC1/3

Comme nous l'avons mentionné, l'expression de PC1/3 se trouve de façon prédominante au niveau des cellules neuroendocriniennes et endocriniennes, à l'intérieur desquelles elle est retrouvée dans les granules de sécrétion et le TGN. Comme pour les autres PCs, lors de son activation le peptide signal est retiré dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER), générant le proPC1/3, et la prorégion est à son tour clivée pour produire une forme peu active de 87 kDa. Dans certains cas, cette forme de 87 kDa peut avoir une affinité suffisante envers le substrat pour parvenir à le cliver hors des granules de sécrétion. Cela a par exemple été démontré par Coates et Birch (1998) pour la pro-vasopressine au niveau de la jonction neurophysine-glycopeptide, alors que le clivage au niveau de la jonction vasopressine-neurophysine est effectué à l'intérieur des granules de sécrétion par une forme plus courte de 66 kDa. Cette dernière, qui est majoritairement la forme impliquée dans le clivage des précurseurs, est générée par une deuxième coupure qui survient au niveau des granules même (figure 4) (Zhou et Mains, 1994; Coates et Birch, 1997; Boudreault et al., 1998a). Le pH de ce compartiment correspond au pH optimal de la forme de 66 kDa, à savoir entre 5.5 et 6.5 (Jean et al., 1993; Zhou et Lindberg, 1993), et en effet l'activité spécifique de l'enzyme est considérablement augmentée au moment de sa conversion. Il s'agit d'une portion C-terminale de l'enzyme qui est retranchée selon un processus autocatalytique. De plus, il est probablement intermoléculaire, comme le suggèrent des résultats obtenus *in vitro* au cours d'expériences de fluorimétrie dans lesquelles l'activité de la forme de 85 kDa était mesurée en présence et en l'absence de la forme de 71 kDa. Ces formes de 85 et 71 kDa, obtenues par surexpression du gène recombinant dans les cellules

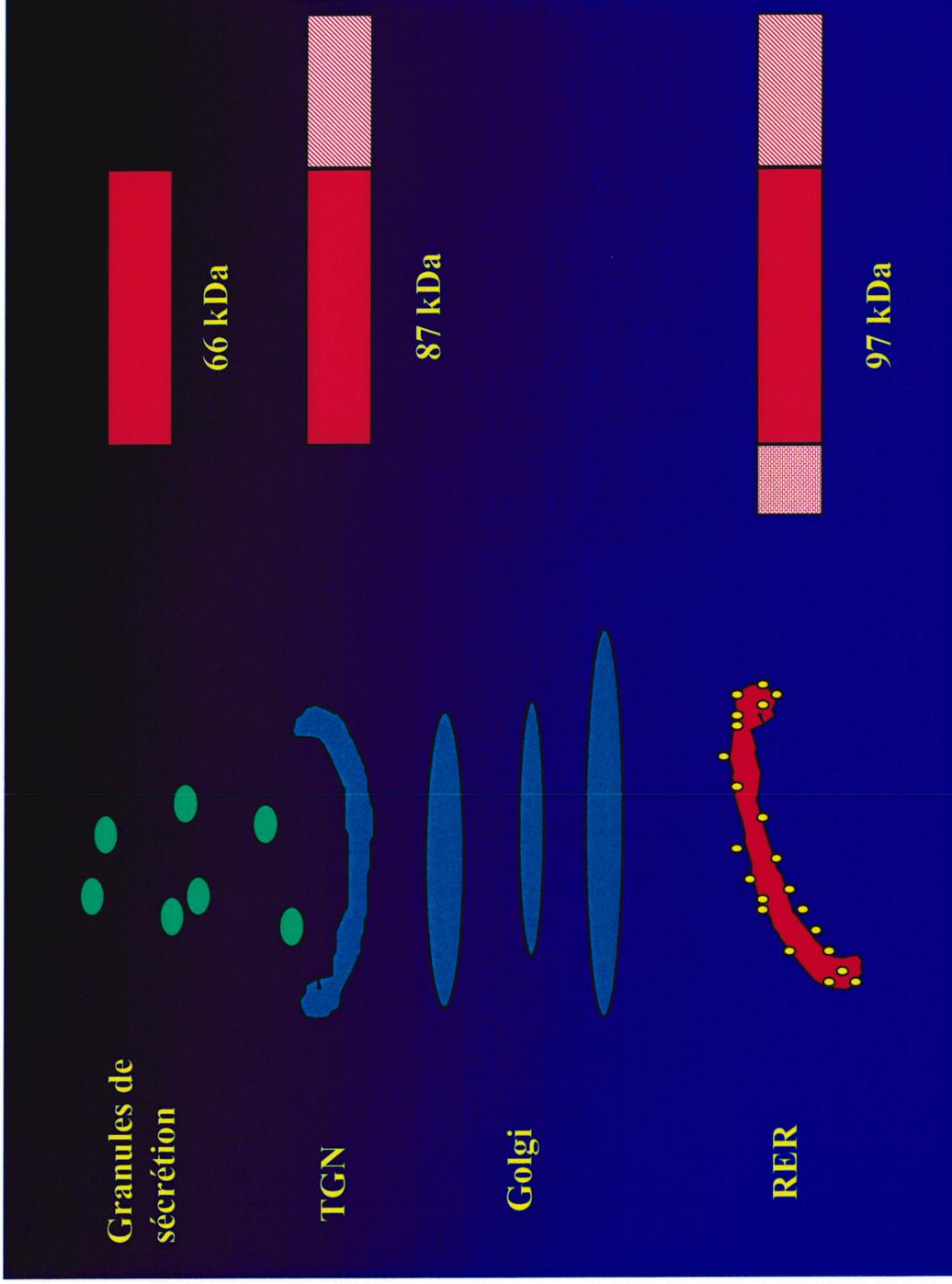


Figure 4 : Maturation post-traductionnelle de PC1/3. La proenzyme, représentée par le symbole , est clivée de la proenzyme dans le TGN, générant la forme de 87kDa de l'enzyme. Une deuxième coupure qui a lieu dans les granules de sécrétion et qui retranche la partie représentée par le symbole  dans la région C-terminale, génère une forme plus active de 66kDa.

d'insectes Sf-9 (voir section 2.7) sont équivalentes respectivement aux formes de 87 et 66 kDa produites par la plupart des autres systèmes d'expression. Il a été observé que la pente de la courbe mesurant l'activité de l'enzyme de 85 kDa incubée en présence de la forme de 71 kDa était significativement plus élevée que les pentes respectives des formes de 85 kDa ou de 71 kDa incubées seules (figure 5; Villemure et Lazure, résultats non-publiés).

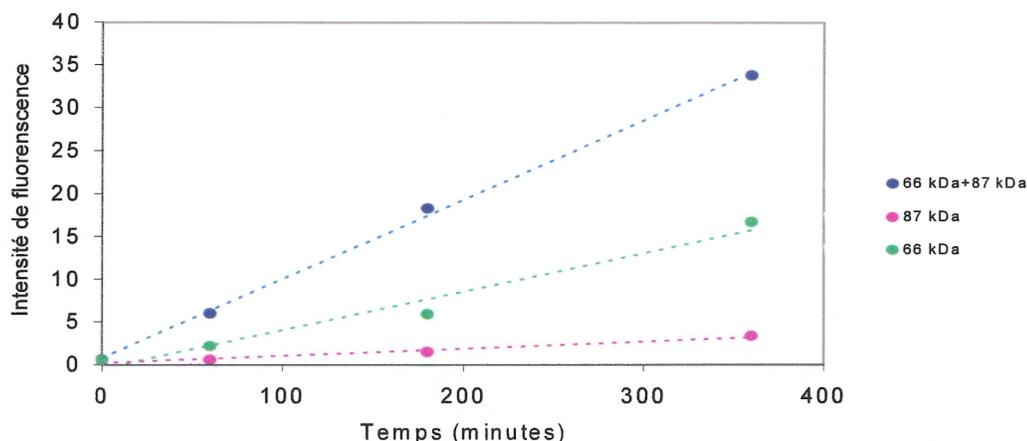


Figure 5: Activation de PC1/3 mesurée par fluorimétrie dans différentes conditions.

L'intensité de fluorescence a été mesurée en présence de 100 μ M de substrat pERTKRMCA hydrolysé par la forme de 71 kDa de PC1/3 incubée seule ou en présence de PC1/3, qui s'active à son tour en enzyme de 71 kDa.

Jutras et al. (1997) ont proposé un rôle d'inhibition de cette partie C-terminale de PC1/3, en se basant sur l'observation que l'enzyme est normalement incapable de cliver la proénine dans les types cellulaires dépourvus de granules de sécrétion, tels CHO ou BSC-40, mais que la proenzyme est maturée si l'on transfecte ces cellules avec le gène de PC1/3 tronqué de sa partie C-terminale. Toutefois, le groupe de Lindberg (Muller et Lindberg, 2000) a tenté de tester directement l'inhibition de PC1/3

recombinant par le domaine C-terminal purifié provenant de l'expression dans des bactéries, et n'a obtenu aucune donnée d'inhibition significative. De plus, puisque l'expression de PC1/3 est restreinte aux cellules possédant une voie de sécrétion régulée, le fait que la prorénine ne soit pas clivée dans des cellules dépourvues de granules de sécrétion, où l'enzyme devrait préalablement être maturée et activée, ne peut logiquement être attribué à la présence de la partie C-terminale de PC1/3.

1.2.2.2 Les substrats de PC1/3

PC1/3 se retrouvant dans les granules de sécrétion, elle participe donc à la maturation des proprotéines et prohormones de la voie de sécrétion régulée, tout comme PC2. Ces deux enzymes sont localisées dans les tissus neuronaux et endocriniens selon des patrons d'expression différents (Seidah et al., 1991a; Schafer et al., 1993; Marcinkiewicz et al., 1993). Elles sont responsables de la maturation de plusieurs hormones et neuropeptides, dont la pro-insuline (Bennett et al., 1992; Smeekens et al., 1992b), le pro-glucagon (Rouille et al., 1995) la proopiomélanocortine (POMC) (Benjannet et al., 1991; Thomas et al., 1991), le pro-neuropeptide Y (Brakch et al., 1997), ainsi que la prosomatostatine, la provasopressine, la proneurotensine, la proenképhaline, la prodynorphine, la procholécystokinine (proCCK), la prooxytocine, la prohormone de concentration de la mélanine (proMCH) et la prohormone de libération de la thyrotropine (proTRH) (pour revues, voir Seidah et Chrétien, 1999; Cameron, 2002).

La coexpression de ces deux enzymes laisse supposer un certain niveau de redondance fonctionnelle. Un phénotype embryonnaire létal aurait été observé pour les souris nulles en PC1/3, suite à l'inactivation complète du gène obtenue par délétion de régions importantes encodant l'enzyme

(résultats non-publiés, mentionnés dans Seidah et Chrétien, 1999). Cela contraste avec le cas d'une patiente, décrit à la section 1.2.2.3, qui est vivante malgré une mutation dans chacun des deux allèles du gène de PC1/3. Les souris nulles en PC2, quant à elles, présentent des désordres endocriniens multiples tels l'absence de maturation du proglucagon pancréatique, une diminution importante (60%) de la maturation de la proinsuline et une hypoglycémie légère (Furuta et al., 1997). Ces souris restent viables, ce qui suggère une compensation par PC1/3, ou, dans une certaine mesure, par l'intervention d'autres PCs. Ce résultat contraste avec celui des souris "knock-out" pour la protéine 7B2, qui elles montrent un phénotype beaucoup plus sévère (Westphal et al., 1999). En plus d'une hypoglycémie, une hyperproinsulinémie et une hypoglucagonémie, elles ont des concentrations très élevées d'hormone adénocorticotrope (ACTH) et de corticostérone circulantes. Elles meurent moins de neuf semaines après la naissance d'un syndrome de Cushing (hypercortisolisme) très prononcé. Considérant que dans les deux cas, c'est-à-dire les souris nulles en PC2 ou nulles en 7B2, PC2 sera déficiente, la présence d'un tel phénotype suggère pour 7B2 davantage de rôles que celui associé à PC2.

Différentes études ont permis de distinguer les fonctions respectives de PC1/3 et PC2 dans la maturation de certains de leurs substrats: en plus de l'inactivation de PC2 dans les souris (Furuta et al., 1998), l'utilisation d'ARN antisens (Bloomquist et al., 1991; Rouille et al., 1994; Rothenberg et al., 1996; Johanning et al., 1998; Vishnuvardhan et Beinfeld, 2000) s'est avérée très efficace. On a ainsi observé que PC1/3 et PC2 avaient chacune leurs cibles parmi les nombreux sites de coupure, identifiés par des paires d'acides aminés basiques, présents sur leurs substrats: généralement, la protéolyse par PC1/3 est plus limitée et génère des peptides de plus haut poids moléculaire, tandis que la protéolyse par PC2 est plus extensive, résultant en une série de petits peptides actifs. Un exemple est illustré à la

figure 6 pour la maturation de la POMC. De même, leur localisation différentielle, par exemple dans le cas du lobe antérieur et dans le lobe intermédiaire (absent chez l'homme), serait responsable de la présence, à partir d'un même précurseur, de populations différentes de produits (figure 6).

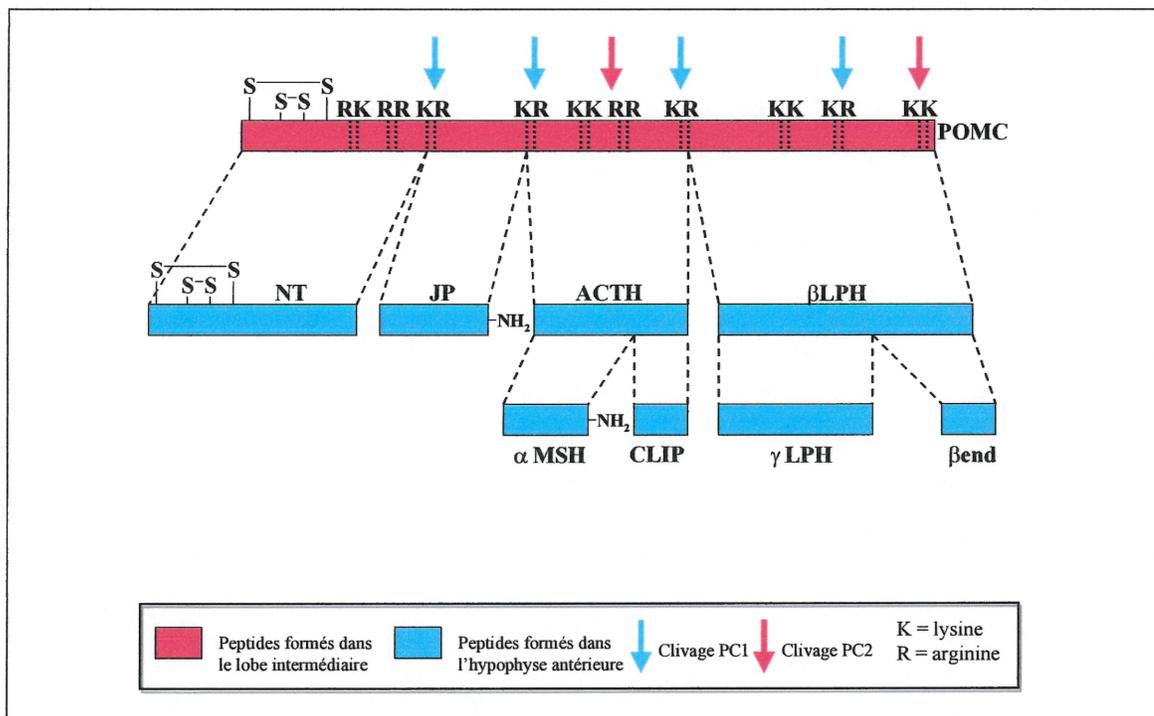


Figure 6: Maturation de la POMC par PC1/3 et PC2. Les flèches, noires ou rouges selon qu'il s'agit de PC1/3 ou PC2, représentent les sites de clivage suivant les paires d'acides aminés basiques indiquées par leur code à une lettre et par les lignes pointillées. Les peptides formés dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse sont indiqués en rose, ceux formés dans le lobe antérieur sont en gris. NT, fragment N-terminal; JP, peptide de jonction; ACTH, hormone adénocorticotrope; γLPH, γ-lipotropine; αMSH, hormone de stimulation des mélanocytes α; CLIP, peptide du lobe intermédiaire. (Adapté de Raffin-Sanson et al., 1997).

De plus, comme dans le cas de la pro-insuline, il semblerait que ces deux enzymes puissent agir de façon consécutive (figure 1) plutôt que de manière simultanée (Malide et al., 1995; Raffin-Sanson et al., 1997; Wilson et White, 1998; Lipkind et Steiner, 1999).

1.2.2.3 Déficience en PC1/3

Les cas rencontrés d'anomalies dans la maturation des précurseurs sont le plus souvent associés à des mutations dans la séquence même de ces précurseurs, ce qui empêche leur reconnaissance et leur activation par les PCs (pour revue, voir Wilson et White, 1998). Toutefois, un cas a été rapporté d'une déficience héréditaire en PC1/3: il s'agit d'une patiente ayant souffert d'obésité sévère durant l'enfance, d'aménorrhée à partir de l'adolescence et de crises d'hypoglycémie postprandiales suite à des traitements hormonaux lui ayant permis d'être enceinte. Au niveau hormonal, elle souffrait d'hypogonadisme hypogonadotrope, d'insuffisance corticotrope partielle (hypocortisolisme) et d'une anomalie dans l'homéostasie du glucose, exacerbée par les demandes importantes dues à la grossesse (O'Rahilly et al., 1995). L'étude du cas a démontré qu'il s'agissait d'un défaut de maturation de la POMC et de la proinsuline causé par une mutation dans chacun des allèles du gène de PC1/3 (Jackson et al., 1997). L'un des allèles est muté dans la séquence codant pour le domaine P, tandis que sur l'autre allèle, une deuxième mutation causant la perte d'un exon résulte en une enzyme tronquée dans le domaine catalytique, rendant ainsi le produit de gène complètement inactif.

1.2.2.4 Les tumeurs invasives d'origine neuroendocrine

Certaines tumeurs dérivant de cellules neuroendocriniennes conservent leur propriétés sécrétoires, d'autres tumeurs sécrètent aussi des hormones suite à l'acquisition d'un phénotype dit de "synthèse ectopique". Les adénomes hypophysaires corticotropes ou les tumeurs bronchiques sont des exemples de tumeurs sécrétant de l'ACTH en excès. Elles surexpriment PC1/3, ce qui cause un niveau trop élevé de maturation de la POMC (Raffin-Sanson et al., 1997) menant ainsi, entre autres, à une surproduction d'ACTH entraînant souvent chez certains patients, en plus

des tumeurs originales, un syndrome de Cushing (Bertagna, 1994). Il a été démontré également que PC1/3 est exprimée dans les carcinomes du poumon (Creemers et al., 1992) et les tumeurs mammaires (Cheng et al., 1997).

1.3 Les inhibiteurs des PCs

Comme nous l'avons vu, les PCs sont impliquées dans la production d'une grande variété de peptides biologiquement actifs pouvant être associés à des pathologies, et ceci fait de cette famille d'enzymes des cibles intéressantes pour le contrôle de ces voies. Un moyen efficace de réaliser ce contrôle est de développer des inhibiteurs spécifiques de l'activité des PCs. De plus, l'emploi d'inhibiteurs a joué et continue de jouer un rôle très important dans l'étude fonctionnelle et structurale des enzymes protéolytiques elles-mêmes. Cette section est donc consacrée aux nombreuses approches ayant déjà été employées pour le développement d'inhibiteurs des PCs, mais nous allons tout d'abord faire un survol rapide des différents modes d'inhibition qu'ils peuvent adopter et de la façon dont on peut déterminer ceux-ci.

1.3.1 Les inhibiteurs réversibles

Les inhibiteurs réversibles forment des complexes dynamiques avec l'enzyme et changent ses propriétés catalytiques. Ils peuvent être classés dans quatre grandes catégories, c'est-à-dire inhibiteurs compétitifs, incompétitifs, mixtes ou non-compétitifs, selon leur mode de fonctionnement, schématisé à la figure 7, et ainsi la variation des paramètres cinétiques apparents de Michaelis-Menten qu'ils induisent (Cornish-Bowden, 1995;

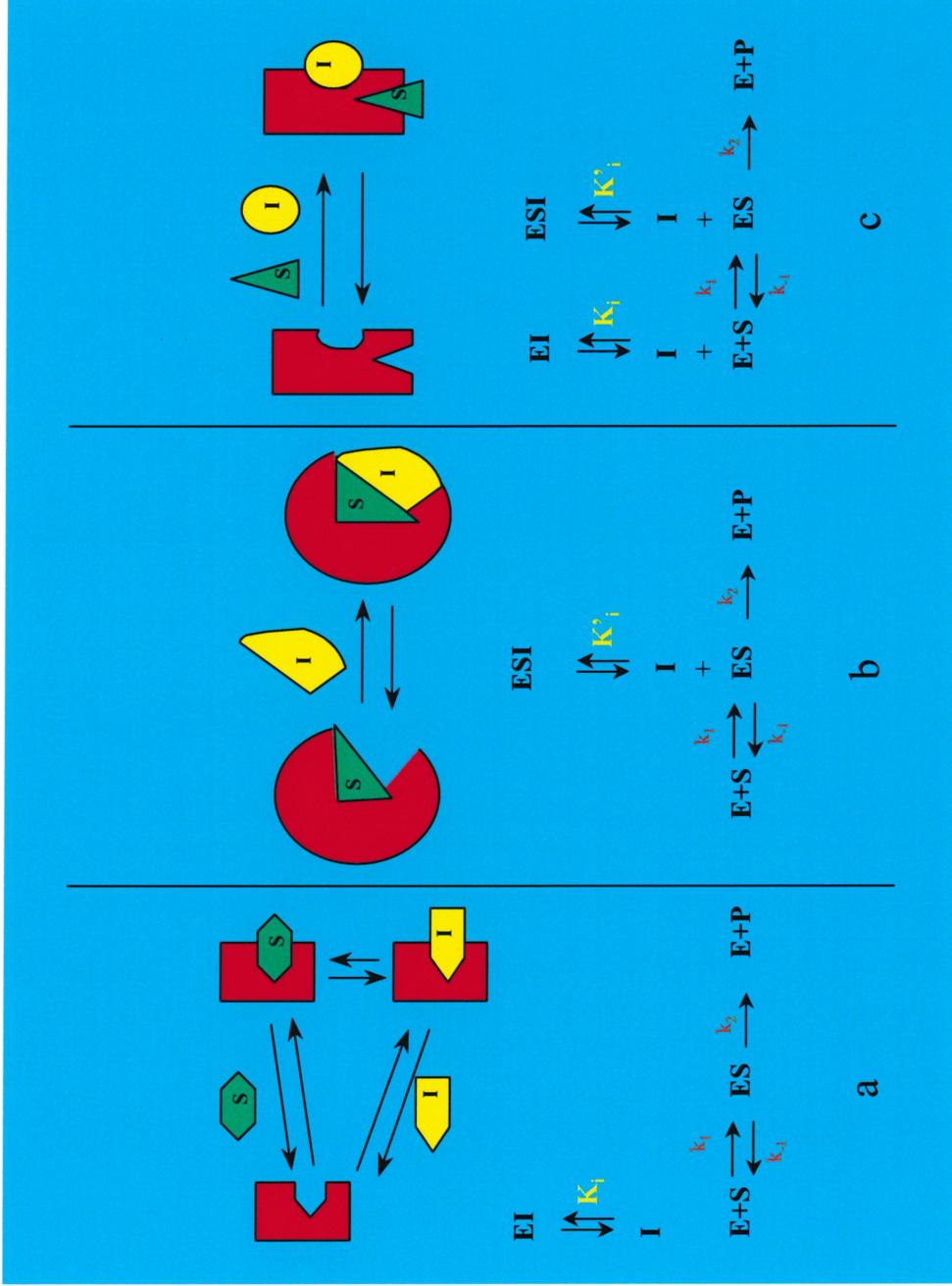


Figure 7 : Représentations schématiques et équations des mécanismes d'inhibition réversibles.
 a) Inhibition compétitive b) Inhibition incompétitive c) inhibition mixte non-compétitive

Segel, 1993). Il existe des méthodes graphiques permettant de déterminer chacun des mode d'inhibition à partir de courbes diagnostiques, illustrées à la figure 8.

1.3.1.1 Les inhibiteurs compétitifs

Le mode d'inhibition est appelé compétitif lorsque l'inhibiteur (I) et le substrat (S) *compétitionnent* pour le même site de liaison sur l'enzyme (E), c'est-à-dire le site actif (figure 7a). Le complexe EI se forme et se dissocie selon une constante d'équilibre appelée constante d'inhibition (K_i), qui est donnée par le rapport suivant:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

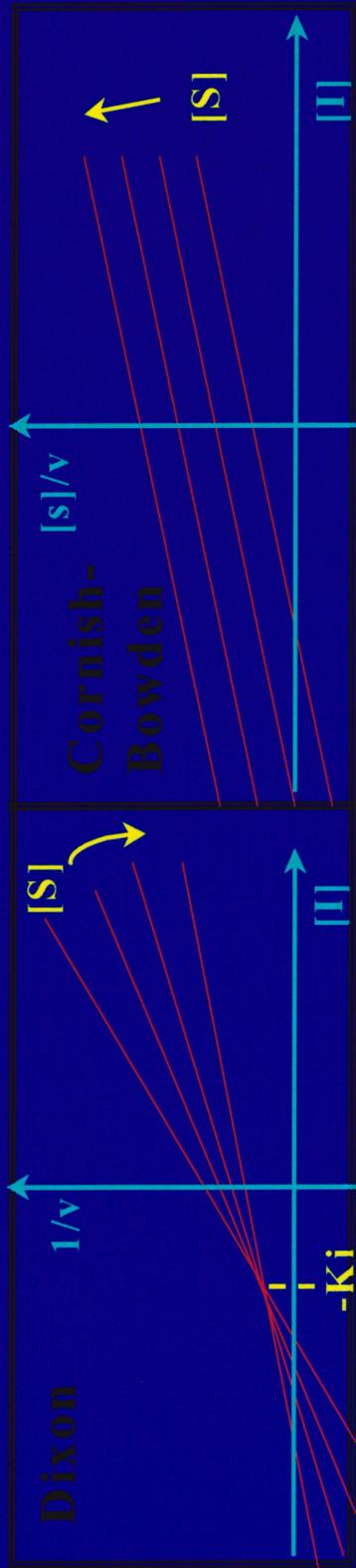
où: [E] = la concentration d'enzyme libre

[I] = la concentration d'inhibiteur libre

[EI] = la concentration de complexe enzyme-inhibiteur

Ainsi, plus cette constante est faible, plus il y a une grande quantité de complexe qui est formé; cette valeur est donc une mesure inverse de l'affinité de I pour E. De fait, plus l'affinité est grande et plus la compétition avec S sera forte, donc plus l'inhibiteur sera puissant. En d'autres termes, la présence d'un inhibiteur compétitif changera la valeur du K_m sans changer le V_{max} . La constante de Michaelis-Menten (K_m) exprime de façon inverse l'affinité de E pour S, car elle est donnée par la concentration de S ([S]) pour laquelle la vitesse (V) de E est 50% de V_{max} , la vitesse maximale limitante qui est observée quand toute l'E présente est sous forme de complexe ES.

a) Inhibition compétitive



b) Inhibition incompétitive

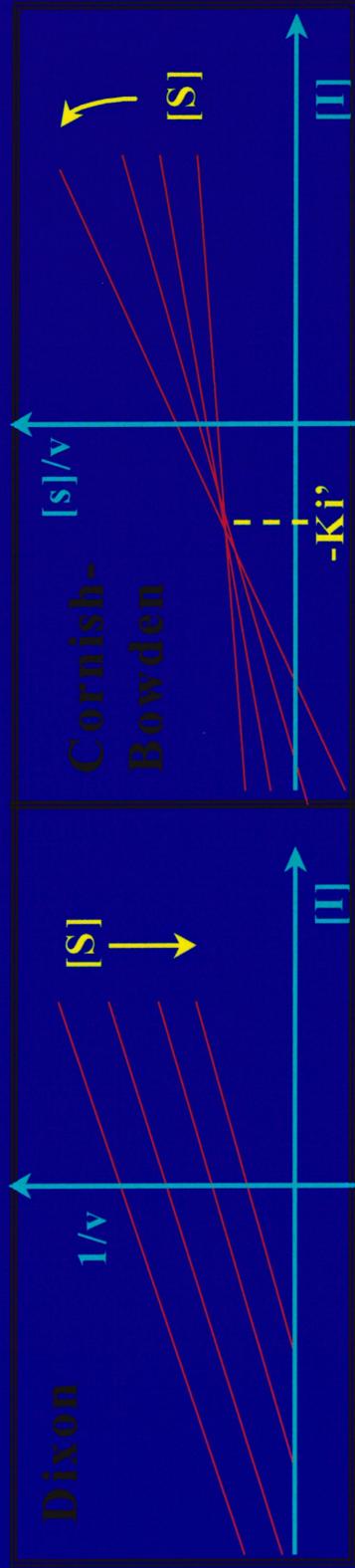
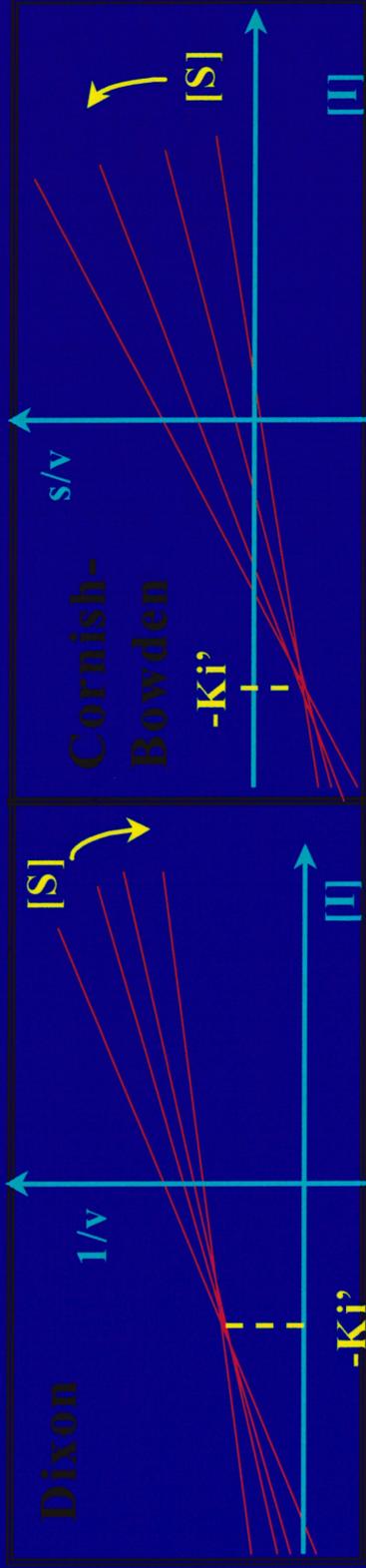


Figure 8 : Représentations graphiques de Dixon (gauche) et de Cornish-Bowden (droite) des modes d'inhibition réversibles.

a) Inhibition compétitive b) Inhibition incompétitive

c) Inhibition mixte



d) Inhibition non-compétitive

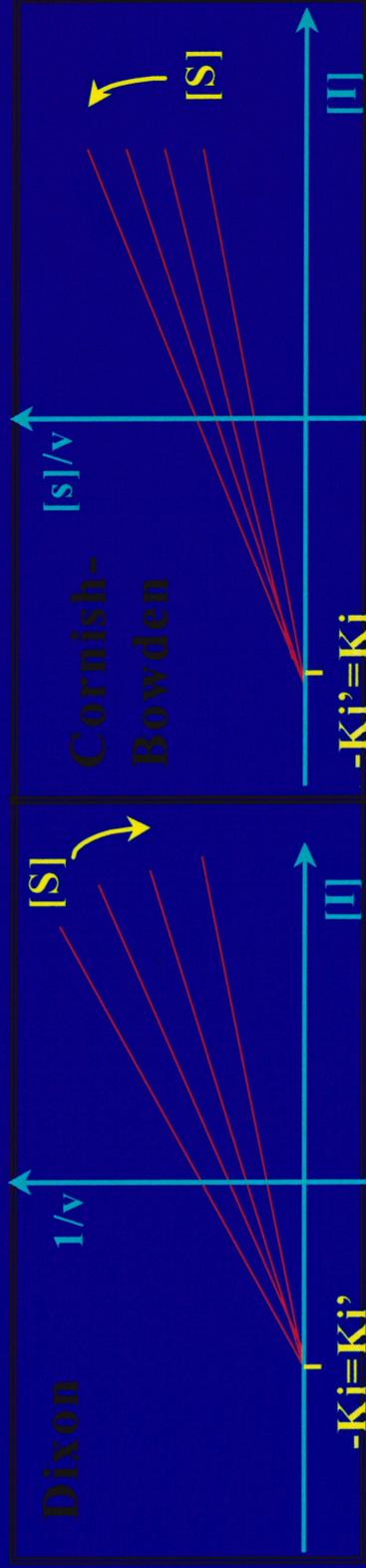


Figure 8 (suite) :
c) Inhibition mixte d) Inhibition non-compétitive

Deux représentations graphiques nous permettent d'analyser l'impact de l'inhibiteur I en présence de E et S. La première nous permet de déterminer la valeur du K_i , la seconde, le mécanisme d'inhibition. Tout d'abord, la représentation de Dixon (1953) est donnée par un graphique où, pour différentes $[S]$, les tracés de l'inverse de la vitesse d'hydrolyse de S ($1/V$, mesurée par l'apparition du produit P) en fonction de $[I]$, se coupent en un point où $[I] = -K_i$ (figure 8a). Ensuite, la représentation de Cornish-Bowden (1974) est obtenue par le graphique de $[S]/V$ en fonction de $[I]$ pour chaque $[S]$, et présente des droites parallèles (figure 8a), caractéristiques d'un inhibiteur compétitif.

1.3.1.2 Les inhibiteurs incompétitifs

Un inhibiteur incompétitif n'a pas d'affinité pour E libre, mais plutôt pour le complexe ES. Ainsi la liaison de S induit un changement sur E qui permet par la suite la liaison de I, sur le même site ou non (figure 7b). Le K_m et le V_{max} diminuent, puisque l'association de I avec ES pour donner ESI diminue la concentration de ES, le complexe qui donne les produits (saturation atteinte plus rapidement). Les droites sur la représentation de Dixon sont parallèles (figure 8b), puisque c'est la liaison de S qui est limitante pour permettre la liaison de I, donc une augmentation de $[I]$ dans le milieu n'a pas d'influence. C'est la représentation de Cornish-Bowden qui permet de déterminer K'_i , la constante d'équilibre du complexe ESI, qui est égale à $-[I]$ au point de rencontre des droites (figure 8b). Il s'agit en fait d'une constante d'inhibition "apparente" puisque, contrairement à l'inhibition compétitive, elle ne nous donne pas directement une mesure de la valeur spécifique d'inhibition de E par I, mais bien une valeur faisant intervenir $[S]$. Sur cette représentation, cette valeur de K'_i correspond également au rapport K_m/V_{max} de l'enzyme.

1.3.1.3 Les inhibiteurs mixtes

L'inhibition mixte se produit lorsque I peut se lier aussi bien sur E que sur ES, au même site (mixte-compétitif), ou à un autre site (mixte-non compétitif, figure 7c). Dans les deux cas la liaison de I n'est pas influencée par celle de S, mais elle altère la capacité de E à hydrolyser S, le plus souvent en changeant l'accessibilité de S au site actif. La constante d'équilibre globale de la réaction d'inhibition fait donc intervenir K_i et K'_i . Toutefois, le graphique de Dixon ne nous donne que la composante spécifique de l'inhibition, c'est-à-dire que les droites se rencontrent à $[I] = -K_i$, tandis que, sur la représentation de Cornish-Bowden, les droites se croisent sous l'axe des x à $[I] = -K'_i$ (figure 8c).

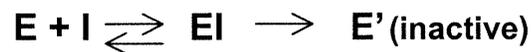
1.3.1.4 Les inhibiteurs non-compétitifs

Un inhibiteur non-compétitif se lie à E sur un site quelconque et interfère avec ses propriétés catalytiques, mais sans changer l'affinité de S pour E ni empêcher sa liaison au site actif c'est-à-dire que le K_m sera identique. Par contre le V_{max} sera diminué, reflétant la neutralisation de E par I. Ce cas peut être considéré comme un cas particulier d'inhibition mixte pour lequel $K_i = K'_i$. Ainsi, sur les représentations de Dixon et de Cornish-Bowden, les droites à différentes $[S]$ vont se croiser directement sur l'axe des x, au point où $[I] = K_i = K'_i$ (figure 8d). En effet, dans cette situation I peut se lier indépendamment de $[S]$.

1.3.2 Les inhibiteurs irréversibles

Dans le cas d'une inhibition irréversible, la formation du complexe EI entraîne une réaction chimique menant à l'inactivation complète de E (Demuth, 1990). Cela se produit le plus souvent quand I, qui se lie avec une grande proximité au niveau du site actif, possède un groupement

réactionnel très réactif dans sa séquence, ou quand le milieu est contaminé par la présence d'ions métalliques. Il n'est pas souhaitable d'utiliser ce type d'inhibiteurs pour le traitement de pathologies, parce qu'ils constituent en fait des poisons catalytiques qui inhibent les enzymes de façon permanente. Cependant, l'interprétation de données cinétiques d'inactivation, données par:



peuvent parfois fournir de l'information utile. Par exemple, les inhibiteurs incorporant un groupement chlorométhyle (voir section 1.3.5.1) (Kettner et Shaw, 1981) sont un groupe d'inhibiteurs irréversibles des protéases à sérine très étudié. Leur mécanisme de réaction comprend la formation d'une fonction hémiacétal impliquant la sérine du site catalytique (Powers, 1977).

1.3.3 Inhibiteurs endogènes des PCs

1.3.3.1 La prorégion

Nous avons mentionné le rôle que jouait la prorégion dans le repliement du domaine catalytique des PCs, bien que non formellement établi comme dans le cas des subtilisines, mais également qu'elle représentait un inhibiteur de l'activité en demeurant associée au site actif de l'enzyme. En effet, cela a d'abord été démontré par Anderson et al. (1997) pour la furine. Par la suite, en conservant le fragment de PC1/3 contenant la prorégion, Boudreault et al. (1998b) ont étudié ce potentiel d'inhibition et découvert qu'il suivait un mécanisme de liaison lente de très forte affinité ("slow tight-binding inhibition") envers PC1/3 ($K_i = 6$ nM) et furine ($K_i = 10$ nM), mais était strictement compétitif et moins efficace envers PC2 (K_i de l'ordre des μ M). Aussi, la prorégion de PC2 se comporte de manière

semblable vis-à-vis de PC2, démontrant un mécanisme d'inhibition identique ainsi qu'un K_i de l'ordre des nM (Boudreault et al., résultats non publiés). Finalement, la prorégion de PC7 est aussi un inhibiteur de PC7 à un niveau nanomolaire (Zhong et al., 1999). Il a été observé pour la furine, PC7 et PC2, que ce processus d'inhibition requiert les résidus constituant le site de clivage primaire précédent le domaine catalytique, c'est-à-dire la portion C-terminale de la prorégion (Zhong et al., 1999; Muller et al., 2000). Cependant, cette portion n'est pas suffisante puisque l'hexapeptide C-terminal de PC2 seul présente une diminution de l'inhibition d'un facteur six (Apletalina et al., 2000). Le même groupe a aussi obtenu des constantes d'inhibition plus élevées pour la prorégion complète de PC2 que les résultats précédemment observés par Boudreault et al. (résultats non publiés), c'est-à-dire des IC_{50} de l'ordre des μM plutôt que des nM (Muller et al., 2000). Quoiqu'il en soit, ces résultats doivent être complétés par des études *in vivo*, en tenant compte du fait que PC2 est aussi inhibée spécifiquement par la protéine 7B2 endogène (voir section suivante).

La conception d'inhibiteurs synthétiques dérivés de la prorégion de PC1/3 a permis l'obtention de K_i de l'ordre des μM (Basak et al., 1994; 1995; 1999a). Certains de ces peptides incorporant des acides aminés non-naturels se comportent comme des inhibiteurs de type "suicide" en réagissant de façon irréversible avec la Ser du site actif. D'autres peptides modifiés au moyen de fonctions réactives électrophiles ou carbonyles en position P1 ou P1' inhibent la réaction enzymatique en imitant l'état de transition.

1.3.3.2 7B2

De la même manière que la prorégion, la protéine neuroendocrine 7B2 qui se lie à PC2 et intervient dans son repliement et son activation, va

demeurer liée au site actif pour inhiber son activité protéasique. Bien qu'elle soit coexprimée avec PC1/3 et PC2 dans les cellules neuroendocriniennes, il s'agit d'un inhibiteur absolument spécifique à PC2, alors qu'au contraire elle constitue un substrat de PC1/3 *in vitro* (Martens et al., 1994). 7B2 inhibe PC2 à des concentrations de l'ordre des nM, selon un mécanisme de liaison de très forte affinité. Il est connu que dans les cellules le complexe PC2-7B2 est transporté dans le TGN, où la protéine de 27 kDa est alors clivée en un domaine N-terminal de 21 kDa et un peptide C-terminal de 31 acides aminés (Ayoubi et al., 1990; Paquet et al., 1994). Des études de mutagénèse ont permis d'identifier la région C-terminale comme étant responsable de l'inhibition de PC2, et les résidus Lys171 et Lys172 sont particulièrement essentiels (van Horssen et al., 1995). Toutefois, l'inhibition par cette région C-terminale, appelée le 7B2 CT peptide, n'a jamais été démontrée *in vivo*. La portion N-terminale de la protéine, quant à elle, serait responsable du rôle de chaperone moléculaire, et elle est en effet apparentée, quoique de façon éloignée, à une sous-classe de chaperones appelées chaperonines de la famille des protéines du choc thermique de 60 kDa (Braks et Martens, 1994).

1.3.3.3 proSAAS

Récemment, ce qui semble être un nouvel inhibiteur endogène de PC1/3 a été identifié (Fricker et al., 2000), le proSAAS. Il s'agit d'un polypeptide qui pourrait possiblement agir en affectant la maturation autocatalytique de PC1/3, de façon équivalente à 7B2 envers PC2. Il démontre d'ailleurs certaines homologues structurelles et fonctionnelles avec 7B2. La région inhibitrice de proSAAS est constituée principalement d'une séquence Lys-Lys-Arg-Val-Lys-Arg située à 16 résidus de l'extrémité C-terminale (Cameron et al., 2000a). Cette séquence fut d'ailleurs identifiée préalablement par Apletalina et al. (1998), en recherchant dans des bibliothèques

d'hexapeptides des inhibiteurs potentiels de PC1/3 et PC2 (voir section 1.3.7.2). Deux groupes différents ont démontré que des peptides dérivés de cette séquence démontrent un fort potentiel d'inhibition envers PC1/3 seulement, avec des K_i de l'ordre des nM, suivant un mécanisme compétitif de liaison de très haute affinité (Cameron et al., 2000a, Qian et al., 2000). Toutefois, l'interaction entre PC1/3 et le proSAAS *in vivo* n'est peut-être pas absolument requise, car, si leur distribution est généralement similaire, l'enzyme PC1/3 active peut tout de même être exprimée de cellules n'exprimant pas le proSAAS (Cameron, 2002). De plus, il a été observé que la furine et PC2 peuvent cliver le proSAAS à différents sites, générant les peptides responsables de l'inhibition (Sayah et al., 2001). Mais, comme ce clivage ne peut survenir lorsque le peptide est lié à PC1/3, la biologie cellulaire de ce processus reste à élucider, et semble plus complexe que dans le cas de 7B2 envers PC2.

1.3.4 Les serpines

Les serpines (pour "serine protease inhibitors") sont des inhibiteurs naturels spécifiques aux proteases à sérine de type "trypsin-like" chez les mammifères. Elles agissent selon un mécanisme unique de type "suicide", au cours duquel la sérine du site actif interagit de façon covalente avec le résidu en position P1 du centre réactif de la serpine. Il survient alors un changement conformationnel de la serpine, provoquant un retournement dans le sens opposé de la région à laquelle la sérine est toujours attachée, de sorte que cette dernière est littéralement tirée hors du site catalytique. Cette déformation du site actif prévient l'hydrolyse du lien peptidique, et ainsi la libération de la protéase, qui se retrouve irréversiblement prisonnière du complexe protéine-protéine (Huntington et al., 2000; Peterson et Gettings, 2001).

1.3.4.1 PI8

Une serpine de type ovalbumine a été identifiée comme un inhibiteur rapide et de haute affinité de la furine, la PI8 ("ovalbumin-type serpin human protease inhibitor 8") (Dahlen et al., 1998). Elle possède en effet deux séquences de reconnaissance de la furine dans sa boucle réactive.

1.3.4.2 α_1 -antitrypsine Portland

L' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT) est un membre de la famille des serpines et un inhibiteur naturel de l'élastase. Une forme mutée appelée α_1 -antitrypsine Pittsburgh (α_1 -PIT) remplace le résidu Met à la position P1 du site actif par une Arg, ce qui change sa spécificité et en fait un inhibiteur de la thrombine (Owen et al., 1983). Une variante de l' α_1 -PIT a été créée en remplaçant également le résidu en position P4 (P4Ala \rightarrow P4Arg) dans la boucle réactive, afin de correspondre au site de reconnaissance minimal de la furine (P4Arg/P1Arg) (Anderson et al., 1993). Elle a été baptisée l' α_1 -antitrypsine Portland (α_1 -PDX), et constitue un bon inhibiteur de toutes les PCs (Decroly et al., 1996). Il a cependant été proposé qu'elle pourrait avoir une spécificité accrue envers la furine (Jean et al., 1998), en agissant comme un inhibiteur suicide par une liaison stable de très forte affinité (Dufour et al. 1998; Jean et al. 1998). Son mécanisme pourrait être différent envers les autres PCs, et ne résulterait pas en la formation d'un complexe enzyme-inhibiteur stable.

1.3.5 Les andrographolides

Récemment, des substances naturelles appelées andrographolides retrouvées chez la plante *Andrographis paniculata* ont été identifiées comme des inhibiteurs des PCs, avec des valeurs de K_i inférieures à 30 μ M (Basak

et al., 1999b). Cependant, elles démontrent peu de spécificité envers chacune des PCs.

1.3.6 Altérations des liens peptidiques au site de clivage

1.3.6.1 Le groupement chlorométhyle

L'introduction d'un groupement $-CH_2Cl$ à la suite d'un peptide contenant la séquence primaire de clivage des PCs (ex: térapeptidyl-Arg-X-(Lys/Arg)-Arg- CH_2Cl) provoque un mécanisme d'inhibition compétitive et irréversible où l'inhibiteur agit comme un "pseudosubstrat" qui se lie de façon covalente entre les résidus His et Ser du site actif de l'enzyme. L'ajout de cette fonction résulte en un inhibiteur potentiel de la furine et de PC1/3 (Stieneke-Grober et al., 1992; Jean et al., 1995a). Ainsi, Hallenberger et al. (1992) ont démontré que les peptides décanoyle-Arg-Glu-Lys-Arg- CH_2Cl et décanoyle-Arg-Ala-Lys-Arg- CH_2Cl inhibaient spécifiquement le clivage par la furine de la glycoprotéine gp160, dans des cellules infectées par le VIH. Cependant, l'utilité de ces chlorométhylcétone *in vivo* serait compromise par leur cytotoxicité.

1.3.6.2 Les liens isostères

L'approche consistant à la modification d'une séquence de clivage connue par l'introduction d'un lien pseudopeptidique non-clivable identifié par ψ à la jonction P1-P1' a été employée pour concevoir de bons inhibiteurs de la furine et de PC1/3 (Decroly et al., 1994; Angliker, 1995; Jean et al., 1995b). Le remplacement du groupement $-NH-$ par un groupement méthylène pour donner un lien $\psi[CO-CH_2]$, l'introduction du groupement méthylène entre les groupements $-CO-$ et $-NH-$ pour donner un lien $\psi[CO-CH_2-NH]$, ou encore l'introduction des fonctions méthylèneamine

$\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ ou hydroxyéthylène $\psi[\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2]$ sont des exemples de tels liens. Ces liens sont appelés "isostères" car, bien qu'ils ne soient pas hydrolysables par l'enzyme, ils occupent le même volume et respectent bien la stéréochimie du lien peptidique qu'ils remplacent. Cette stratégie permet dans certains cas de contourner le problème présenté par les peptides avec un bon potentiel inhibiteur contenant une séquence fortement reconnue par l'enzyme, mais qui se comportent comme des substrats à long terme en étant lentement hydrolysés.

1.3.7 Inhibiteurs issus de bibliothèques combinatoires

Les bibliothèques combinatoires de peptides synthétiques sont de plus en plus employées pour permettre la sélection de ligands spécifiques ou d'inhibiteurs potentiels parmi un très grand nombre de peptides. Il existe différentes façons de procéder, mais dans le cas qui nous intéresse, les expériences ont été menées par "scanning" positionnel, c'est-à-dire en identifiant les résidus les plus favorables à chaque position dans des bibliothèques définies.

1.3.7.1 Spécificité de la furine de P1 à P4

Dans le cas des PCs, cette approche fût d'abord utilisée par Matthews et al. (1994a) pour élucider la spécificité enzymatique de la furine. Une multitude de séquences de substrats comprenant cinq acides aminés au hasard ont été soumises à plusieurs rondes de sélection par la furine. Virtuellement toutes les séquences ainsi clonées possédaient le motif Arg-X-X-Arg, et une grande proportion avaient un résidu Lys, Arg ou Pro avant la deuxième Arg. Ces travaux confirmaient la préférence de la furine pour des résidus Arg en position P1 et P4. De plus, les résultats de l'utilisation de deux bibliothèques supplémentaires comportant sept acides aminés (motifs X-X-

Arg-X-(Lys/Arg)-Arg-X et X-X-Arg-X-Pro-Arg-X), sans permettre l'identification d'une séquence consensus, ont tout de même laissé entrevoir que la séquence de reconnaissance de la furine s'étendait au-delà de quatre résidus, puisque le motif (Leu/Pro)-Arg-Arg-Phe-(Lys/Arg)-Arg-Pro a été observé à plusieurs reprises.

1.3.7.2 Identification d'hexapeptides

Subséquemment, le groupe de Lindberg (Apletalina et al., 1998) a utilisé une librairie contenant environ 52 millions d'hexapeptides pour parvenir à identifier des peptides susceptibles d'inhiber PC1/3 et PC2, et comparer leur spécificité relativement à la furine. Ils ont ainsi déterminé quels résidus sont importants pour l'inhibition à chacun des sous-sites sur chacune des enzymes. Leurs résultats tendent à démontrer que PC1/3 et PC2 ont des spécificités semblables pour les résidus en P1, P3, P4 et P5, à savoir P1Arg, P3Val, P4Arg et P5Leu, et pour les deux enzymes l'hexapeptide présentant le plus de potentiel inhibiteur a été identifié comme Ac-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-Arg-NH₂, avec des K_i de 3.2 et 360 nM respectivement. Par contre, la furine ayant une préférence pour une Lys en P5, le peptide Ac-Leu-Lys-Arg-Val-Lys-Arg-NH₂ s'est avéré être un meilleur inhibiteur, avec un K_i pour cette enzyme de 190 nM. Dans tous les cas, l'extrémité C-terminale était acétylée, il semble cependant que ce groupement ne contribue à l'inhibition que dans le cas de PC2 (Cameron et al., 2000b).

1.3.7.3 Les polyarginines

Toujours en utilisant des bibliothèques combinatoires d'hexapeptides synthétiques, le même groupe (Cameron et al., 2000b) a démontré que la furine avait une préférence pour des résidus Arg ou Lys à chacune des

positions. En se basant sur cette observation, ils ont synthétisé une série de peptides polyarginines, contenant de quatre à neuf résidus Arg, et testé leur pouvoir d'inhibition sur la furine, PACE4, PC1/3 et PC2. L'inhibiteur le plus puissant est la nona-arginine, avec un K_i de 40 nM pour la furine, 110 nM pour PC1/3 et 2.5 μ M pour PACE-4. Toutefois, le peptide s'est avéré être clivé par la furine après six heures d'incubation. PC2 n'est inhibée par aucune des polyarginines, et s'est même avérée être suractivée, ce qui démontre encore une fois sa particularité par rapport aux autres PCs, à l'image de sa dépendance à la présence de la protéine 7B2 (Benjannet et al., 1995).

1.3.8 Modifications des boucles réactives d'autres inhibiteurs connus des protéases à sérine

1.3.8.1 Troisième domaine de l'ovomucoïde

Le troisième domaine de la protéine ovomucoïde (OMTKY3) de dinde constitue le site réactionnel de cet inhibiteur de plusieurs protéases à sérine: subtilisines, chymotrypsines et élastases. Il a été modifié en introduisant le site de clivage primaire de la furine (P4Ala-P3Cys-P2Thr-P1Leu \rightarrow P4Arg-P3Cys-P2Lys-P1Arg) afin d'augmenter sa spécificité envers cette enzyme, dont il constitue un bon inhibiteur avec un K_i de 0.11 μ M (Lu et al., 1993). Par contre, il est intéressant de constater que d'autres chercheurs ont utilisé cette même variante de l'OMTKY3 comme inhibiteur d'une forme mutée de la subtilisine BPN' aux résidus composant le sous-site S4, pour correspondre à la spécificité de la furine pour une Arg en P4 (Asn62 \rightarrow Asp/Tyr104 \rightarrow Asp/Gly166 \rightarrow Asp), et qu'ils ont ainsi obtenu un K_i de 29 nM contre ce triple mutant, qu'ils ont nommé "furilisine" (Ballinger et al., 1996). Ces résultats sont un exemple qu'il est possible de manipuler la spécificité enzymatique de façon "modulaire" pour l'étude de différents mécanismes.

1.3.8.2 α_2 -macroglobuline

L' α_2 -macroglobuline est un inhibiteur général des protéases qui agit selon un mécanisme de "trappe" (Barrett et Starkey, 1973). Récemment, sa région inhibitrice a été manipulée de façon semblable à l'OMYKY3 (P4Gly-P3Phe-P2Tyr-P1Glu-P1'Ser-P2'Asp \rightarrow P4Arg-P3Ser-P2Lys-P1Arg-P1'Ser-P2'Leu) pour correspondre au site de reconnaissance de la furine (Van Rompaey et al., 1997). Effectivement, cette molécule s'est avérée inhiber la furine *in vitro* et intracellulairement, selon ce mécanisme de "trappe" qui se distingue des autres modes classiques d'inhibition des PCs. Au cours de ce processus, la furine clive la région exposée comportant son site de reconnaissance, ce qui résulte en un changement de conformation des deux monomères de l' α_2 -macroglobuline, provoquant la séquestration de la protéase. Le site actif demeure donc fonctionnel, mais stériquement encombré.

1.3.8.3 Le BSPI-2

Le BSPI-2 (pour "barley serine proteinase inhibitor-2") a été identifié à l'origine comme un inhibiteur de la chymotrypsine (aussi appelé CI-2 pour chymotrypsin inhibitor 2), mais il s'avère lier les subtilisines de façon beaucoup plus étroite (Longstaff et al., 1990). Il s'agit d'une petite protéine de 83 acides aminés (figure 9a) isolée des grains d'orge *Hiproly* (Jonassen, 1980; Svendsen et al., 1980). La boucle réactive responsable de l'inhibition a été identifiée par cristallographie de la molécule seule (McPhalen et James, 1987) et du complexe BSPI-2 avec la subtilisine BPN' (McPhalen et James, 1988), et la jonction P1-P1' est située entre les résidus Met59 et Glu60. Dans le but de préparer un petit peptide synthétique pouvant inhiber les protéases aussi efficacement que le BSPI-2 natif, Leatherbarrow et

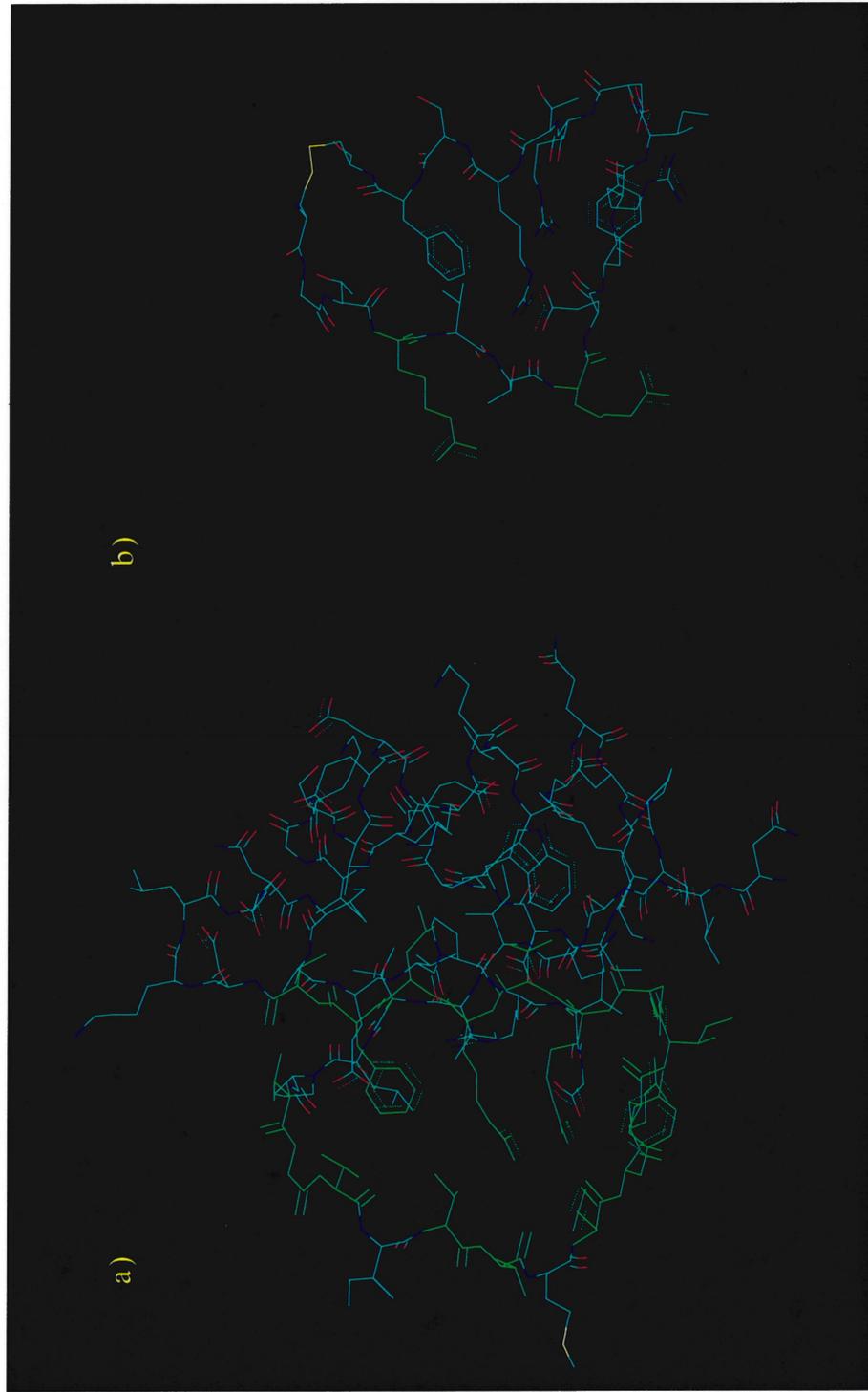


Figure 9: Structure tridimensionnelle de BSPI-2 et de sa boucle réactive. a) La structure de BSPI-2, obtenue de la banque de données de Brookhaven, est basée sur les données cristallographiques à partir du patron de diffraction des rayons X. La boucle formée de 18 acides aminés et contenant la méthionine 59 en P1 est illustrée en vert. b) La structure, proposée par Leatherbarrow et Salasinski et modélisée à l'aide du logiciel Macromodel v3.5, de la boucle formée par l'octadécapeptide et cyclisée par l'addition d'un pont disulfure, est représentée ici avec les résidus P1 et P4 ayant été remplacés par des Arg (en vert). La structure finale de cette boucle a été obtenue par le logiciel Hyperchem v4.0. Les atomes de carbone sont représentés en bleu pâle, ceux d'azote en bleu foncé, ceux d'oxygène en rouge et ceux de soufre en jaune.

Salacinsky (1991) ont conservé la séquence de 18 acides aminés constituant cette boucle inhibitrice et l'ont maintenue sous forme de cycle au moyen d'un pont disulfure formé entre les cystéines de chaque extrémité (figure 9b). Le K_i obtenu pour la subtilisine BPN' est de 28 pM, comparativement à 29 pM pour la molécule entière, c'est-à-dire que la reconnaissance par l'enzyme ainsi que le pouvoir d'inhibition sont maintenus en conservant uniquement ces 18 résidus.

1.4 But et définition du projet de recherche

Comme nous l'avons mentionné, plusieurs approches ont été adoptées afin de développer des inhibiteurs des PCs. Certaines ont mené au développement d'inhibiteurs puissants présentant de très faibles constantes d'inhibition. Toutefois, la conception d'inhibiteurs spécifiques pour chacune des PCs demeure un objectif très important à atteindre. Cette étude vise à préparer de petits inhibiteurs cycliques de PC1/3 et de furine, deux membres de la famille qui ont des spécificités enzymatiques similaires. Le but ultime est de parvenir à produire des inhibiteurs à la fois puissants et capables de discriminer entre les deux enzymes. L'approche employée par Leatherbarrow et Salacinski consistant à synthétiser de petits peptides imitant la structure de plus gros inhibiteurs natifs s'est avérée valide et efficace. De plus, les PCs ayant un domaine catalytique semblable à celui des subtilisines, la séquence de 18 acides aminés conservée de la boucle inhibitrice de BSPI-2 a été choisie comme point de départ pour la synthèse de nos propres inhibiteurs. Des études préliminaires menées sur trois différentes séquences représentant des formes mutées de cette boucle, à savoir comportant des résidus importants pour la reconnaissance par les PCs, avaient permis d'observer, pour deux d'entre elles, un potentiel d'inhibition intéressant envers la furine et PC1/3 (Jean et al., 1994).

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Synthèse des peptides

2.1.1 Synthèse des peptides I-A, I-B, I-C et I-D

Les peptides ont été synthétisés selon la méthodologie de synthèse en phase solide, sur un synthétiseur manuel multiréacteur, en utilisant la chimie du 9-fluorènylméthoxycarbonyle (Fmoc). Un schéma résumant les étapes de synthèse est présenté à la figure 10. Les N- α -Fmoc-L-acides aminés nécessaires, incluant les groupements protecteurs usuels des chaînes latérales (Fields et Noble, 1990), c'est-à-dire trityl (Trt), 2,2,5,7,8-pentaméthylchromane-6-sulfonyl (Pbf), *tert*-butyle (tBu) et *tert*-butoxycarbonyl (BOC), ont été achetés chez Chem-Impex International (Wood Dale, IL, U.S.A.). Le premier résidu de chaque peptide a été attaché à 1g de résine Wang (alcool *p*-benzyloxybenzyle (100-200 mailles) avec copoly(styrène-1% divinylbenzène), Quantum Biotechnologies, Montréal, QC, Canada) ayant un taux de substitution initial de 1,12 mmole/g. Le protocole de Sieber pour l'incorporation du premier résidu N- α -Fmoc-acide aminé (Sieber, 1987) a été utilisé, et le peptide a été assemblé au moyen d'excès (3 éq.) de l'espèce réactive de chaque acide aminé protégé. La séquence du peptide I-A synthétisé (conservant la numérotation des acides aminés de la molécule BSPI-2 originale) est:

⁵³Cys(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Ile-Val-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Glu(tBu)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Ile-Asp(tBu)-Arg(Pbf)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Ser(tBu)-Phe-Cys(Trt)⁷⁰.

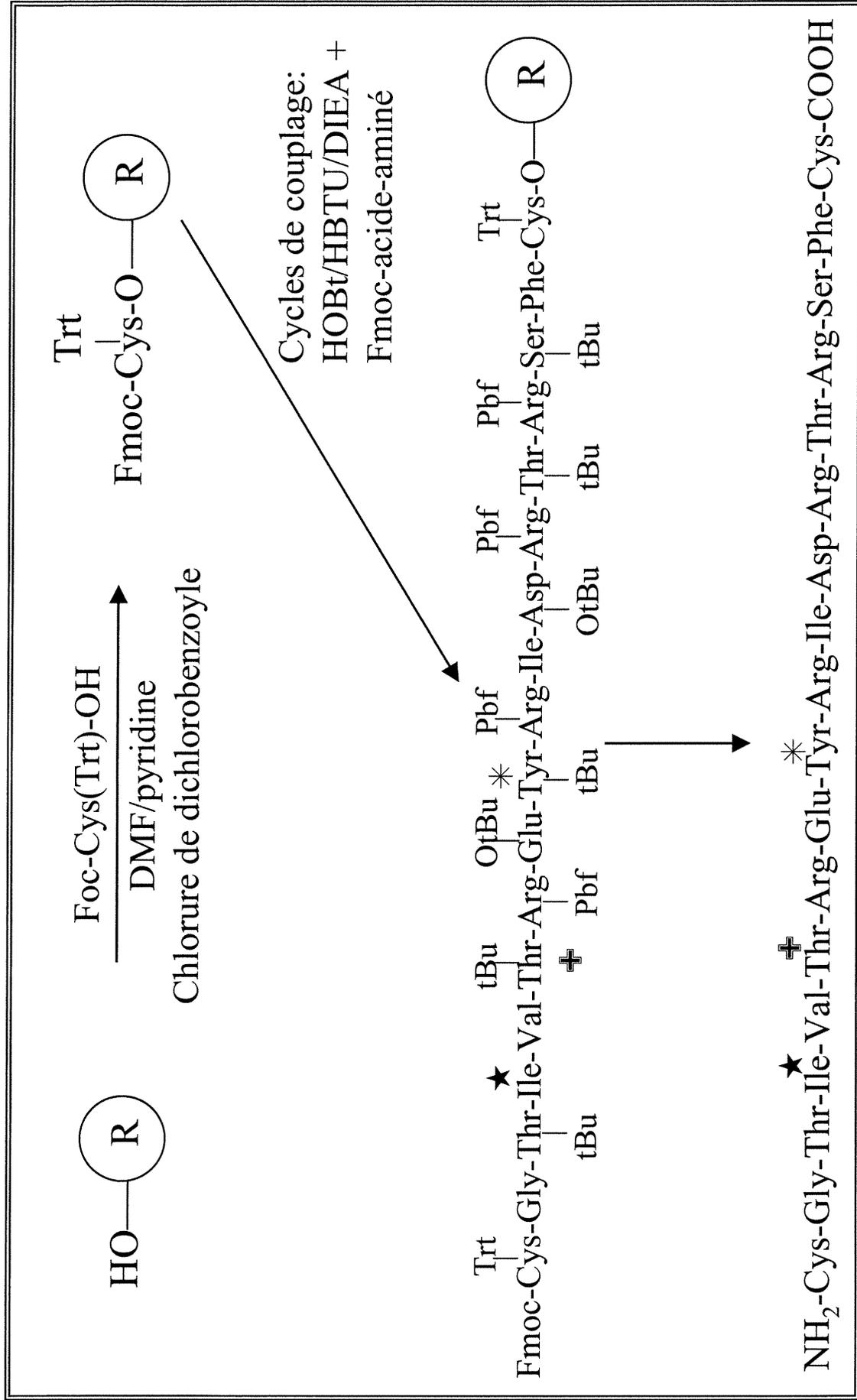


Figure 10 : Schéma de synthèse du peptide I-A en chimie Fmoc. Les symboles représentent les substitutions qui ont été apportées lors de la synthèse simultanée des autres peptides : *, Lys (Boc) pour I-A, I-C et I-D ; ★, Arg (Pbf) pour I-B et I-D ; †, Lys (Boc) pour I-D. Le symbole - R représente la résine Wang utilisée comme phase solide.

Les autres peptides ont été synthétisés simultanément en substituant Lys(Boc) à Tyr; Arg(Pbf) à Ile en position 56 pour I-B et I-D; et Lys(Boc) à Thr(tBu) en position 58 pour I-D.

Les couplages ont été effectués dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF, Fisher Scientific, Montréal, QC, Canada), en utilisant comme agent de couplage l'hexafluorophosphate de 2-(1 H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,tétraméthyluronium (HBTU, Quantum Biotechnologies), en présence de 1-hydroxybenzotriole monohydraté (HOBt, Quantum Biotechnologies) comme catalyseur, et de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA, Aldrich, Oakville, ON, Canada). Un rapport de 3:1:3 éq. relativement à la substitution de la résine avec le premier résidu a été favorisé pour le HBTU, le HOBt et le DIEA respectivement. La durée des réactions de couplage était de 30 minutes, et le test de Kaiser, une technique de coloration des amines libres à la ninhydrine (Kaiser, et al., 1970), nous permettait de vérifier que tous les peptides en formation avaient incorporé le résidu. Si nécessaire, la réaction de couplage était reprise avec la moitié des quantités de réactifs. Après l'obtention d'un test négatif, l'échantillon de résine-peptide ne se colorant pas en bleu, le groupement Fmoc était retiré avec une solution à 20% (v/v) de pipéridine (Aldrich) dans le DMF pour permettre le couplage de l'acide aminé suivant.

Après une dernière étape de déprotection du groupement du résidu N-terminal, la résine a été abondamment lavée avec du DMF, suivi de *t*-amyl alcool, d'acide acétique glacial, de méthanol et finalement d'éther, puis séchée sous vide. Les peptides ont été ensuite clivés de la résine et leurs groupements protecteurs retirés en les mettant à réagir durant 2 heures dans une solution à 2,5% 1,2-éthanedithiol (v/v), 2,5% H₂O (v/v) et 2% phénol (p/v) dans l'acide trifluoroacétique (TFA, Halocarbon, Hackensack,

NJ, U.S.A). La solution a ensuite été filtrée, et le filtrat évaporé partiellement avant d'être précipité avec de l'éther éthylique (Et₂O) anhydre.

2.1.2 Synthèse des peptides ψ -B et ψ -D

Dans le but d'introduire un lien isostère de type méthylèneamine ψ [CH₂-NH] entre les acides aminés en position P1 et P1' des peptides ψ -B et ψ -D, nous avons employé la méthode consistant à produire la forme aldéhyde de l'acide aminé P1, dans ce cas-ci l'Arg7, pour ensuite l'introduire dans le peptide en formation par une réaction d'alkylation réductrice.

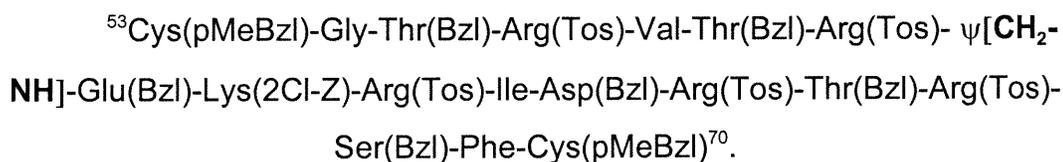
2.1.2.1 Formation d'un acide aminé argininal

Nous avons utilisé la méthode de Guichard et al. (1993) pour former l'argininal à partir de l'acide-aminé BOC-(Z)₂-Arg-OH (Chem-Impex International). Les principales étapes sont la formation d'un diméthylhydroxamate (BOC-(Z)₂-Arg-N(Me)OMe), suivi de sa réduction en forme aldéhyde BOC-(Z)₂-Arg-CHO. L'évolution de la réaction a été suivie par chromatographie en couche mince (CCM) sur des plaques recouvertes de gel de silice, avec le système de solvants acétate d'éthyle (EtOAc)/hexane 2:3. Les produits obtenus à chacune des étapes ont été caractérisés par résonance magnétique nucléaire (RMN) sur un appareil Varian VXR-400S de 400 MHz. Les déplacements chimiques ont été obtenus par rapport à la référence du tétraméthylsilane.

2.1.2.2 Synthèse

Comme pour les peptides précédents, nous avons employé une méthodologie de synthèse en phase solide, mais cette fois en utilisant la chimie BOC. Les N- α -Boc-L-acides aminés nécessaires, incluant les

groupements protecteurs usuels des chaînes latérales, c'est-à-dire par-methylbenzyle (pMeBzl), benzyle (Bzl), tosyle (Tos) et 2-chlorobenzoyloxycarbonate (2Cl-Z), ont été achetés chez Chem-Impex International. Le premier résidu de chaque peptide, Boc-Cys(pMeBzl)-OH a été attaché à 1g de résine chlorométhylée (Bio-Beads S-X1 (200-400 mailles), Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) par formation d'un sel de césium, comme décrit par Gisin (1973). La séquence du peptide ψ -B synthétisé est:



Le peptide ψ -D a été synthétisé simultanément en substituant Lys(2Cl-Z) à Thr(Bzl) en position 58.

Les couplages ont été effectués dans le DMF, en utilisant comme agent de couplage l'hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium (BOP, Albatros Chem Inc, Montréal, QC, Canada), en présence DIEA. Un rapport de 3 :5 éq. respectivement relativement à la substitution de la résine avec le premier résidu a été favorisé. La durée des réactions de couplage était de 45 minutes, suivi du test de Kaiser, tel que décrit précédemment. Le déprotection du groupement Boc était effectuée dans une solution de 40% TFA (v/v) dans le dichlorométhane (DCM).

Nous avons employé la méthode décrite par Sasaki et Coy (1987) pour l'introduction de l'argininal dans le peptide en formation à l'aide du cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN , Aldrich) comme agent d'alkylation sélectif (Borch et al., 1971) permettant la formation du lien $\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$.

Les peptides ont été clivés de la résine et leurs groupements protecteurs retirés en les mettant à réagir durant 1 heure dans 1 mL/g de résine-peptide de m-crésol et de diméthylsulfure, et 10 mL/g de résine-peptide d'acide fluorhydrique (HF) liquide. Les peptides ont été récupérés en les solubilisant dans du TFA pur, et la solution évaporée partiellement pour ensuite précipiter les peptides avec Et₂O anhydre.

2.2 Purification des peptides

2.2.1 Purification des peptides bruts

2.2.1.1 Peptides I-A, I-B, I-C et I-D

Les peptides bruts ont été dissous dans un volume minimal de TFA pur, et la solution résultante ajoutée goutte-à-goutte à une solution 0,06% TFA/H₂O, avant de les purifier par chromatographie liquide haute performance sur phase inverse (RP-HPLC), au moyen d'une colonne Delta Pak C18 (147 mmX30cm, 15 µm, 300Å, Waters, Mississauga, ON, Canada) reliée à un système Waters Prep LC500A et à un détecteur d'absorbance de modèle 441 équipé d'une lampe au deutérium. Les peptides ont été élués à l'aide d'un gradient linéaire d'acétonitrile (ACN) de 5 à 55% dans 0,06% TFA en 120 minutes, à un débit de 40 mL/min, et détectés à 230 nm. Les fractions collectées correspondant au pic d'éluion des peptides ont été analysées par spectrométrie de masse (voir plus bas), et RP-HPLC sur colonne Jupiter C18 (250x4,6 mm, 10 µm, 300 Å, Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.) reliée à un système Beckman Gold avec échantillonneur de modèle 507E, pompes 128 et détecteur 168 avec lampe au deutérium et arrangement de diodes (Beckman, Mississauga, ON, Canada), avec un

gradient linéaire d'ACN de 20 à 60% dans 0,06% TFA en 20 min, à un débit de 1,5 mL/min. L'absorbance des différents pics a été mesurée à 230 nm. Les peptides collectés ont été lyophilisés et conservés à 4°C.

2.2.1.2 Peptides ψ -B et ψ -D

Les peptides bruts ont été purifiés tel que décrit ci-haut, mais en utilisant une colonne Jupiter C18 (250x21,2 mm, 15 μ m, 300 Å, Phenomenex) et un gradient linéaire d'ACN de 0 à 25% dans 0,06% TFA en 120 minutes, à un débit de 20 mL/min. Les fractions d'éluion ont été analysées par spectrométrie de masse (voir plus bas) et RP-HPLC sur colonne Vydac C18 (250x4,6 mm, 5 μ m, 300 Å, Chromatographic Sciences Company, St-Laurent, Québec, Canada) avec un gradient linéaire d'ACN de 10 à 50% dans 0,06% TFA en 30 min, à un débit de 1 mL/min, en utilisant un appareil Varian 9010 (Varian Chromatography Systems, Georgetown, ON, Canada), relié à un détecteur de modèle Varian 9050 dont la longueur d'ondes est fixée à 225 nm. Le chromatogramme obtenu a été analysé à l'aide du logiciel Star Chromatography Workstation (Varian Chromatography Systems). Les peptides collectés ont été lyophilisés et conservés à 4°C.

2.3 Cyclisation des peptides

Nous avons observé qu'une partie des peptides en solution subissait une cyclisation spontanée par oxydation à l'air ambiant. Cependant, pour obtenir une cyclisation de la totalité de l'échantillon, les peptides ont été incubés durant 30 min dans H₂O-NH₄OH à pH 9,7 et à 30°C. La solution a ensuite été mise à lyophiliser et les peptides ont été conservés à 4°C.

2.4 Alkylation des peptides linéaires

Les peptides non-cyclisés ont été dissous dans une solution de 0,4 M Tris-HCl à pH 8,4 contenant 6 M d'urée, après quoi la solution a été amenée à une concentration finale de dithiothréitol (DTT) de 10 mM, et laissée à réagir à température de la pièce durant 30 minutes sous atmosphère d'azote. Par la suite, 40 mM d'acide iodoacétique (concentration finale) a été ajouté et laissé à réagir durant 30 minutes sous atmosphère d'azote. Les peptides linéaires carboxyméthylés ont été repurifiés par RP-HPLC sur colonne CSC-Exsil C18 (250x4,6 mm, 10 μ m, 300 Å, Chromatography Sciences Company) avec un gradient linéaire d'ACN de 0 à 60% dans 0,1% TFA en 60 min suivant une étape isocratique de 5 min à 0% ACN, à un débit de 1 mL/min, en utilisant le même système Varian décrit à la section 2.2.1.2. Les peptides collectés ont été lyophilisés et conservés à -20°C.

2.5 Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse des peptides par spectrométrie de masse de type "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight" (MALDI-TOF) a été faite sur un appareil Voyager DE-Pro MALDI-TOF (PerSeptive Biosystems, Cambridge, Massachusetts, USA). Les ions chargés positivement ont été analysés en mode linéaire et réflexion.

2.5.1 Préparation des échantillons

2.5.2.1 Méthode “dried-droplet”

La méthode usuelle qui a été utilisée pour la préparation des échantillons est appelée la méthode “dried-droplet” (Jiménez et al., 1998). Une solution saturée de matrice, l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA, Aldrich), fraîchement préparée à une concentration de 10 mg/mL dans 50% (v/v) ACN et 0,3% TFA était mélangée dans un rapport 1:1 (ou 1:25 pour les fractions collectées suite à une purification par HPLC préparative) avec l'échantillon dissous dans 0,1% TFA. Un μ L de la solution était déposé sur la plaque puis laissé à sécher à l'air libre.

2.5.2.2 Échantillon élué d'un “ZipTip”

Certains échantillons contenant des peptides non purifiés ou contenant une quantité importante de sels, étaient déposés sur la plaque en utilisant des embouts ZipTip™ C₁₈ (Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.A.). Les embouts étaient préalablement rincés avec 2 x 10 μ L d'une solution à 50% ACN, puis équilibrés avec 2 x 10 μ L de 0,1% TFA. Après aspiration de l'échantillon et lavage avec une solution de 0,1% TFA, les peptides liés étaient élués avec 10 μ L d'une solution de 10 mg/mL HCCA dans 50% ACN.

2.5.2.3 Méthode à la nitrocellulose

Pour analyser les échantillons de très faibles concentrations, nous avons utilisé le protocole de Landry et al. (2000) utilisant la nitrocellulose, composé qui permet d'augmenter l'efficacité d'ionisation des molécules, et ainsi leur détection, en favorisant la formation d'une couche de matrice

mince et homogène. La préparation de l'échantillon était identique à la méthode "dried-droplet", mais la matrice était cette fois préparée à une concentration de 40 mg/mL dans l'acétone, de même qu'une solution à 20 mg/mL de nitrocellulose (Aldrich). Ces deux solutions étaient ensuite mélangées avec du 2-propanol dans un rapport 2:1:1 respectivement.

2.6 Analyse d'acides aminés

L'analyse de la composition en acides aminés des peptides synthétiques a été effectuée après les avoir hydrolysés dans une solution de HCl 5,7 N. La réaction a été faite sous vide et à 110°C pendant 24 h, après quoi les échantillons ont été déposés dans un auto-analyseur de modèle 6300 de Beckman. Le système de détection post-colonne de la réaction à la ninhydrine était couplé à un intégrateur de modèle Varian DS604.

2.7 Essais enzymatiques

Tous les essais ont été réalisés à température de la pièce dans un volume final de 100 μ L, dans des plaques blanches à fond plat de 96 puits (Dyner Technologies, Chantilly, VA, U.S.A.). Le substrat fluorescent utilisé était le pyrGlu-Arg-Thr-Lys-Arg-4-méthylcoumarin-1-amide (pERTKR-MCA, Peptides International, Louisville, KY, U.S.A.), à des concentrations de 50 ou 100 μ M à partir d'une solution stock de 500 ou 1000 μ M dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). La fluorescence du groupement 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC) libéré par l'hydrolyse enzymatique a été mesurée (sous forme de pourcentage de fluorescence et convertie grâce à une

courbe standard en μ moles d'AMC produites par heure) à l'aide d'un spectrofluoromètre Perkin-Elmer LS 50B (Beaconsfield, Buckinghamshire, Angleterre), à une longueur d'onde d'excitation de 370 nm et longueur d'onde d'émission de 460 nm.

La PC1/3 utilisée a été produite par expression du gène codant pour la préproPC1/3 dans le baculovirus (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus), suivant l'infection de cellules ovariennes d'insectes *Spodoptera frugiperda* de la lignée Sf9 (Boudreault et al., 1998a). Les formes de PC1/3 récupérées dans le milieu de culture des cellules en absence de sérum (milieu "serum-free" SF-900) de 30 à 40 heures suivant l'infection virale sont de 85 et 71 kDa, et sont respectivement équivalentes aux formes de 87 et 66 kDa exprimées par la majorité des autres systèmes. La furine a quant à elle été obtenue de la lignée cellulaire Schneider 2 (S2) de drosophile transfectée par un plasmide épisomal encodant le hSPC1 (Denault et al., 2000). Les protéines recombinantes ont été recueillies dans le milieu sans sérum après 21 jours. Selon la préparation enzymatique de laquelle elles étaient prélevées, les quantités d'enzymes PC1/3 et furine utilisées étaient ajustées pour travailler à une activité spécifique d'environ 7,6 μ M/h d'AMC produit.

2.7.1 Essais avec hFurin et hSPC1

La forme BCRD de la furine (before cystein-rich domain, une forme d'environ 50 kDa, tronquée avant son domaine transmembranaire qui permet sa sécrétion dans le milieu de culture des cellules) était incubée à pH 7, à des concentrations finales de 0,1 M Tris et 1 mM CaCl₂, selon les conditions optimales déterminées par Cieplik et al. (1998). Le substrat et l'inhibiteur étaient ajoutés immédiatement, sans temps de préincubation. Les essais ont été effectués suivant la même méthodologie avec hSPC1.

2.7.2 Essais avec mPC1/3

PC1/3 était d'abord préincubée durant 30 minutes à température de la pièce, à pH 6 et à des concentrations finales de 100 mM d'acétate de sodium (NaOAc) et 10 mM de CaCl_2 , avant d'être mis en présence des réactifs, tel que décrit par Boudreault et al. (1998a).

2.7.3 Essais avec hSPC7

Le K_m de hPC7 pour le pERTKR-MCA est d'environ 62 μM , donc la concentration finale de substrat utilisée était de 250 μM . L'incubation a été faite à pH 6,5 à des concentrations finales de 20 mM bis-Tris et 1 mM de CaCl_2 .

2.8 Modélisation du complexe PC1/3 et de la boucle BSPI-2

Tous les calculs ont été effectués en utilisant le logiciel SYBYL (Tripos Ass., St-Louis, MO) sur un poste de travail Silicon Graphics Indigo² Extreme. La fonction « force field » du logiciel a été utilisée pour les calculs d'énergie en employant la constante diélectrique 1. Le modèle pour PC1/3 a été construit en se basant sur la structure publiée de la furine (Siezen et al., 1994) en procédant par modelage par homologie. Les acides aminés de la furine ont été mutés individuellement suivant la séquence de PC1/3, puis leurs chaînes latérales ont été positionnées en utilisant la fonction « SCAN » du logiciel. Ainsi les atomes du squelette protéique étaient maintenus fixes tandis que les chaînes latérales subissaient une à la fois une rotation aléatoire jusqu'à ce qu'une position stériquement acceptable soit trouvée. La structure cristallographique de BSPI-2 (McPhalen et James, 1987) a

ensuite été positionnée dans le site actif de PC1/3. Les empêchements stériques ont été résolus en utilisant la procédure « SCAN » décrite ci-haut. À ce stade, tous les résidus du peptide qui n'étaient pas en contact avec PC1/3 ou impliqués dans un pont hydrogène intramoléculaire ou un contact de Van der Waal's significatif ont été considérés comme des points possibles de mutation ou de délétion. Dans chaque cas le complexe résultant de ces modifications a été minimisé pour permettre la relaxation des atomes et éliminer tout conflit stérique ou de longueur des liens.

CHAPITRE III: RÉSULTATS

3.1 Synthèse et purification des peptides

En utilisant une technique de synthèse sur phase solide et la chimie Fmoc, nous avons synthétisé quatre peptides dérivés de la séquence de la boucle réactive de BSPI-2 (figure 11). En premier lieu, un résidu Arg en position P1 a été introduit pour tous les peptides, pour correspondre à la régiospécificité des PCs au sous-site S1. De plus, I-B et I-D ont été synthétisés pour répondre au critère qui requiert, comme nous l'avons mentionné au chapitre I, la présence d'au moins un résidu basique en P2, P4 ou P6 pour les substrats des PCs; ainsi, la reconnaissance du peptide par l'enzyme est augmentée. Nous avons aussi introduit un résidu Lys en position P2', qui est peu fréquemment retrouvé chez les substrats ou inhibiteurs des PCs. Le plus souvent, le résidu qui occupe cette position possède une chaîne latérale hydrophobe et aliphatique (Seidah et al., 1995; Seidah et Chrétien, 1999). Cependant, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire avaient permis d'observer qu'une Lys à cette position pouvait améliorer significativement le pouvoir d'inhibition de décapeptides synthétiques. Il est possible que la charge positive introduite par la Lys provoque une interférence avec l'action protéolytique de l'enzyme.

L'échelle de synthèse était au départ de 1,12 mmole peptide/g de résine, ce qui a généré en moyenne un rendement de peptides bruts de 86% pour les quatre peptides bruts. La purification de ces derniers sur colonne d'HPLC préparative nous a permis d'isoler uniquement les peptides voulus parmi tous les produits de réactions secondaires qui se sont formés, tel que vérifié par HPLC analytique et par spectrométrie de masse de type

	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'		
BSPI -2:	Val 53 Gly 54 Thr 55 Ile 56 Val 57 Thr 58 Met 59 Glu 60 Tyr 61 Arg 62 Ile 63	Val 57 Thr 58 Thr 59 Arg 60 Glu 61 Tyr 62 Ile 63	Thr 58 Thr 59 Arg 60 Glu 61 Tyr 62 Arg 63	Met 59 Glu 60 Tyr 61 Arg 62 Ile 63	Glu 60 Glu 61 Glu 62 Glu 63	Glu 60 Glu 61 Glu 62 Glu 63	Tyr 61 Tyr 62 Tyr 63	Arg 62 Arg 63	Ile 63	Asp 64 Arg 65 Thr 66 Arg 67 Ser 68 Phe 69 Val 70
I-A:	Cys Gly Thr Ile	Cys Gly Thr Val	Cys Gly Thr Thr	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Glu	Cys Gly Thr Glu	Cys Gly Thr Tyr	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Ile	Cys Gly Thr Arg Ser Phe
I-B:	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Val	Cys Gly Thr Thr	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Glu	Cys Gly Thr Glu	Cys Gly Thr Lys	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Ile	Cys Gly Thr Arg Ser Phe
I-C:	Cys Gly Thr Ile	Cys Gly Thr Val	Cys Gly Thr Thr	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Glu	Cys Gly Thr Glu	Cys Gly Thr Lys	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Ile	Cys Gly Thr Arg Ser Phe
I-D:	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Val	Cys Gly Thr Lys	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Glu	Cys Gly Thr Glu	Cys Gly Thr Lys	Cys Gly Thr Arg	Cys Gly Thr Ile	Cys Gly Thr Arg Ser Phe

Figure 11: Séquence en acides aminés des peptides synthétisés.
 La numérotation des acides aminés est celle de la molécule BSPI-2 originale.

MALDI-TOF (figure 12) des fractions collectées. Ces résultats ont également été confirmés par analyse des acides aminés (tableau II). Cette technique s'avère utile, bien qu'elle soit moins déterminante que les précédentes comme moyen de caractérisation, puisque moins précise. Cette même analyse nous a révélé que les peptides qui coéluent avec I-A, I-B et I-C et qui génèrent de petits pics sur le spectre de masse des peptides (figure 12) sont minoritaires et négligeables relativement au peptide d'intérêt. Par exemple, nous avons identifié à la figure 12 pour le peptide I-C, un analogue qui n'a pas incorporé un des résidus Thr lors de la synthèse (différence de 100 en spectrométrie de masse).

3.2 Cyclisation et linéarisation des peptides

Sur le profil d'HPLC préparative de chacun des peptides bruts, nous avons constaté que le peptide d'intérêt éluait en deux pics distincts. La masse du peptide contenu dans la fraction correspondant au premier pic avait une différence de deux avec la masse du peptide désiré, tandis que le deuxième pic avait exactement la bonne masse. Un exemple est illustré pour le peptide I-A à la figure 13. Cela suggérait qu'il pouvait s'agir des formes cyclisée et linéaire du peptide. Ainsi, une partie des peptides en solution se serait cyclisée spontanément par oxydation des fonctions -SH des Cys à l'air ambiant. Pour vérifier cette hypothèse, après avoir combiné les fractions correspondant aux deux pics, nous avons incubé les peptides préalablement lyophilisés à pH basique (9,7) en chauffant légèrement (30°C), pour favoriser la formation de ponts disulfures. Le profil d'HPLC analytique du peptide, qui présentait deux pics à l'origine (figure 14a), a été modifié par cette incubation, c'est-à-dire que le pic avec le plus grand temps de rétention (t_r) est disparu au profit du pic précédent (figure 14b). Au

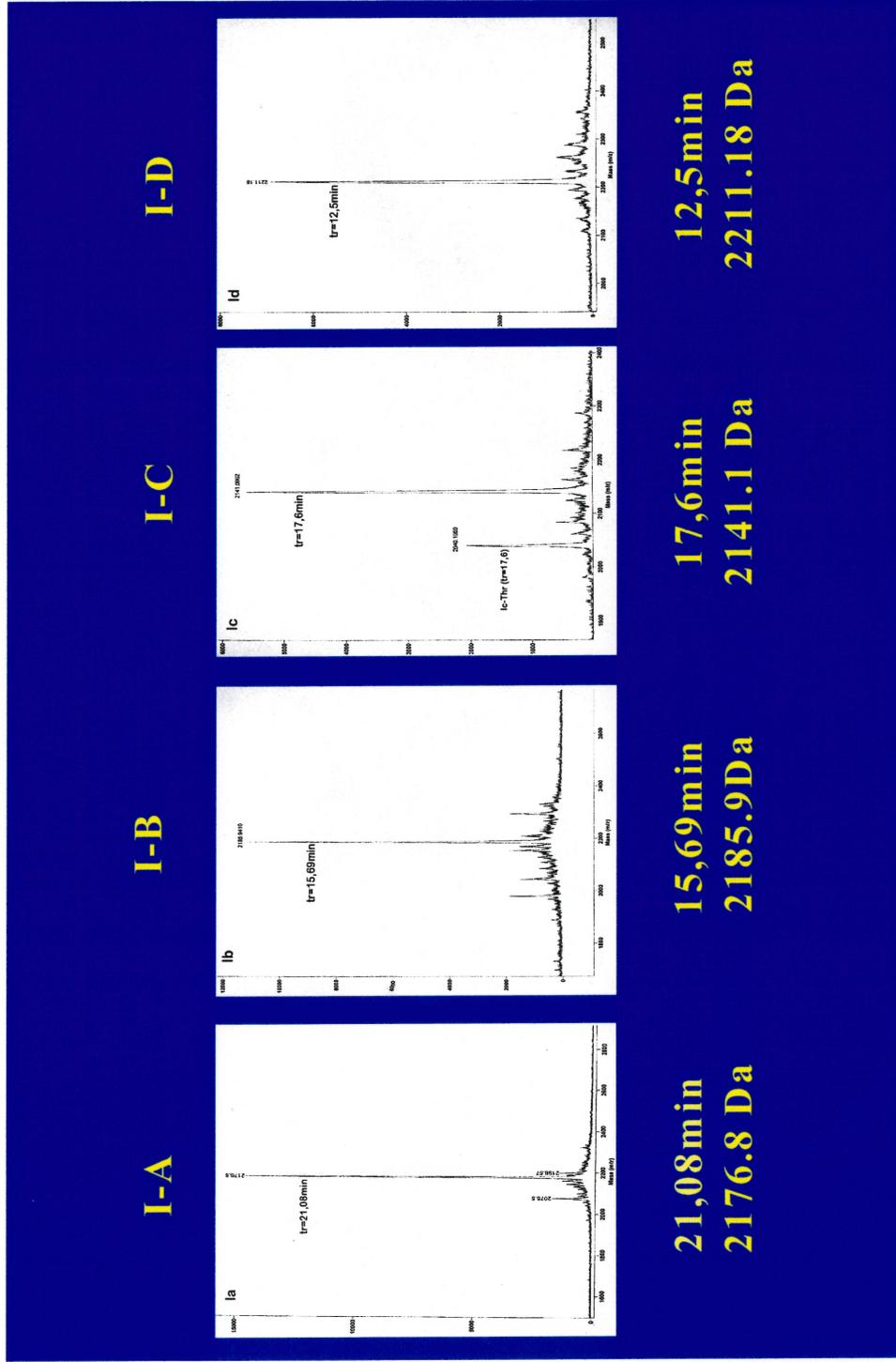


Figure 12: Spectre de masse des peptides purifiés. Les temps de rétention de chacun des peptides (élus sur colonne d'HPLC analytique Jupiter C18 avec un gradient linéaire d'ACN de 20 à 60% dans 0,06% TFA en 30 min tel que décrit dans le texte) ainsi que les masses mesurées sont indiqués au bas de la figure pour plus de clarté.

Tableau II:

Analyse des acides aminés des peptides cycliques (C) et linéaires (L), en comparaison avec les résultats attendus (Att.). Les Cys ne sont pas détectées car elles sont détruites lors de l'hydrolyse. De plus, le lien isostère étant non-hydrolysable, les résidus Glu et Arg de part et d'autre de ce lien ne sont pas détectés pour chacun des pseudo-peptides.

	I-A-C	I-A-L	Att.	I-B-C	I-B-L	Att.	I-C-C	I-C-L	Att.	I-D-C	I-D-L	Att.	ψ-B-C	ψ-B-L	Att.	ψ-D-C	ψ-D-L	Att.
Asp	1,60	1,21	1	1,38	1,28	1	1,29	1,24	1	1,17	1,16	1	1,17	1,51	1	1,28	1,05	1
Thr	2,85	2,73	3	2,60	2,12	3	2,58	2,54	3	1,87	1,82	2	2,67	2,72	3	2,06	1,92	2
Ser	1,36	1,15	1	1,12	1,35	1	1,08	1,08	1	1,09	1,05	1	1,09	1,29	1	1,15	1,03	1
Glu	1,26	1,16	1	1,20	1,48	1	1,16	1,18	1	1,11	1,08	1	-	-	0	-	-	0
Pro	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Gly	0,87	1,10	1	0,85	1,41	1	0,98	1,51	1	1,41	1,01	1	1,15	1,16	1	1,15	0,97	1
Ala	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Cys	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Val	0,85	0,86	1	1,00	0,98	1	0,96	0,98	1	0,94	1,09	1	1,05	0,81	1	0,87	0,86	1
Met	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Ile	1,51	1,66	2	0,91	0,90	1	1,68	1,62	2	0,84	0,95	1	0,84	0,85	1	0,85	0,93	1
Leu	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Tyr	0,81	0,92	1	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Phe	1,06	1,13	1	1,04	0,92	1	0,92	1,11	1	1,01	1,10	1	0,94	0,97	1	0,93	0,98	1
Lys	-	-	0	0,99	1,07	1	1,07	1,07	1	1,87	1,94	2	1,04	0,91	1	1,67	1,78	2
His	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Trp	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Arg	3,60	4,08	4	4,9	4,5	5	4,5	4,16	4	4,70	4,8	5	4,05	3,93	4	4,04	4,46	4

contraire, en incubant le peptide en présence de DTT, un agent de réduction des ponts disulfures, le pic avec le plus petit t_r sur le profil d'HPLC s'est redéplacé vers le pic suivant (figure 14c). Cela concorde avec les résultats des études préliminaires menées sur la conception d'inhibiteurs se basant sur la boucle réactive de BSPI-2: des peptides semblables ont été synthétisés et cyclisés par Jean et al. (1994), qui ont constaté que ces peptides linéaires étaient élués plus tardivement que leur contrepartie cyclique.

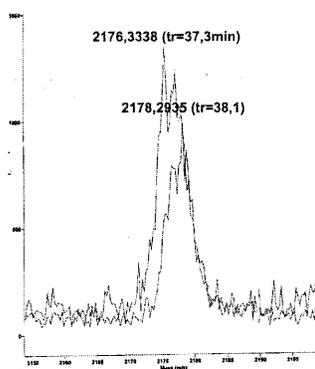


Figure 13: Superposition des spectres de masse des formes cyclique et linéaire du peptide I-A. Les temps de rétention des deux formes (éluées sur colonne d'HPLC analytique Jupiter C18 avec un gradient linéaire d'ACN de 20 à 60% dans 0,06% TFA en 30 min tel que décrit dans le texte) sont indiqués.

Nous avons observé que, même dans des conditions réductrices, une certaine proportion des peptides se referment sous forme cyclique en absence d'agent alkylant (figure 14c). Ainsi donc, après le traitement avec le DTT, nous avons ajouté de l'acide iodoacétique, dont le groupement carboxyméthyle réagit avec l'atome de soufre sur les chaînes latérales des Cys. La carboxyméthylation des Cys empêche que ces peptides ne se cyclisent à nouveau, ainsi tous les essais enzymatiques impliquant les peptides linéaires ont été effectués avec leur forme carboxyméthylée. Les autres peptides ont été incubés à pH 9,7 et 30°C pour assurer leur cyclisation complète.

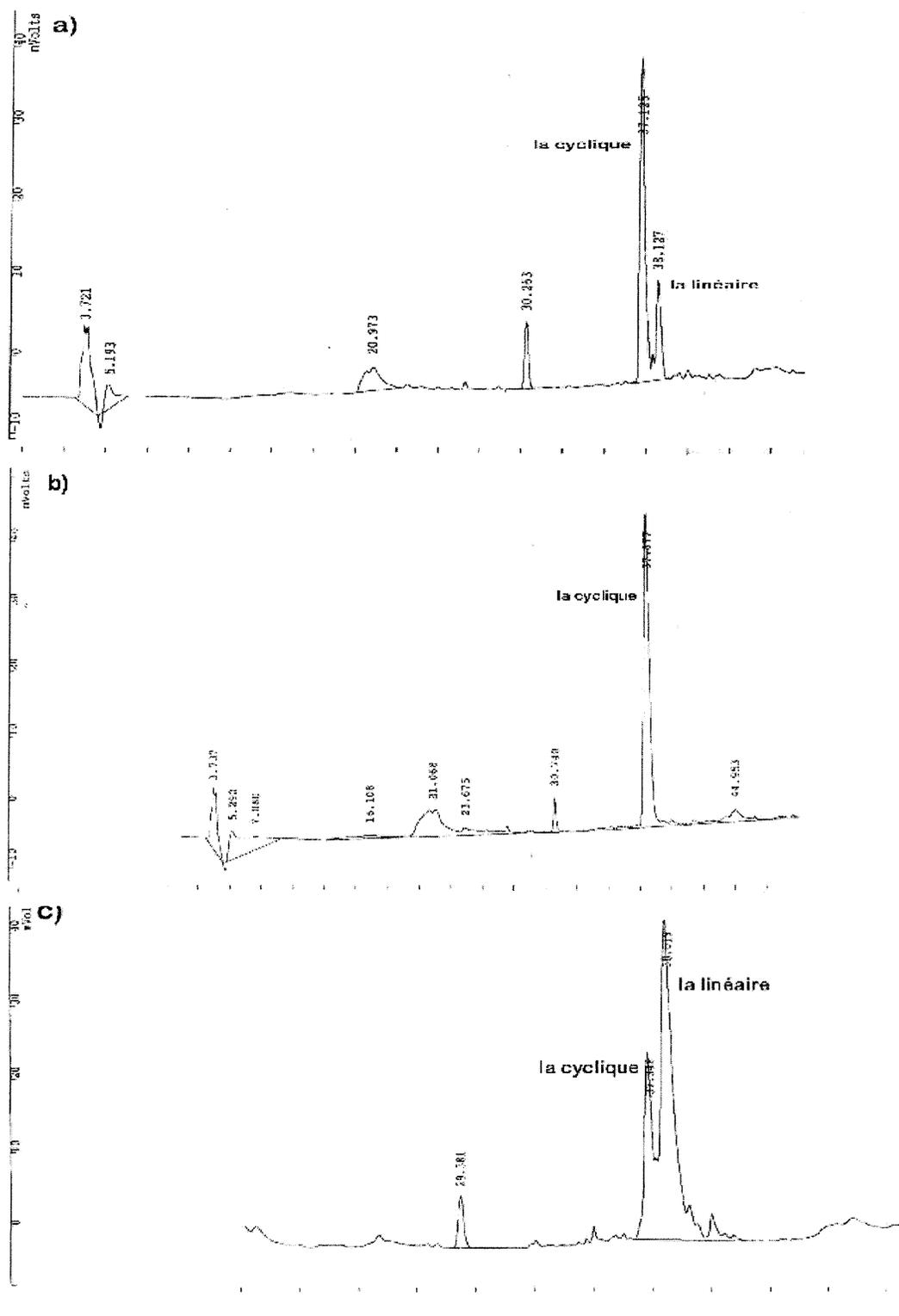


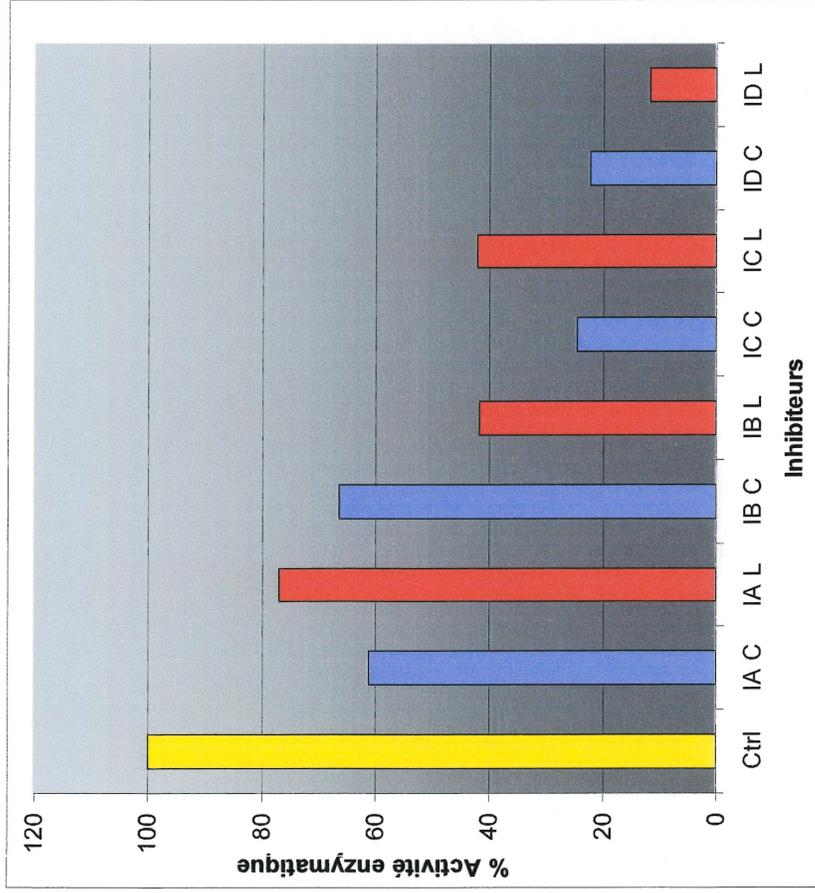
Figure 14: Profils d'HPLC des formes cyclique et linéaire du peptide I-A. a) Peptide purifié n'ayant subi aucun traitement. b) Peptide incubé à pH 9.7 et à 30°C durant 30 min. c) Peptide traité avec 10 mM DTT durant 30 min. Les autres pics apparaissant sur les profils sont des artefacts de la colonne puisqu'ils apparaissent lorsqu'aucun matériel n'est injecté.

3.3 Essais d'inhibition enzymatique

3.3.1 Résultats préliminaires

Pour avoir une vue d'ensemble de leur pouvoir d'inhibition, nous avons testé 20 μM de tous les peptides partiellement purifiés contre PC1/3 et la forme BCRD de la furine, produites par expression des gènes recombinants dans les cellules d'insectes de la lignée Sf-9 (Boudreault et al., 1998a), en présence de 100 μM du substrat pERTKR-MCA. Ce substrat fût caractérisé comme le substrat idéal pour la détection de l'activité de PC1/3 et de furine (Jean et al., 1993; 1995a), les valeurs de K_m des enzymes étant d'environ 23 et 5,9 μM respectivement (Jean et al., 1995b), dans leurs conditions optimales de pH et de concentration en calcium. Le graphique présenté à la figure 15 montre tout d'abord que le peptide I-A, qui ne comporte pas de résidu basique en P2, P4 ou P2', mais néanmoins possède dans sa structure quatre résidus Arg, ne constitue pas un inhibiteur des deux enzymes, et qu'il est particulièrement inefficace envers PC1/3. La forme linéaire contribue même à l'augmentation de l'activité de l'enzyme de 20% par rapport au contrôle sans inhibiteur. Les autres peptides, généralement davantage la forme linéaire, semblaient avoir un certain potentiel, notamment le peptide I-D envers les deux enzymes, et I-B et I-C envers PC1/3 en particulier. Toutefois, ces essais ont été effectués alors que les peptides n'avaient pas encore été traités pour être complètement soit sous leur forme cyclique (incubation en milieu basique) ou leur forme linéaire (carboxyméthylation), ainsi donc chaque échantillon peptidique contenait probablement en partie les deux formes. De plus, les conditions idéales de concentration de substrat et de peptide n'avaient pas encore été déterminées. C'est pourquoi nous mentionnons que ces observations n'étaient que préliminaires, et de fait les résultats obtenus par la suite dans

Furine



PC1/3

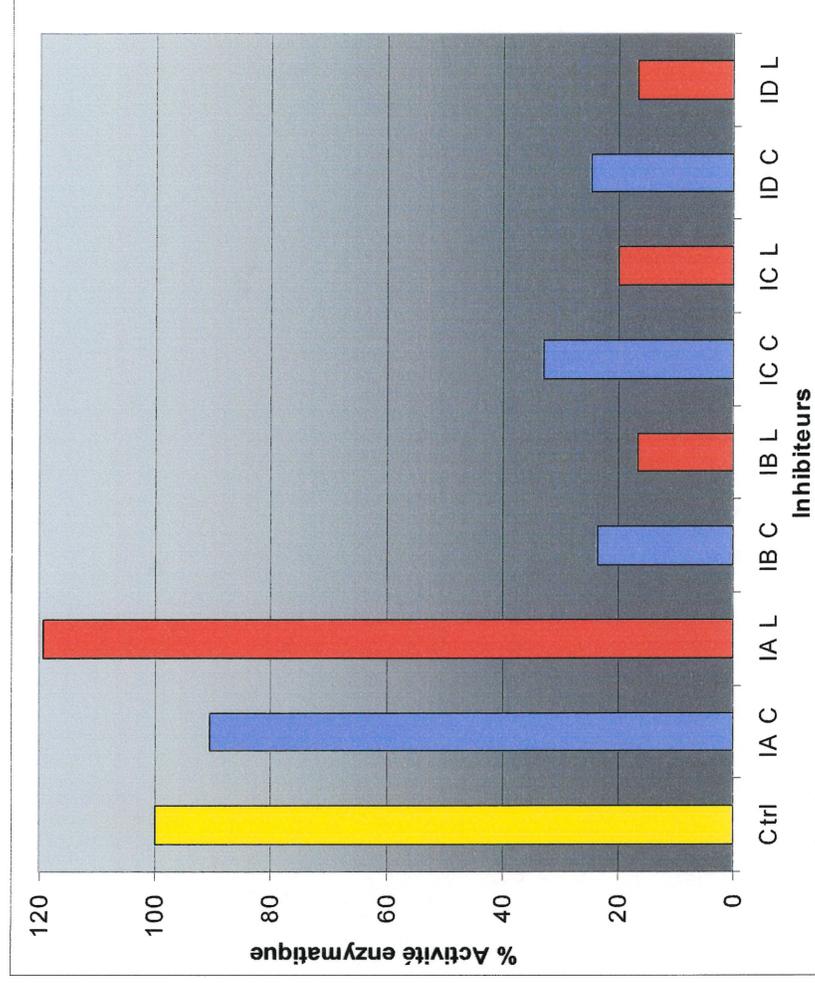


Figure 15: Résultats préliminaires d'inhibition de furine et de PC1/3. Les essais ont été effectués avec 20 μM des peptides partiellement purifiés incubés en présence de 100 μM de substrat pERTKR-MCA. Le contrôle représente l'incubation de l'enzyme avec le substrat en absence de peptide inhibiteur.

des conditions expérimentales plus rigoureuses et décrits à la section 3.3.3 différent sensiblement de ceux-ci.

3.3.2 Détermination des conditions expérimentales

Nous avons employé les méthodes graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden décrites au chapitre I afin de déterminer les valeurs de K_i de chacun des peptides, et ainsi cerner de façon plus exacte leur potentiel d'inhibition en fonction de leur séquence et de leur forme cyclique ou linéaire. Comme nous l'avons vu, ces méthodes nous donnent en même temps une indication des mécanismes par lesquels ces peptides exercent leur pouvoir d'inhibition.

Nous avons d'abord déterminé deux concentrations de substrat ayant des valeurs assez éloignées l'une de l'autre pour que la vitesse de l'enzyme varie de façon appréciable, sans toutefois se trouver aux extrémités de la courbe représentant la vitesse enzymatique en fonction de la concentration de substrat, c'est-à-dire trop près de zéro ou encore de V_{max} . Malgré leurs différences de K_m , des concentrations finales de 50 et 100 μM de pERTKR-MCA étaient des valeurs appropriées à la fois pour PC1/3 et pour furine. Au moment de mettre au point des expériences d'inhibition, on doit aussi tenir compte qu'il est nécessaire de travailler à des concentrations d'inhibiteur suffisamment nombreuses et élevées pour indiquer si la vitesse approche ou non de zéro lorsque l'on approche de la saturation de l'enzyme, mais sans pour autant être à saturation (Cornish-Bowden, 1995). Nous avons donc, pour chaque enzyme, déterminé expérimentalement six à sept concentrations de chacun des peptides pour lesquelles nous obtenions un niveau d'inhibition situé entre 20 et 80%.

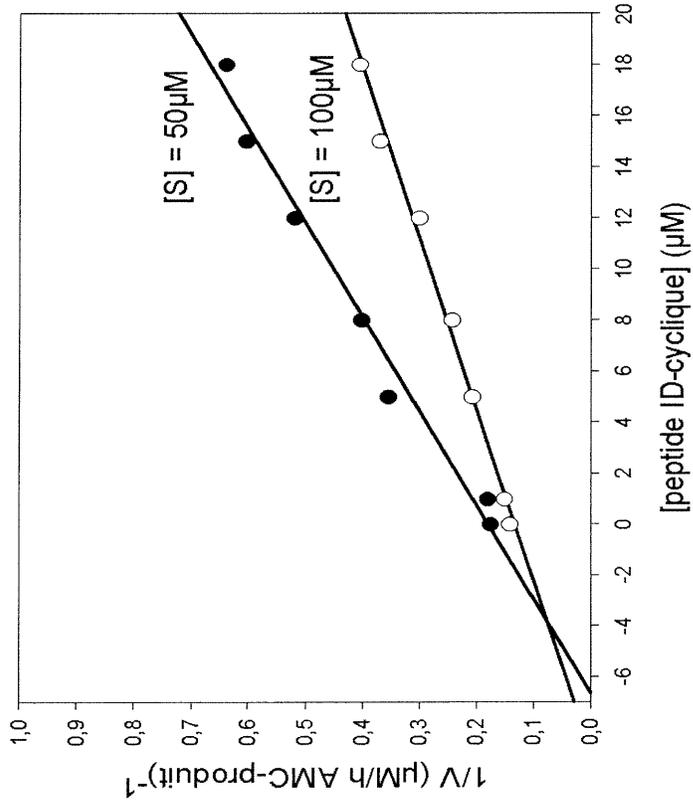
3.3.3 Détermination des K_i et mécanismes d'inhibition

Les essais ont été réalisés en incubant chacune des enzymes PC1/3 et furine avec chacune des deux concentrations de substrat, en présence de toutes les concentrations de chacun des inhibiteurs cycliques et linéaires, le tout effectué en duplicata. Pour chaque concentration d'inhibiteur en présence d'une des enzymes et d'une concentration de substrat donnée, une courbe mesurant la moyenne du pourcentage de fluorescence des deux puits en duplicata en fonction du temps était tracée, et la pente calculée par régression linéaire pour donner la vitesse de la réaction. À partir de ces données, les droites de Dixon et de Cornish-Bowden ont été tracées à l'aide du module « Enzyme Kinetic 1.0 » annexé au logiciel Sigma Plot 2000, et cela nous a permis d'obtenir les valeurs de K_i et leur erreur standard.

Le peptide I-D nous apparaissant comme celui ayant le plus de potentiel, que ce soit sous sa forme cyclique ou linéaire, nous l'avons testé en premier lieu. La forme cyclique a un K_i d'environ $3,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (tableau III), tel que déterminé par le point de rencontre des deux droites sur le graphique de Dixon (figure 16), et semble se comporter comme un inhibiteur compétitif de la furine, comme l'indiquent les droites parallèles sur le graphique de Cornish-Bowden (figure 16). Les graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden obtenus pour la forme linéaire, par contre, ont des droites qui se rencontrent exactement sur l'axe des x (figure 17), ce qui tend à démontrer que, quoi qu'ayant un K_i semblable de $4,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (tableau III), cet inhibiteur semble agir selon un mode différent de la forme cyclique, c'est-à-dire non-compétitif. Envers PC1/3, le peptide I-D s'est avéré être un inhibiteur encore plus puissant, tant sa forme cyclique que linéaire, pour lesquelles nous avons observé, par la représentation de Dixon, des K_i d'environ $0,6 \pm 0,03 \mu\text{M}$ (figure 18) et $0,3 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (figure 19) respectivement. Toutefois, les deux formes semblent agir de façon

compétitive envers cette enzyme, comme l'indiquent les droites parallèles sur les graphiques de Cornish-Bowden (figures 18 et 19).

Dixon



Cornish-Bowden

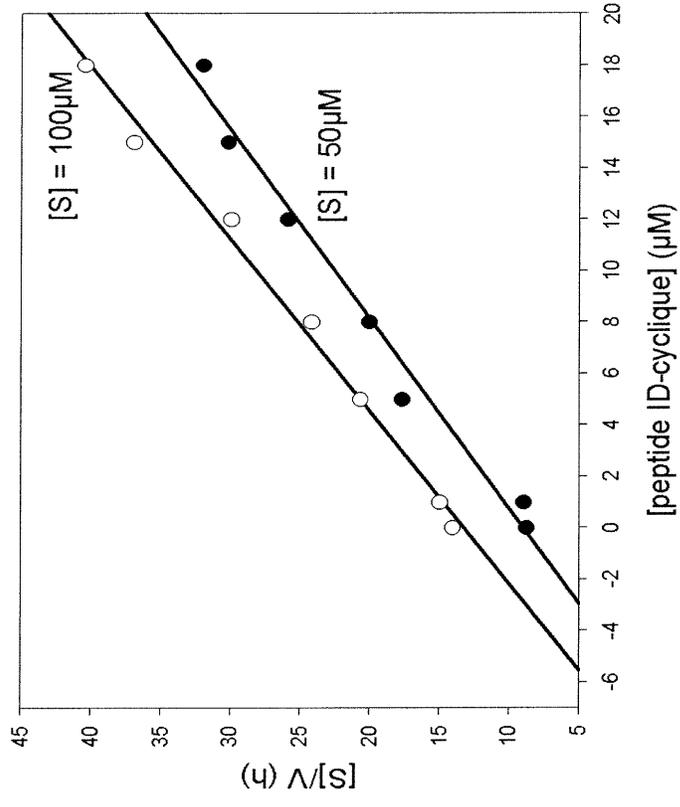
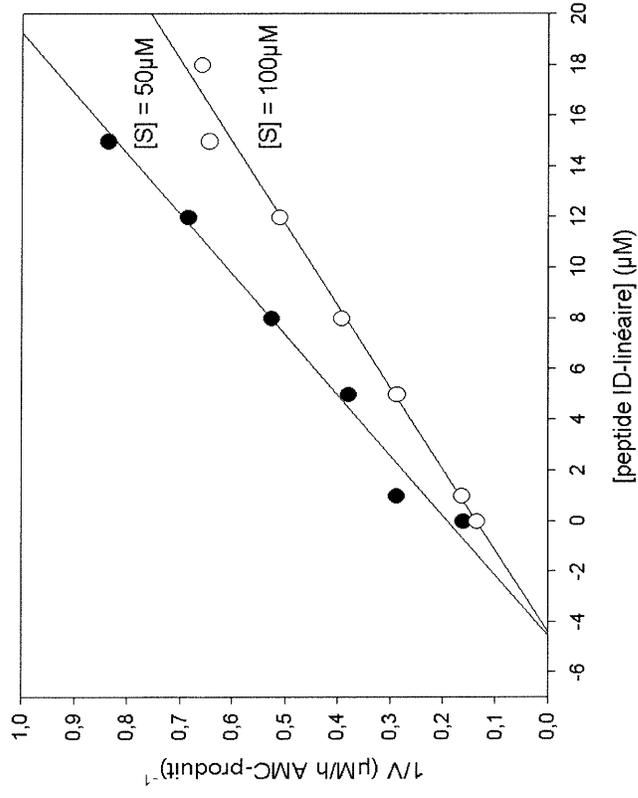


Figure 16: Détermination de la constante et du mécanisme d'inhibition du peptide I-D cyclique envers la furine à l'aide des représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden.

Dixon



Cornish-Bowden

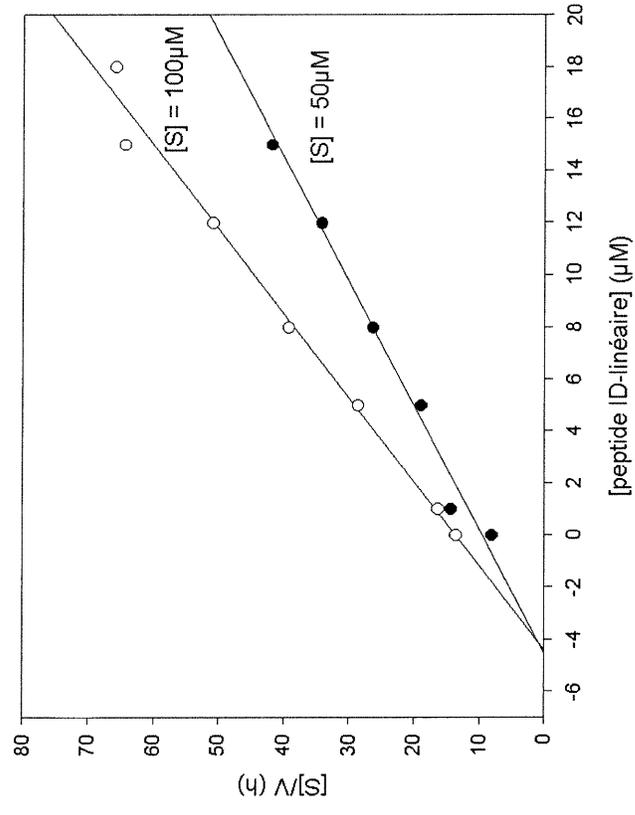


Figure 17: Détermination de la constante et du mécanisme d'inhibition du peptide I-D linéaire envers la furine à l'aide des représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden.

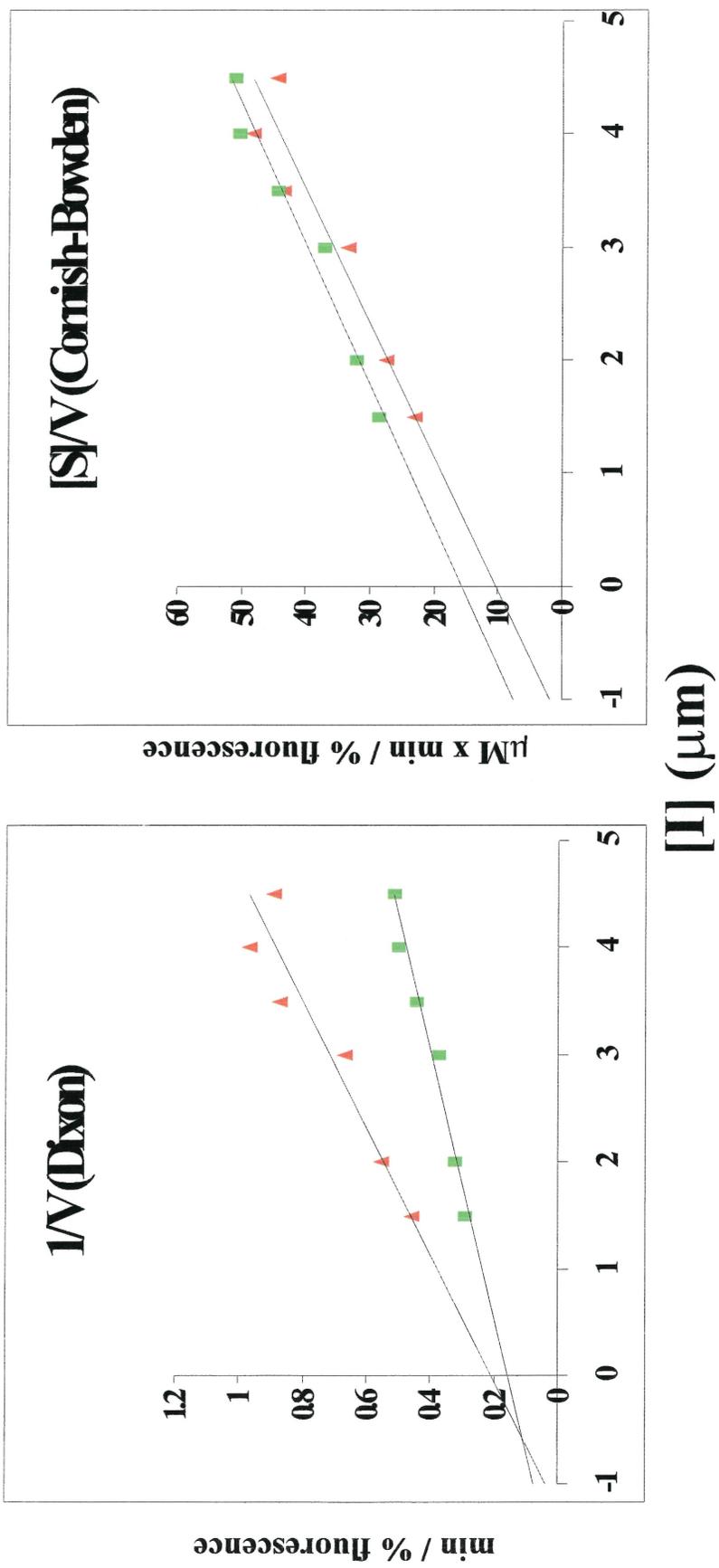


Figure 18: Détermination de la constante et du mécanisme d'inhibition du peptide I-D cyclique envers PC1/3 à l'aide des représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden.

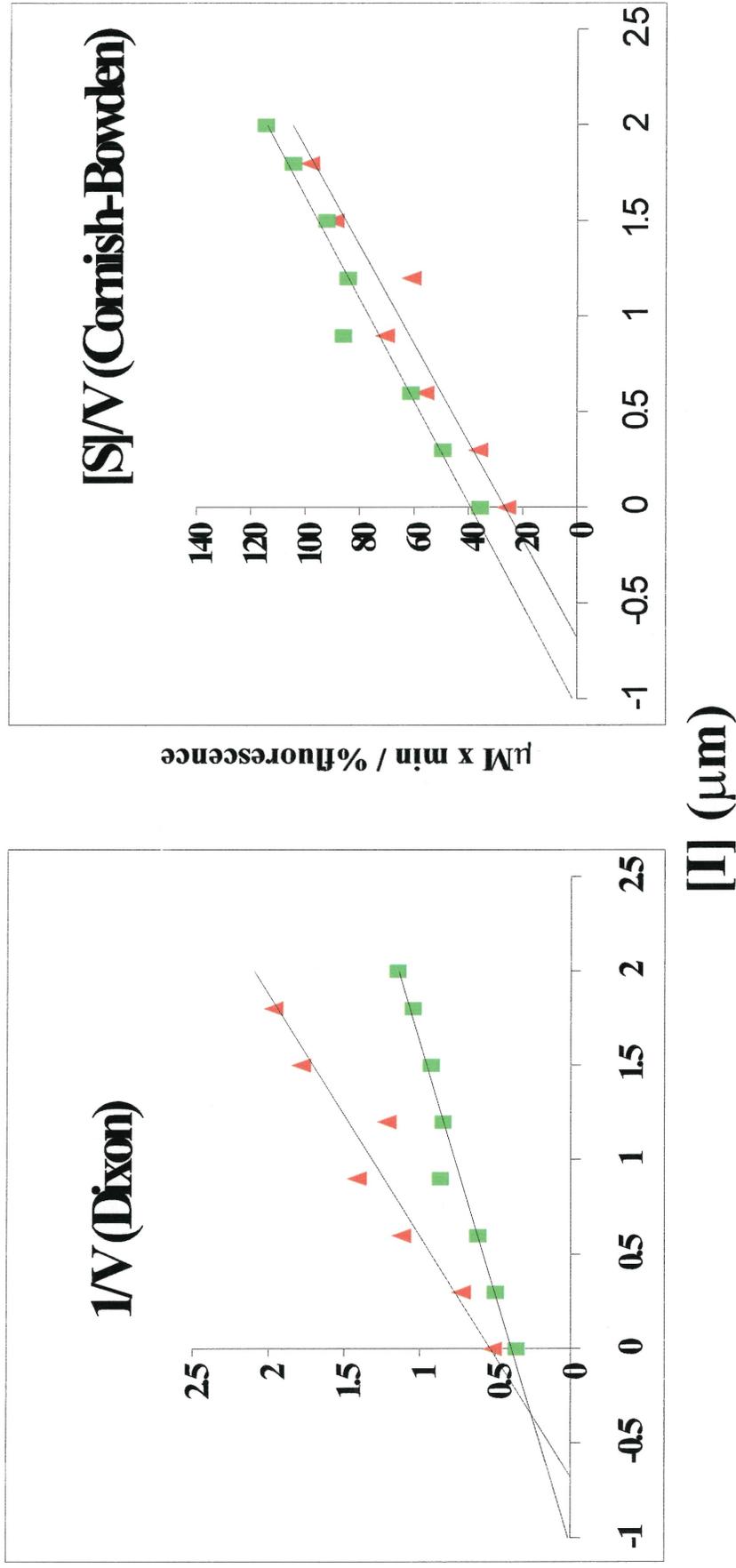


Figure 19: Détermination de la constante et du mécanisme d'inhibition du peptide I-D linéaire envers PC1/3 à l'aide des représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden.

Tableau III:

Comparaison des constantes et mécanismes d'inhibition des peptides envers la furine, déterminés à partir des représentations de Dixon et de Cornish-Bowden.

Peptide	K _i (μ M)	K _i ' (μ M)	Type d'inhibition
IA -L	---	---	nil
IA -C	---	---	nil
IB -L	9,2	39,5	mixte
IB -C	14,4	40,7	mixte
IC -L	35,3	44,6	mixte
IC -C	66,0	87,0	mixte
ID -L	4,5	---	non-compétitif
ID -C	3,9	---	compétitif

Tableau IV:

Comparaison des indices IC₅₀ d'inhibition des peptides envers PC1/3. Les mécanismes d'inhibition ont été évalués à partir des représentations graphiques de Dixon et de Cornish-Bowden, et les constantes d'inhibition calculées en relation avec les indices IC₅₀ pour une concentration de 50 μ M de substrat.

Peptide	IC ₅₀ (μ M)	K _i (μ M)	Type d'inhibition
IA -L	---	---	nil
IA -C	---	---	nil
IB -L	1,3	0,4	(compétitif)
IB -C	1,7	0,5	(compétitif)
IC -L	0,8	0,2	(compétitif)
IC -C	3,0	0,9	(compétitif)
ID -L	3,2	0,9	compétitif
ID -C	1,1	0,3	compétitif

Les résultats pour les autres peptides testés selon la même méthode envers la furine nous montrent que les peptides I-B et I-C agissent également comme des inhibiteurs avec des K_i de l'ordre des micromolaires, quoique dans une moindre mesure (tableau III). Cependant, les représentations graphiques de Cornish-Bowden correspondent à une inhibition de type mixte (données non montrées), c'est-à-dire que les droites pour chacune des concentrations de substrat se croisent sous l'axe des x.

Afin de comparer les peptides entre eux en termes d'inhibition de PC1/3, nous avons utilisé leurs valeurs d' IC_{50} (pour "inhibiting concentration 50"), déterminées sur une courbe de vitesse enzymatique en fonction de la concentration d'inhibiteur (tableau III). En effet, à l'exception des résultats présentés aux figures 18 et 19 avec les peptides I-C cyclique et linéaire, nous n'avons pu, pour des raisons techniques, utiliser la même méthode graphique que décrite précédemment. Des problèmes en laboratoire liés à l'expression de PC1/3 dans les cellules d'insectes infectées par le baculovirus ont causé une manque d'approvisionnement en enzyme, et nous n'aurions pu effectuer le nombre de mesures nécessaires à la validité de la méthode graphique.

L' IC_{50} est donné par la concentration d'inhibiteur causant 50% d'inhibition de l'enzyme. C'est un indice pratique d'efficacité, comparativement au K_i , qui est une mesure directe (de façon inverse) de l'affinité entre l'enzyme et l'inhibiteur. Cependant, une relation entre le K_i et l' IC_{50} peut être établie, et varie selon les conditions expérimentales et le mécanisme d'inhibition (Cheng et Prusoff, 1973; Chou, 1974). Dans le cas de l'inhibition compétitive, où l'inhibiteur et l'enzyme compétitionnent pour le même site, la fraction d'enzyme inhibée dépend de la concentration de substrat, c'est-à-dire que la valeur d' IC_{50} augmentera avec la concentration de substrat, tel que décrit par l'équation suivante:

$$IC_{50} = K_i + \frac{K_i [S]}{K_m}$$

Cette relation nous a permis de comparer les données obtenues précédemment pour I-D cyclique et linéaire, ainsi leurs K_i déterminés par cette méthode seraient de 0,3 et de 0,9 μM respectivement (tableau IV). Ces valeurs diffèrent quelque peu des K_i de 0,6 et 0,3 μM observés aux figures 18 et 19, puisque ces dernières ont été obtenues à l'aide de la méthode graphique décrite à la section 3.3.3.

Selon des analyses préliminaires pour le peptide I-B, quoiqu'avec des concentrations nous donnant plus de 80% d'inhibition de l'enzyme, nous avons tout de même observé que les formes cyclique et linéaire semblaient toutes deux agir selon un mode d'inhibition compétitif, ce qui nous permettrait d'appliquer la relation et ainsi d'obtenir des valeurs de K_i de 0,5 et de 0,4 respectivement (tableau IV). Rien n'a pu être affirmé quant au mécanisme d'inhibition des formes cyclique et linéaire du peptide I-C, cependant leurs valeurs d' IC_{50} respectives de 3,0 et 0,8 μM semblent indiquer un potentiel d'inhibition intéressant, au même titre que I-B et I-D. De fait, en admettant qu'ils se comportent aussi de manière compétitive, nous pourrions calculer une valeur de K_i d'environ 0,9 et 0,2 μM pour I-C cyclique et I-C linéaire respectivement.

3.3.4 Clivage des peptides

Au cours des expériences d'inhibition enzymatique que nous venons de décrire, nous avons constaté que les peptides inhibaient l'activité enzymatique sur une certaine période de temps seulement, après quoi l'enzyme semblait reprendre son activité normale. Cela se produisait après environ 240 minutes d'incubation avec la furine, et après seulement 40 à 60 minutes d'incubation avec PC1/3. Un exemple de courbes mesurant la fluorescence en fonction du temps est donné à la figure 20 pour différentes concentrations du peptide I-B linéaire en présence de PC1/3. Nous pouvons voir que la tendance de la courbe change significativement autour de 50 minutes, c'est-à-dire qu'il y a une augmentation de la pente, correspondant à une augmentation de l'activité de l'enzyme vis-à-vis le substrat fluorogénique, malgré la présence de l'inhibiteur.

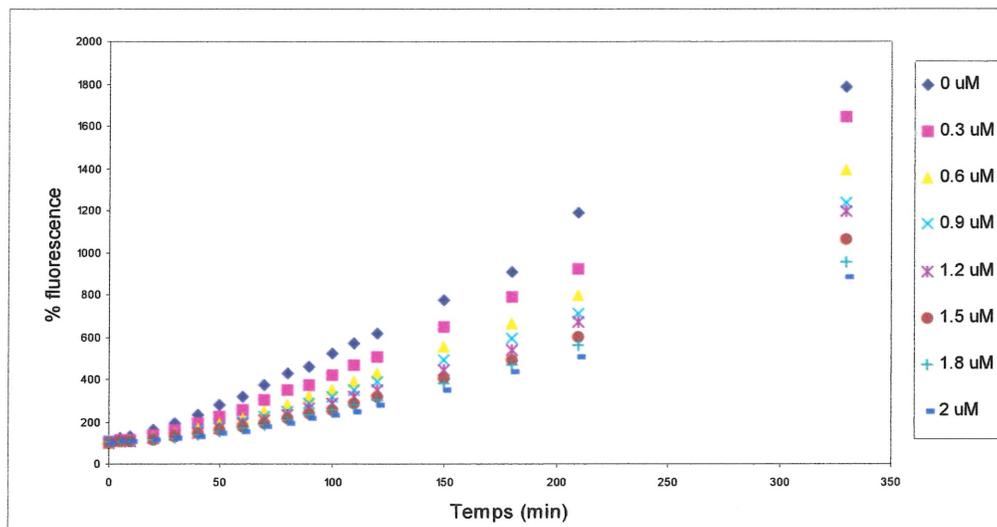
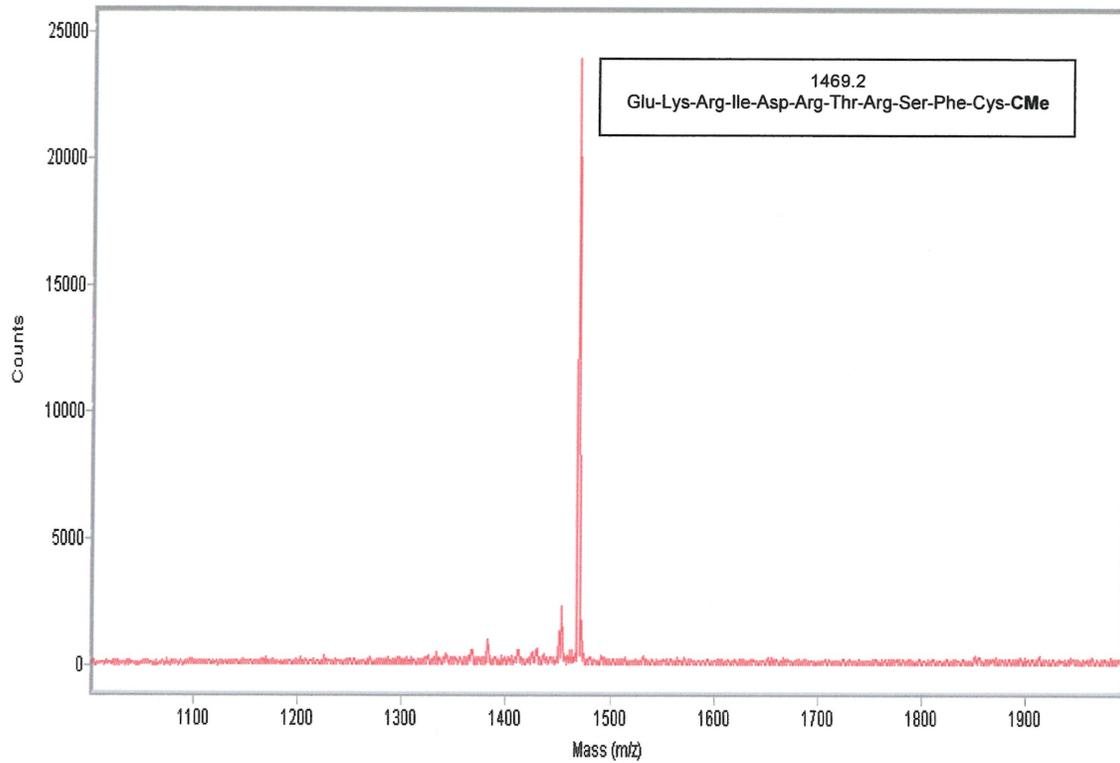
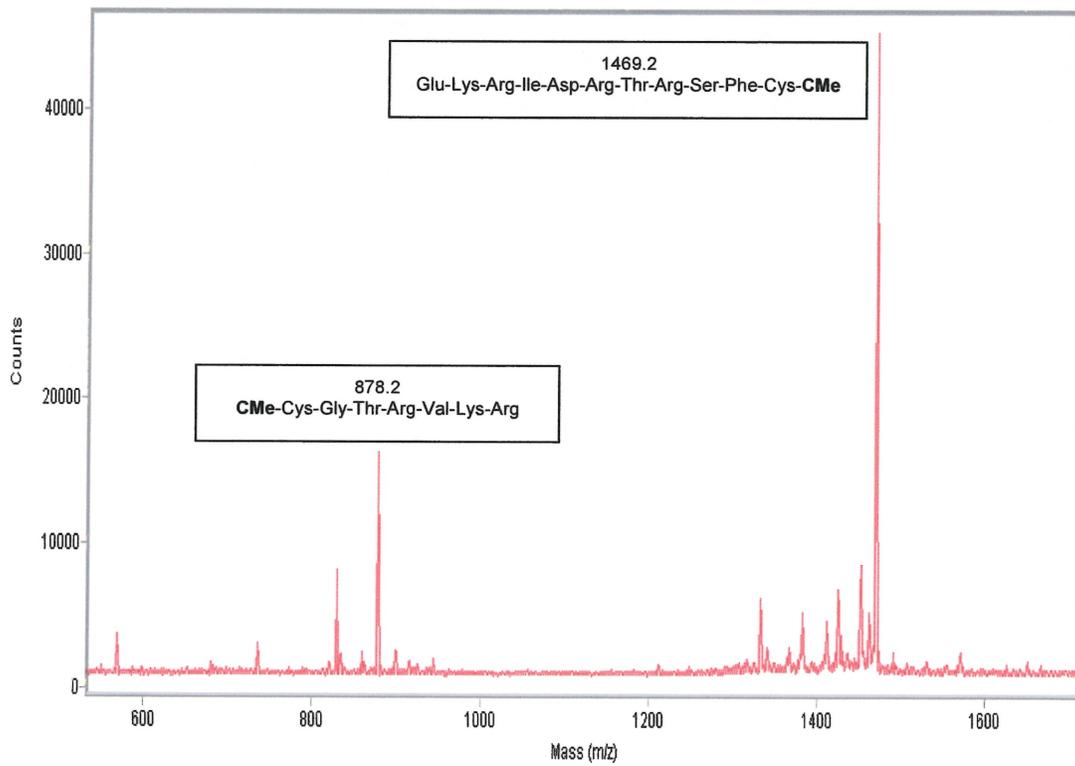


Figure 20: Variation des courbes d'inhibition de PC1/3 par différentes concentrations du peptide I-B linéaire et de 100 μM de substrat pERTKRMCA

Nous avons émis l'hypothèse que les enzymes avaient une affinité plus grande pour les peptides que pour le substrat, mais qu'elles étaient capable de les cliver comme des substrats, PC1/3 plus facilement que furine. L'inhibition observée tout d'abord est donc représentative d'une compétition, mais après un certain laps de temps il reste de moins en moins de peptides entiers en solution pour permettre une inhibition adéquate.

Afin de vérifier ce point, nous avons repris les incubations des peptides I-B et I-D linéaires et/ou cycliques avec la furine dans les mêmes conditions puis, après avoir arrêté la réaction à différents temps au moyen d'acide acétique concentré, nous avons analysé le contenu des puits par spectrométrie de masse pour identifier les produits possibles formés par l'hydrolyse des peptides (figure 21 a-c). Nous avons ainsi observé l'apparition de pics de masses correspondant à celles des fragments

**a****b****Figure 21**

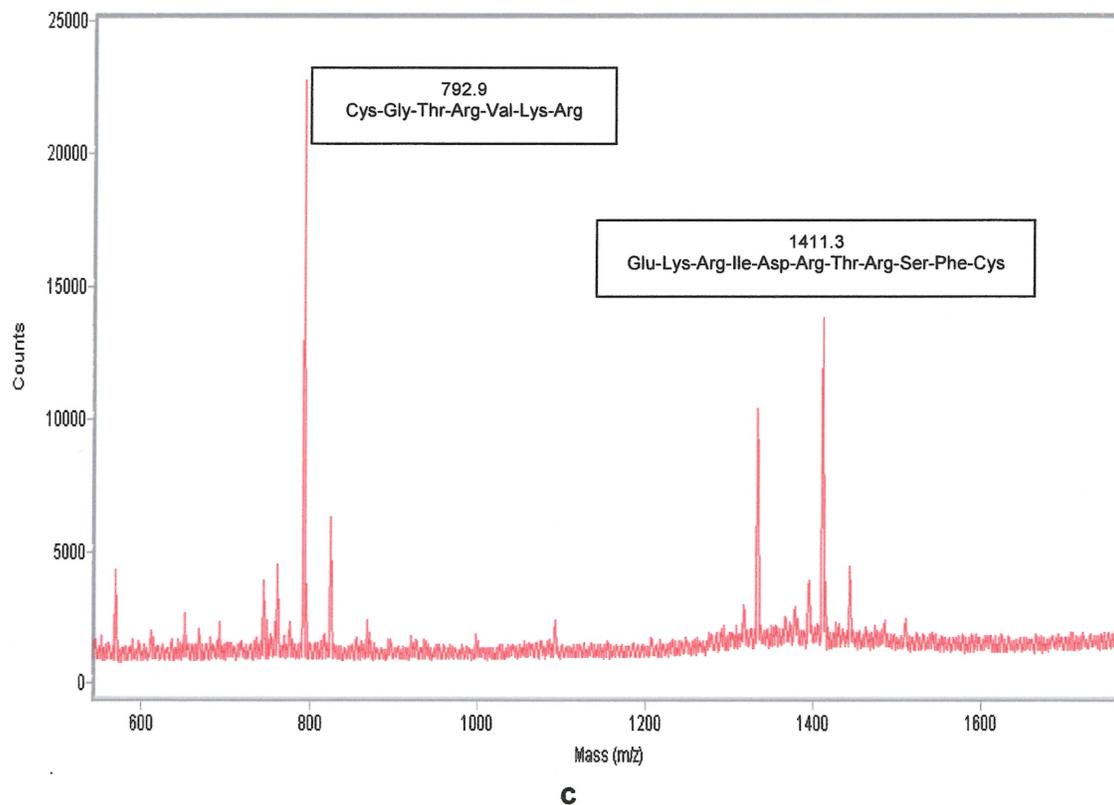


Figure 21 (suite) : Spectres de masse des échantillons peptidiques clivés par la furine. Les peptides ont été incubés avec l'enzyme durant 360 secondes dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 2.7.1, mais en absence de substrat. La réaction de clivage a été arrêtée au moyen de 10 μ L d'acide acétique concentré, et l'échantillon, préparé au moyen de la méthode "dried-droplet" décrite à la section 2.5.2.1, a été analysé sur spectromètre de masse de type MALDI-TOF. La masse et la séquence des fragments peptidiques qui ont été identifiés sont indiquées pour **a)** le peptide I-B linéaire (masses attendues: 849,92 et 1468,63; un seul de ces deux fragments a pu être détecté), **b)** le peptide I-D linéaire (masses attendues: 876,99 et 1468,63), et **c)** le peptide I-B cyclique (masses attendues 791,92 et 1410,63). Pour ce dernier, une petite goutte d'agent réducteur β -mercaptoéthanol a été préalablement ajoutée à l'échantillon afin de briser le pont disulfure retenant ensemble les fragments générés par l'enzyme. Pour les peptides linéaires, la masse des fragments obtenus devait tenir compte de la masse d'un groupement carboxyméthyle (CMe) présent sur chacun d'eux.

peptidiques situés de part et d'autre du lien P1-P1' (Arg59-Glu60), tant pour I-B et I-D linéaires que pour IB-cyclique. Ce lien a donc pu être identifié comme le site de clivage de ces peptides par la furine, et nous pouvons supposer qu'il s'agit du même site potentiel pour les autres peptides synthétisés.

3.4 Synthèse et purification des pseudopeptides

Nous avons déduit des résultats obtenus avec les peptides I-B et I-D qu'il serait utile de resynthétiser ces peptides en incorporant un lien non-clivable entre les résidus Arg59 et Glu60, identifié comme le site de clivage par la furine, et de façon présumée par PC1/3. L'ensemble du procédé de synthèse de ce lien est schématisé à la figure 22. Nous avons encore une fois employé une méthodologie de synthèse en phase solide, mais cette fois en utilisant la chimie BOC.

Un schéma réactionnel des étapes de synthèse du lien isostère est présenté à la figure 22. Tout d'abord, la formation de l'intermédiaire *O,N*-diméthylhydroxamate (BOC-(Z)₂-Arg-N(Me)OMe) selon la méthode de Guichard et al. (1993) a donné un rendement de 60% et a été vérifiée par spectrométrie RMN (figure 23). Le spectre obtenu (¹H-NMR (CDCl₃)) correspondait au spectre théorique du produit: δ = 9,45 (s, 1H, NH); δ = 9,30 (s, 1H, NH); δ = 7,35 (m, 10H, Ar); δ = 5,24 (s, 2H, Ar-CH₂); δ = 5,14 (s, 2H, Ar-CH₂); δ = 4,65 (m, 1H, H_α); δ = 3,98 (t, 2H, H_{δδ'}); δ = 3,68 (s, 3H, OCH₃); δ = 3,14 (s, 3H, NCH₃); δ = 1,7 (m, 4H, H_{ββ'} et H_{γγ'}); δ = 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃). La réduction de ce composé avec le LiAlH₄ nous a permis

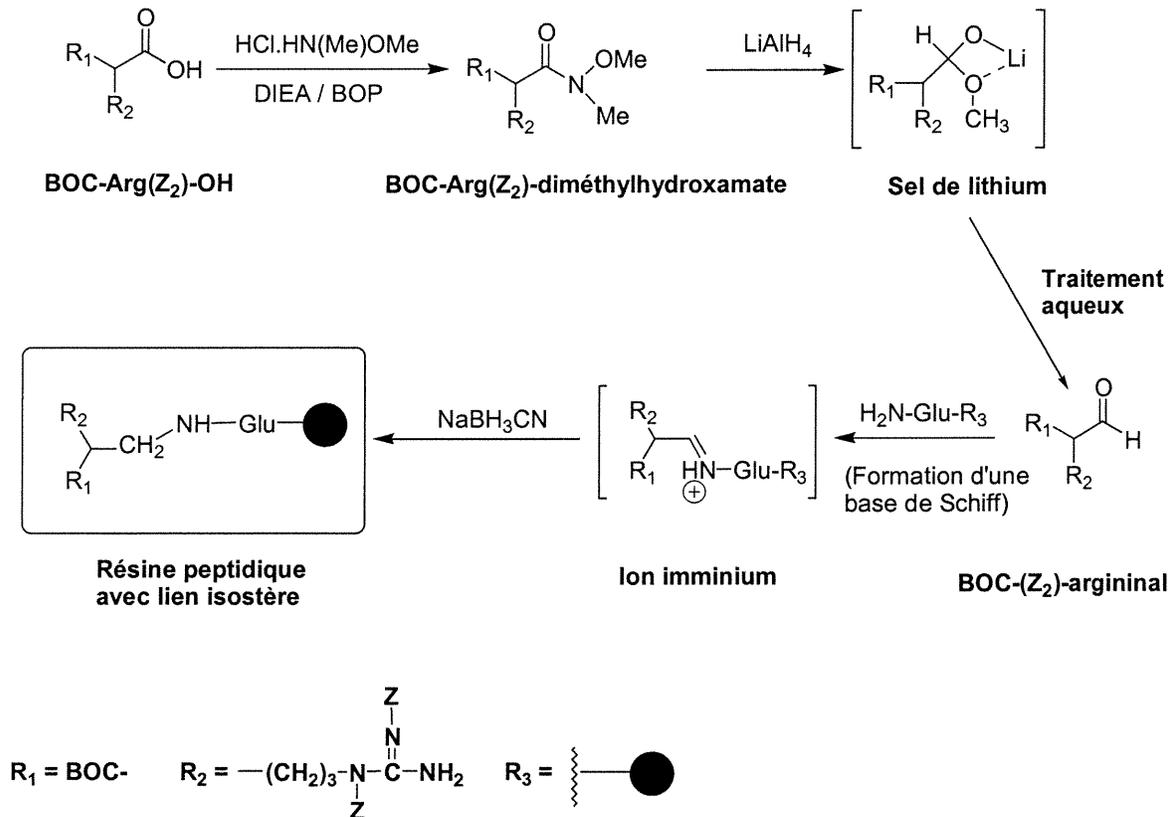
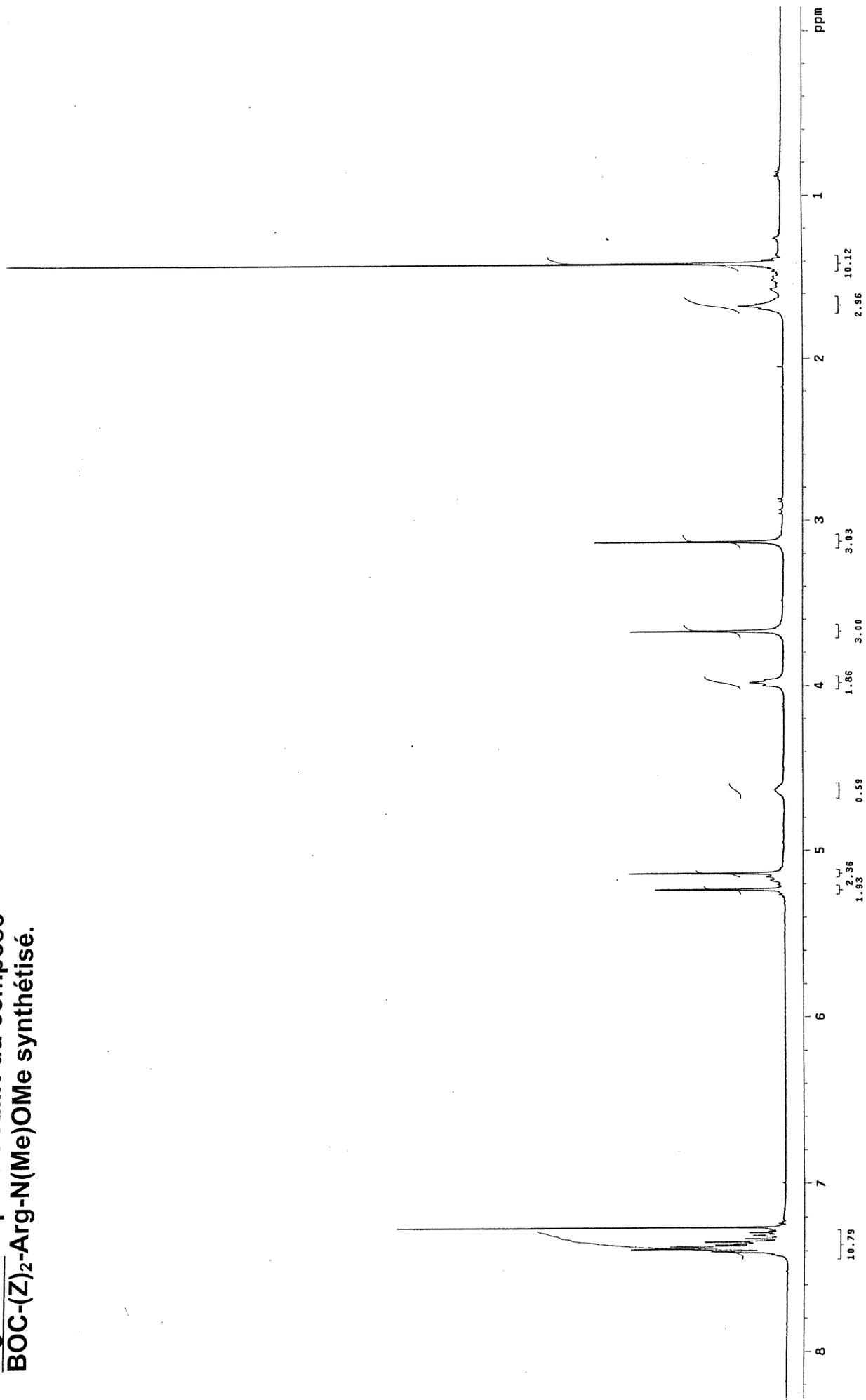


Figure 22: Schéma réactionnel de la synthèse de l'argininal et de la formation du lien isostère. La première étape est la formation de l'argininal par la réduction de la forme *O,N*-diméthylhydroxamate de l'arginine protégée, qui elle a été obtenue en faisant réagir l'acide aminé protégé avec l'hydrochlorure de diméthylhydroxylamine en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA) et d'un agent de couplage (BOP). Par la suite, la réduction par le LiAlH_4 est effectuée. Le sel de lithium qui est tout d'abord formé en milieu anhydre à 0°C est hydrolysé en aldéhyde par l'ajout d'une solution de sulfate de sodium monohydrogéné 1 M. L'alkylation réductrice de l'aldéhyde par le peptide en formation (donc dans ce cas-ci l'amination réductrice) est effectuée en milieu acide. Il y a formation d'une base de Schiff (-C=N-) lors de l'addition de l'amine sur l'aldéhyde, puis une protonation qui résulte en ion iminium. Ce dernier est réduit par le cyanoborohydrure de sodium, ce qui mène à l'obtention du lien isostère $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ entre l'arginine et l'acide glutamique du peptide en formation. Le symbole $\text{---} \bullet$ représente le peptide en formation couplé à la phase solide.

Figure 23: Spectre RMN du composé **BOC-(Z)₂-Arg-N(Me)OMe** synthétisé.



d'obtenir l'argininal (en CCM, le rapport entre la distance parcourue par la substance et la distance parcourue par le solvant, appelée "ratio to front" (R_f) obtenue dans le système EtOAc/hexane 2:3 est 0,55), mais avec une certaine proportion de produit de départ, et une faible quantité d'autres contaminants. En effet, en suivant la réaction dans le temps par CCM, une tache correspondant à la forme *O,N*-diméthylhydroxamate était toujours visible (R_f EtOAc/hexane 2:3 = 0,35). De plus nous pouvions voir apparaître des taches supplémentaires, dénotant la formation de produits secondaires à mesure que la réaction avançait, possiblement dû à une déprotection progressive des chaînes latérales de l'acide aminé ou à d'autres réarrangements de la molécule.

Nous avons employé la méthode décrite par Sasaki et Coy (1987) pour l'introduction du lien ψ [CH₂-NH] par alkylation réductrice de la fonction amine du résidu Glu sur le peptide en formation, à l'aide du cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN, figure 22). Une fois cette réaction complétée, nous avons poursuivi la synthèse des peptides selon la procédure normale. Seule une certaine portion prélevée sur la totalité du matériel brut obtenu a été purifiée, ainsi le rendement exact de la synthèse n'a pas été calculé. Il est estimé relativement faible cependant, car les aires sous les pics correspondant à chacun des peptides purifiés par HPLC après leur cyclisation en milieu basique sont petites. En comparaison, les autres pics présents sur les profils d'HPLC et ne correspondant pas aux peptides d'intérêt ont une très grande surface et sont représentatifs de la grande proportion de produits secondaires ayant été formés. Cela était prévisible compte tenu de la quantité limitante d'argininal produit. Ainsi, il a été impossible de purifier les pseudopeptides linéaires carboxyméthylés, toutefois nous sommes parvenus à isoler une quantité suffisante de leur forme cyclique. La séquence correcte des peptides et l'incorporation du lien ψ [CH₂-NH] ont été démontrées par spectrométrie de masse (figure 24) et

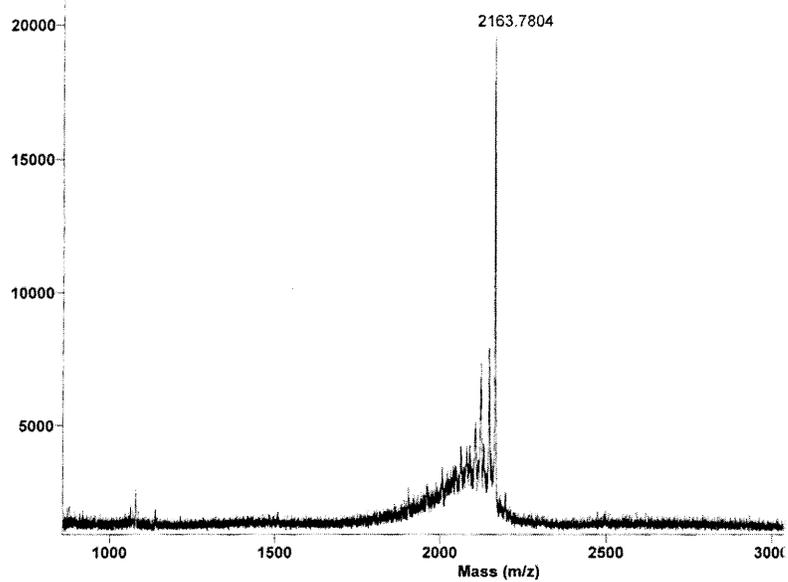
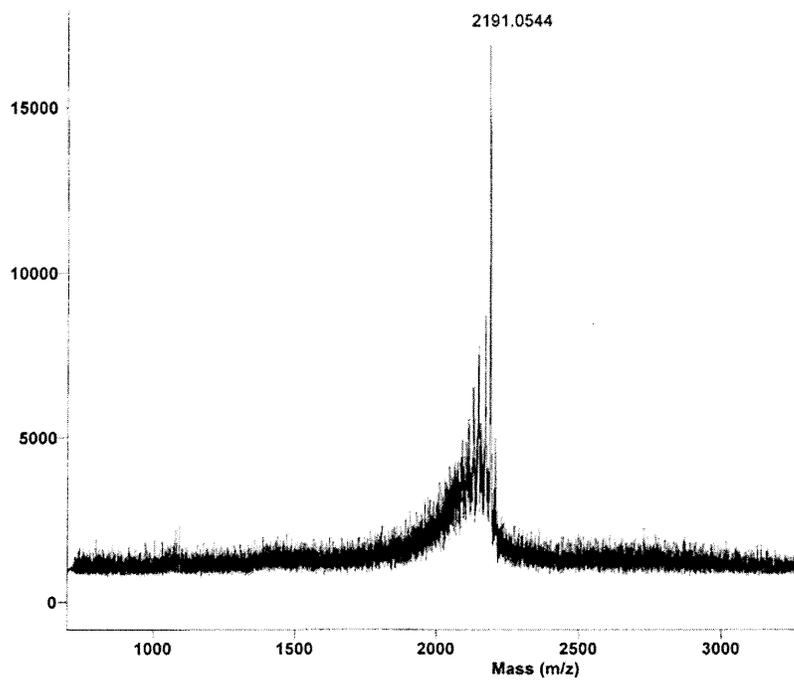
**a****b**

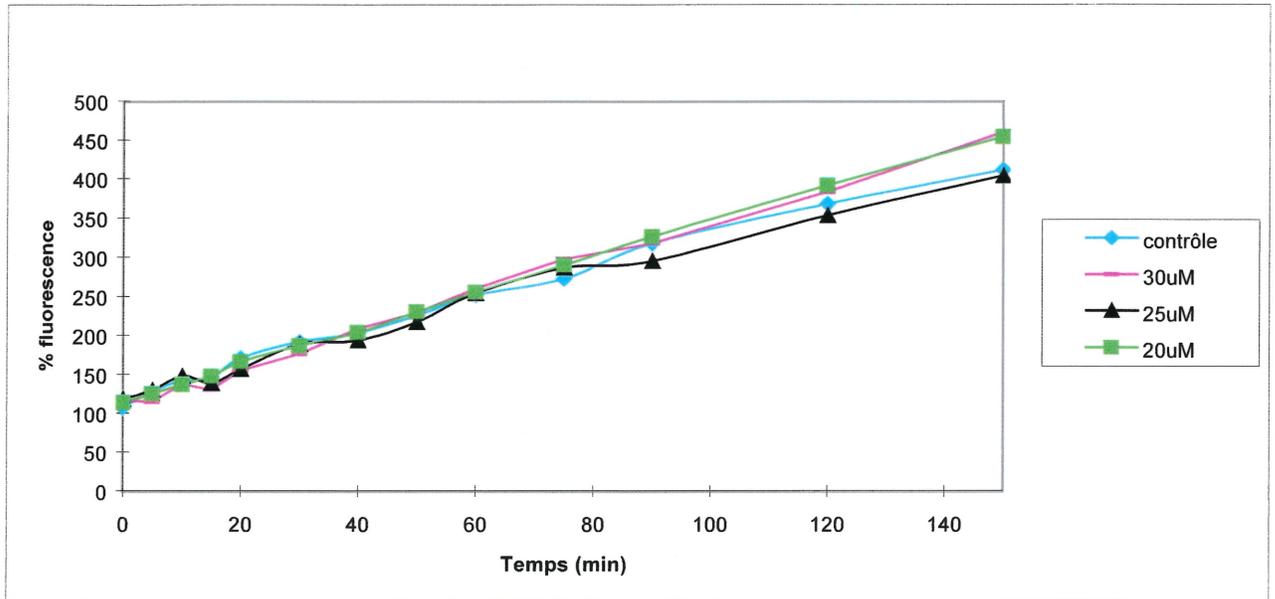
Figure 24: Spectres de masse des pseudopeptides synthétisés.

a) ψ -B ; b) ψ -D.

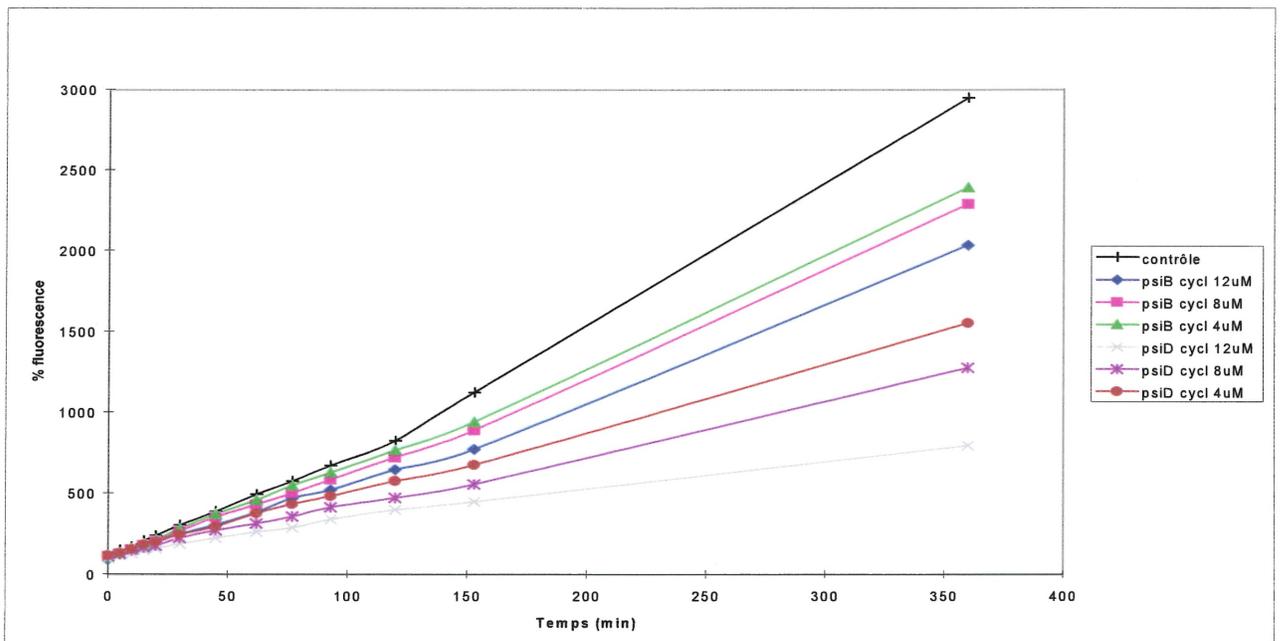
par analyse d'acides aminés (tableau II). En effet cette analyse a confirmé la présence d'un lien non hydrolysable de part et d'autre de résidus Arg et Glu.

3.5 Inhibition par les pseudopeptides

De la même façon qu'avec les peptides I-A, I-B, I-C et I-D, nous avons évalué le pouvoir d'inhibition de différentes concentrations des pseudopeptides ψ -B et ψ -D cyclisés en les incubant avec PC1/3 et furine. Ainsi nous n'avons observé aucune inhibition de PC1/3 par ces peptides, même avec des concentrations jusqu'à 150 fois plus élevées que pour les peptides I-B et I-D, ayant la même séquence mais sans le lien isostère, tel qu'illustré à la figure 25a pour le peptide ψ_D . Il est probable que l'introduction du lien isostère ait provoqué un changement de conformation de la boucle trop important pour permettre sa reconnaissance au site actif, ou encore que la fonction carboxyle qui a été retirée joue normalement un rôle primordial dans l'interaction. Par contre, la furine était inhibée avec des concentrations de pseudopeptides cycliques du même ordre que pour les peptides I-B et I-D avec cette enzyme, en respectant également la fait que ψ_D est plus puissant que ψ -B (figure 25b). De plus, dans ce cas-ci nous n'avons pas observé d'augmentation de la pente avec le temps d'incubation, tel que décrit à la section 3.3.4, ce qui confirme que ce profil correspondait bien à une augmentation de l'activité de l'enzyme à hydrolyser le substrat, dû au clivage progressif du peptide inhibiteur au site identifié, soit P1-P1'. Le K_i de ces peptides envers la furine n'a pas été déterminé.



a



b

Figure 25: Inhibition de PC1/3 et de furine par les pseudopeptides cycliques. Les incubations ont été faites en présence de 100 μM de substrat pERTKR-MCA. **a)** Inhibition de PC1/3 par différentes concentrations de peptide ψ -D cyclique. **b)** Inhibition de la furine par différentes concentrations de peptides ψ -B et ψ -D cycliques. Le contrôle représente l'incubation de l'enzyme avec le substrat en absence de peptide inhibiteur.

CHAPITRE IV: DISCUSSION

En raison de leur implication dans de nombreux processus biologiques, le développement d'inhibiteurs enzymatiques spécifiques est un enjeu important de l'étude des PCs, tant au niveau de la thérapie antivirale et de certaines maladies endocriniennes, que du contrôle de l'activation de voies impliquant par exemple des facteurs de croissance. De plus, de tels inhibiteurs pourraient jouer un rôle très important dans des études plus fondamentales concernant le mécanisme d'action ou la détermination de la structure tridimensionnelle des PCs. L'objectif de cette étude était dans un premier temps la synthèse et la purification d'un certain nombre de peptides dérivés d'un inhibiteur naturel des subtilisines, le BSPI-2, suivi de leur caractérisation du point de vue de l'efficacité et de la spécificité d'inhibition de deux proprotéines convertases, PC1/3 et furine.

4.1 Synthèse et purification des peptides

La synthèse des peptides I-A, I-B, I-C et I-D par une méthode classique de synthèse sur phase solide en utilisant la chimie dite Fmoc s'est avérée sans problème et a permis l'obtention d'une grande quantité de peptides purifiés. La synthèse en phase solide est reconnue comme une méthode de choix pour la production de peptides et de petites protéines, et le groupement protecteur Fmoc est stable dans une grande variété de conditions sous lesquelles cette synthèse peut être effectuée (pour revue, voir Fields et Noble, 1990).

Par contre, la synthèse des pseudopeptides ψ -B et ψ -D a exigé plus de temps et de mise au point de la méthode. Après avoir considéré les différents types de liens isostères connus (les plus souvent retrouvés sont décrits à la section 1.3.6.2), nous avons opté pour la formation du lien ψ [CH₂-NH] (méthylèneamine) en lieu et place du lien peptidique original entre les résidus P1Arg et P1'Glu. En effet, ce lien nous semblait le plus facile à introduire, et aussi le plus en accord avec les autres méthodes employées dans les étapes subséquentes pour achever la synthèse des peptides.

Nous devons tout d'abord produire la forme aldéhyde de l'Arg en réduisant la forme *O-N*-diméthylhydroxamate de l'acide aminé (figure 22). Pour ce faire nous avons reproduit les travaux de Guichard et al. (1993), qui ont mis au point une méthode employant un acide aminé BOC-arginine comportant deux groupements protecteurs benzyloxycarbonyle ("Z"), un pour chacun des atomes d'azote réactifs de la fonction guanidinium de la chaîne latérale. Cela a pour but de contourner plusieurs problèmes rencontrés dans ce type de réaction, notamment en relation avec la nature du groupement protecteur utilisé. En effet, cette fonction est très nucléophile, et le fait de protéger un seul des azotes n'est pas suffisant dans la plupart des conditions de réaction, où l'autre azote peut se révéler d'une grande instabilité fonctionnelle et stéréochimique. Par exemple dans le cas de l'utilisation du groupement protecteur tosylo (Tos), il peut survenir une cyclisation de l'arginine en groupement aminal lors de la réduction (figure 26).

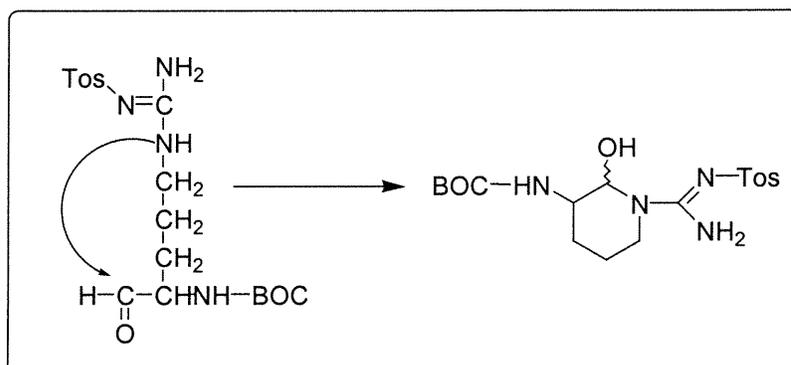


Figure 26: Aminal cyclique résultant de la réduction du BOC-Arg(Tos)-N(Me)OMe. L'attaque nucléophile de l'azote sur le carbone du carbonyle est représentée par une flèche courbée. Cette réaction est favorisée car elle résulte en un cycle à six carbones très stable.

Les groupements Z, qui sont très encombrés, procurent donc l'avantage de rendre la molécule moins nucléophile en drainant des électrons de chacun des atomes d'azote, en plus d'empêcher la réactivité par l'encombrement stérique qu'ils provoquent.

Bien qu'il se soit avéré aisé de synthétiser la forme *O-N*-diméthylhydroxamate à partir de l'Arg, l'étape de sa réduction en aldéhyde (figure 22) a nécessité d'augmenter grandement la quantité d'agent réducteur et la durée de réaction prévues par Guichard et al. (1993). Même dans ces conditions nous avons obtenu 58% de rendement plutôt que 72% tel que rapporté par les auteurs. Également nous avons observé par CCM la présence de faibles quantités de matériel de départ et d'autres contaminants, tel que mentionné à la section 3.4. Nous avons isolé l'aldéhyde produit en le faisant précipiter hors du milieu réactionnel, sans recours par la suite à la chromatographie sur gel de silice, comme cela est

plus souvent le cas lorsque les aldéhydes sont préparés par oxydation de l'alcool ou la réduction de l'ester correspondant. Cette étape aurait permis d'éliminer complètement les contaminants, comme l'hydroxamate non-réduit ou les réactifs résiduels, mais au détriment de l'aldéhyde qui peut subir ainsi un important taux de racémisation (Fehrentz et Castro, 1983), catalysé par la silice qui est légèrement acide. Par contre, le LiAlH_4 étant un agent réducteur très puissant, il est possible que le fait de l'avoir utilisé en très grande proportion pour forcer la réduction du produit de départ ait quand même causé un certain taux de racémisation, où l'acide aminé passe de sa forme L à sa forme D. Ce problème a déjà été rencontré dans la synthèse d'autres aldéhydes à partir d'acides aminés selon le même procédé (Fehrentz et al., 1985). De plus, à mesure que nous prolongions le temps d'incubation avec le LiAlH_4 , nous avons vu par CCM l'apparition de petites taches, certaines correspondant à des produits moins polaires (migrant plus haut) que l'aldéhyde, et une tache demeurant tout au bas de la plaque (plus polaire). Cela suggère un certain réarrangement de la molécule et/ou une déprotection progressive de l'acide aminé.

Par la suite, nous avons employé une méthode proposée par Sasaki et Coy (1987) qui est reconnue comme l'une des plus simples pour l'introduction du lien $\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$. Il s'agit de l'alkylation réductrice du groupement amine du peptide en formation avec l'acide aminé BOC sous sa forme aldéhyde par le cyanoborohydrure de sodium (figure 22). Le NaBH_3CN est un agent réducteur sélectif (Borch et al., 1971). De plus, l'utilisation de l'acide aminé sous forme d'aldéhyde fraîchement préparé et du DMF acidifié comme solvant, pour sa propriété supérieure de gonflement de la résine, représentent des conditions optimales. La réaction génère une amine secondaire à l'intérieur du squelette peptidique. Celle-ci est réactive et certaines réactions indésirables peuvent survenir durant les étapes subséquentes nécessaires pour compléter le peptide. Une des réactions

secondaires possibles est la formation de peptides ramifiés (ou branchés) à cet endroit. Et effectivement dans le cas de nos peptides, la réactivité de cette fonction amine était potentiellement sollicitée par six autres rondes successives de couplage. Toutefois, Sasaki et al. (1987) ont synthétisé plusieurs octapeptides de cette manière, et ils concluent que huit résidus sont bien à l'intérieur des limites de la méthode. Cela dit, nous n'avons pas caractérisé les produits secondaires provenant de la synthèse, de sorte que nous ne possédons pas de preuves d'alkylation subséquente sur l'amine du lien isostère. Néanmoins, bien que le concept rende la synthèse plus compliquée, l'idée de protéger cette fonction rendrait la technique beaucoup plus avantageuse. Par exemple, bien qu'il n'existe aucun groupement connu pouvant à la fois protéger l'amine secondaire dans des conditions basiques et être clivé au HF, un groupement protecteur Fmoc pourrait vraisemblablement être introduit sur l'amine au moyen d'un dérivé 9-fluorènylméthyle activé, tel le chloroformate ou l'ester actif de pentafluorophénol. Suite à la synthèse, la protection pourrait être retirée par traitement basique à la pipéridine juste avant de procéder à l'étape de clivage du peptide de son support solide.

Finalement, la technique standard de synthèse en phase solide prévoit en elle-même un certain niveau de réactions secondaires. Malgré cela, et combiné à tous les facteurs mentionnés plus haut ayant pu contribuer à diminuer la quantité de peptides d'intérêt synthétisés et à rendre plus difficile leur séparation, le choix de cette méthode nous a permis d'obtenir nos pseudopeptides rapidement et en quantité satisfaisante.

4.2 Structure de la boucle de BSPI-2 et implication des résidus P4Arg, P2Lys et P2'Lys dans l'inhibition

La structure cristallographique du complexe BSPI-2 avec la subtilisine BPN' a été établie (McPhalen et James, 1987), comme nous l'avons mentionné à la section 1.3.8.3 (figure 9a). Cette étude a démontré que l'inhibition survient par la formation d'un complexe non-covalent de haute affinité, mais n'entraînant pas de grand changement conformationnel sur l'un ou l'autre des partenaires, sinon que la boucle réactive de BSPI-2, qui est normalement assez flexible, devient plus ordonnée à l'intérieur du complexe. Le lien peptidique réactif de l'inhibiteur, qui peut être lentement clivé par la protéase, se trouve entre les résidus Met59 et Glu60. Diverses interactions impliquant des chaînes latérales qui pointent vers l'extérieur maintiennent l'intégrité structurelle de cette boucle, entre autres celles des résidus Arg65, Arg67 et Phe69. Les résidus Val66 et Leu68 du peptide synthétique conçu par Leatherbarrow et Salacinski (1991) en se basant sur cette boucle, ont été substitués par Thr et Ser respectivement, des résidus hydrophiles, pour des raisons de solubilité (figure 9b). En effet, les chaînes latérales hydrophobes de Val et Leu, qui dans la protéine en entier sont insérées dans le coeur de la molécule, auraient été exposées au solvant dans le peptide. Les extrémités de la boucle de BSPI-2, i.e. les résidus Val53 et Val70, étant à proximité l'un de l'autre, ils ont été remplacés par des Cys pour le maintien du peptide cyclique fermé au moyen d'un pont disulfure. Nous avons conservé ces modifications apportées par Leatherbarrow et Salacinski pour la synthèse de nos propres peptides, en nous basant sur des résultats préalables obtenus dans notre laboratoire et nous montrant le potentiel de cette boucle comme inhibiteur de PC1/3 et de furine (Jean et al., 1994).

Au cours des étapes de synthèse et purification, les peptides ont eu tendance à se cycliser naturellement sans autre condition favorable que l'oxydation par l'air ambiant. Il semble donc que l'introduction des acides aminés en position P1, P2, P4 et P2' ne perturbe pas la fermeture (cyclisation) de la boucle. Cette absence de perturbation avait été notée lors d'études de modélisation réalisées dans notre laboratoire et basées sur la structure tridimensionnelle de BSPI-2. En effet ces études montraient clairement que les chaînes latérales des résidus substitués étaient d'une part accessibles au solvant et d'autre part dirigées à l'extérieur de la boucle. Nous discuterons plus loin d'autres études de modélisation effectuées dans le but éventuel de concevoir encore davantage de peptides dérivés de cette boucle.

Les données les plus importantes d'inhibition ont été obtenues avec le peptide I-D, dont le résidu P4Arg est commun avec I-B et le résidu P2'Lys est commun avec I-B et I-C, mais qui se distingue par le résidu Lys en P2, substitué à Thr (figure 11). Ce résidu semble jouer un rôle crucial dans la reconnaissance par l'enzyme, tant la furine que PC1/3. De façon générale pour les PCs, au moins un résidu basique est requis en P2, P4 ou P6, mais il semble de plus que l'effet soit additif, du moins au niveau des sites P2 et P4. Ce dernier site est occupé par une Lys dans le peptide I-B, ce qui explique pourquoi les résultats obtenus pour ce peptide, sans être aussi probants que pour I-D, sont tout de même meilleurs que pour le peptide I-C, qui lui possède une Thr à cet endroit.

Le résidu Lys en P2' est présent chez I-B, I-C et I-D, et est en plus grande partie responsable de leur effet inhibiteur. Il représente en effet la seule modification commune relativement au substrat I-A, qui comporte un résidu Tyr à cette position et s'est révélé être à la fois un pauvre substrat et un pauvre inhibiteur de PC1/3 et de furine. Une Lys est rarement retrouvée

à cette position chez les substrats ou les inhibiteurs connus des PCs, sauf chez le pro-MIS (pour "Mullerian Inhibitor Substance"), le pro-polypeptide pancréatique, la pro-SK (pour Substance K), et le précurseur du récepteur de PTP μ (pour protéine tyrosine phosphatase) (Seidah et Chrétien, 1999). Par modélisation de la boucle réactive de BSPI-2 avec PC1/3 (voir plus loin dans ce chapitre), nous avons constaté que le résidu Tyr à cet endroit pouvait être remplacé par un résidu aromatique ou hydrophobe sans effet apparent sur l'interaction enzyme-inhibiteur ou sur la structure de la boucle. Par contre, des études préliminaires à l'aide de petits peptides dérivés des séquences de substrats apparentés au site de clivage de la proPTH (Lazure et al., 1998) avaient révélé que l'introduction d'une charge positive à cet endroit favorisait l'inhibition, ce que nous avons confirmé avec ces nouveaux peptides.

La structure des subtilisines prédit l'emplacement d'une poche hydrophobe au sous-site S2' de l'enzyme (Siezen et Leunissen, 1997). Cette poche hydrophobe serait formée chez la furine des résidus Tyr-222 et Trp-304, et au fond de cette poche se trouveraient les résidus Glu-224 et Asp-303 (figure 27a). La Lys semble être un résidu idéal pour glisser sa chaîne latérale dans cette poche hydrophobe, et interagir par sa charge positive avec la charge négative d'un des résidus se trouvant au fond. La probabilité que cette interaction se fasse avec Asp303 est plus grande qu'avec Glu224, car ces résidus se trouveraient respectivement à 4 et 8 Å de distance de l'extrémité positive de la Lys, tel que démontré par des études d'optimisation de la structure assistée par ordinateur (figure 27b et c).

En résumé, les résidus que nous avons modifiés en accord avec la régiospécificité des PCs, en particulier la combinaison des résidus P4Arg, P2Lys, P1Arg et P2'Lys dans le peptide I-D, servent à accroître la

reconnaissance du peptide au site actif, et la Lys en P2' rendrait l'interaction encore plus forte, empêchant l'enzyme de le libérer et le rendant ainsi un excellent compétiteur pour le substrat. À ce stade, nous pourrions envisager que les substitutions en P4, P2 et P1 aient un effet majeur sur la reconnaissance des peptides par la furine ou PC1/3, améliorant ainsi l'affinité des peptides pour l'enzyme (" K_{on} "). Par contre, l'effet de la Lys en P2' se ferait au niveau de la relâche du peptide (" K_{off} "), une fois ce dernier clivé. La combinaison des deux facteurs ferait en sorte de favoriser et d'améliorer l'interaction des peptides avec l'enzyme et ainsi résulterait en une meilleure inhibition.

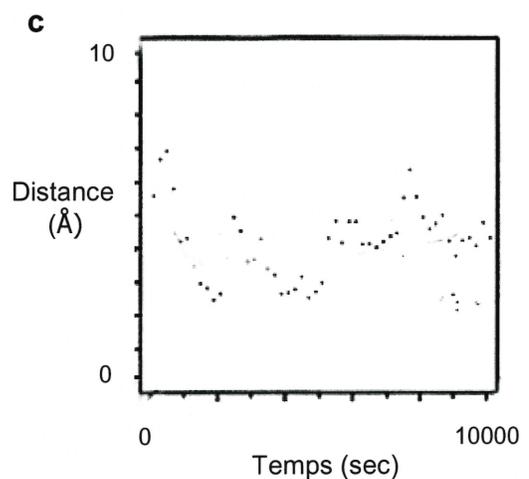
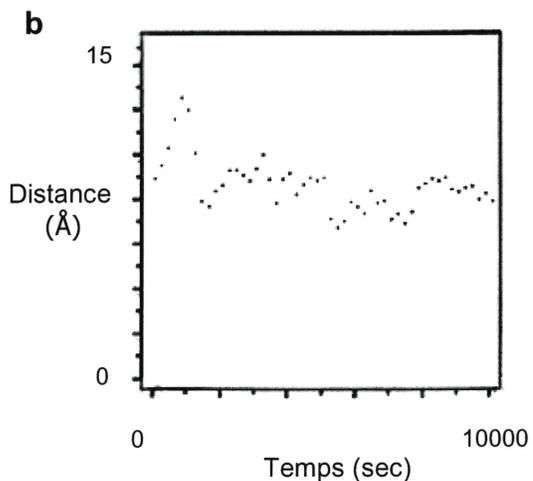
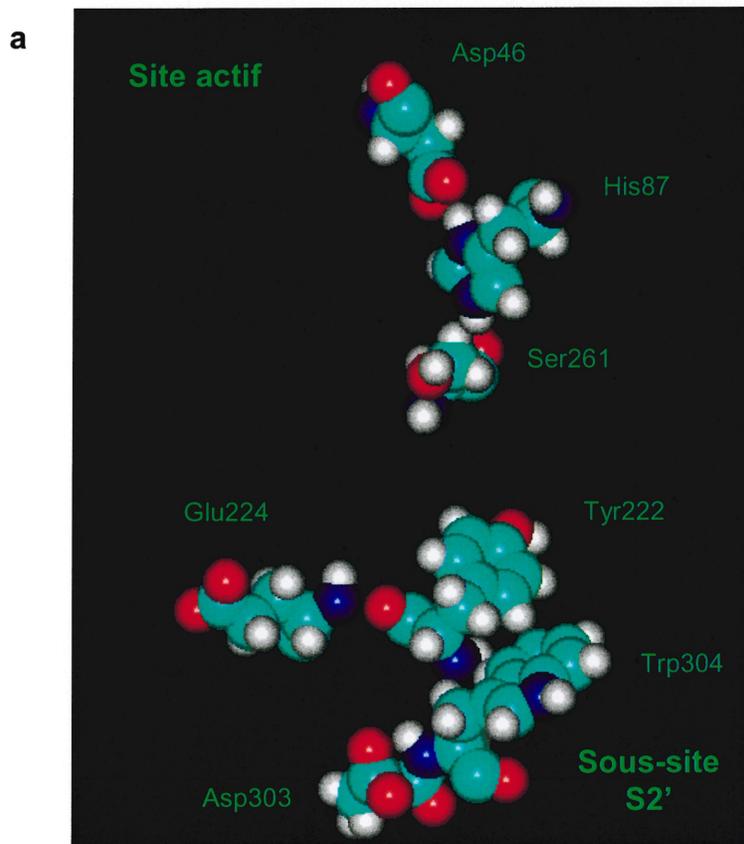


Figure27: a) Modélisation de site actif de la furine. Disposition des acides aminés de la triade catalytique et de la cavité du sous-site S2'. b et c) Étude de dynamique moléculaire par minimisation des structures. Tous les acides aminés du peptide GSRKKRSKSEYS sont fixés dans le site actif de l'enzyme, à l'exception de la Lys en P2' (en gras dans la séquence) qu'on fait bouger durant une certaine période de temps (axe des x). Les distances (axe des y) sont mesurées en Å entre cette Lys et les acides aminés d'intérêt dans le site actif, dans ce cas-ci b) Glu224 et c) Asp303. Plus la Lys se retrouve fréquemment à une courte distance de l'acide aminé, plus les probabilités qu'ils interagissent lors de la réaction enzyme-peptide sont élevées.

4.3 Effet de la cyclisation des peptides et accessibilité du site actif de l'enzyme

Il y a deux principaux avantages à travailler avec des peptides cycliques, le premier étant qu'ils seront plus résistants à la dégradation par les exopeptidases pouvant être présentes dans un milieu physiologique. Le second et plus grand avantage est qu'ils vont conserver, une fois optimisés, la conformation idéale pour la reconnaissance par le site actif de l'enzyme et l'interaction avec les résidus qui le composent. En effet dans ce cas-ci, l'introduction du pont disulfure permet de forcer le peptide à demeurer dans une orientation définie, soit celle établie pour la boucle inhibitrice dans la molécule naturelle BSPI-2 en complexe avec la subtilisine (McPhalen et James, 1988). Autrement, dû à leur flexibilité, seule une faible proportion des peptides en solution auraient la conformation requise pour la liaison. Cet aspect a été rapporté par Leatherbarrow et Salacinski (1991) lors de l'étude de l'inhibition de la chymotrypsine et des subtilisines par leur peptide cyclique dérivé de BSPI-2: aucune inhibition n'était observée lors de l'incubation du peptide avec l'enzyme en présence d'un agent réducteur. Par contre, l'ajout d'un agent réducteur suivant un certain laps de temps après le début de l'incubation de l'enzyme avec le peptide n'affectait pas l'inhibition, comme quoi une fois la boucle insérée dans le site actif, le pont disulfure n'était plus nécessaire.

Toutefois, les résultats observés lors de nos essais enzymatiques ne sont pas ceux attendus, c'est-à-dire que la différence entre nos données d'inhibition pour les peptides cycliques relativement aux peptides linéaires carboxyméthylés n'est pas constante et semble être fonction de la séquence des peptides et/ou de leur mécanisme d'action. Cette constatation pourrait s'expliquer par le fait que, malgré les substitutions apportées, le contact

entre la boucle inhibitrice et l'enzyme ne soit pas encore optimisé comme c'est manifestement le cas pour la boucle de BSPI-2 envers la subtilisine. Pour les peptides I-B et I-C, qui semblent se comporter comme des inhibiteurs mixtes envers la furine selon les représentations de Dixon et de Cornish-Bowden, le K_i augmente de 57% et de 87% respectivement pour la forme cyclique. Lorsque l'on calcule le K_i à partir de l' IC_{50} de ces mêmes peptides envers PC1/3, en supposant qu'ils agissent de façon compétitive, l'augmentation est de 35% et de 286%. Ces résultats sont contraires au principe selon lequel la formation du cycle conférerait une rigidité de la boucle qui serait optimale pour l'inhibition, comme cela est par contre observé pour le peptide I-D, dont le K_i diminue de 13% et de 65% envers la furine et PC1/3 respectivement. En plus de cette légère augmentation du pouvoir inhibiteur d'I-D envers la furine, la cyclisation cause un changement dans le mode d'inhibition de l'enzyme, qui semble passer de non-compétitif à compétitif.

En fait, il est plus probable qu'il s'agisse d'un inhibiteur mixte, mais qui aurait une affinité beaucoup plus grande pour un autre site que pour le site actif. Le logiciel de cinétique nous ayant permis de tracer les courbes de Dixon et d'obtenir les valeurs de K_i , a aussi pour fonction d'appliquer les données à toutes les équations cinétiques propres à chacun des mécanismes d'inhibition, et de déterminer le(s) mécanisme(s) le(s) plus plausible(s) pouvant concorder avec les données obtenues (« best fit »). Pour le peptide I-D linéaire, nous avons observé que le mode d'action mixte partiel semblait presque aussi près de la réalité que le non-compétitif. Selon notre hypothèse donc, en supposant qu'il s'agisse en effet d'un inhibiteur mixte, sa tendance à se lier davantage à un autre site mais tout de même un peu au site actif serait responsable du fait qu'il nous apparaît non-compétitif par l'observation des courbes diagnostiques (figure 17), mais

également qu'il soit clivé à long terme par la furine comme nous l'avons démontré à la figure 21.

Il n'est donc pas clairement établi de quelle façon la cyclisation joue un rôle dans l'interaction de l'enzyme avec nos peptides, puisque l'inhibition est toujours présente peu importe leur forme. Malgré leur grande similarité au niveau de la séquence, le site actif des convertases est probablement plus accessible que celui des subtilisines, ainsi les peptides linéaires seraient quand même aptes à se lier efficacement. D'ailleurs, les études de modélisation proposent que la distribution des sous-sites soit semblable, mais cela n'est confirmé qu'au niveau de la triade catalytique. La cavité chez les PCs est possiblement plus étendue, permettant l'entrée des peptides linéaires dans diverses conformations.

En relation avec cette idée toutefois, nous nous attendions à ce que les peptides cycliques soient clivés plus rapidement que les peptides linéaires, lors de leur incubation avec chacune des enzymes PC1/3 et furine.

En effet, le fait que les peptides cycliques ne puissent adopter qu'une "seule" conformation à l'intérieur du site actif offre des possibilités de liaison plus restreintes, ainsi si l'enzyme en a la capacité, le clivage de l'inhibiteur devrait se faire plus efficacement. Par comparaison, les peptides linéaires ont un potentiel de liaison plus variable. En effet, les PCs reconnaissent les résidus basiques, et de par leur séquence riche en Arg et leur flexibilité, les peptides linéaires peuvent faire de multiples combinaisons avec les différents sous-sites sur l'enzyme via leurs résidus P2, P4, P6 et même P8. Par conséquent, il devrait être plus difficile pour l'enzyme de trouver l'interaction idéale pour en faire de bons substrats, et le clivage survenir moins rapidement. Nous n'avons pas observé directement ce phénomène avec le type de courbes que nous avons tracées, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence flagrante entre la vitesse de clivage des peptides cycliques relativement aux peptides linéaires. Cela s'observerait par un changement radical dans la pente à un temps donné sur une courbe de fluorescence en fonction du temps, comme l'exemple en est donné à la figure 20. Cela dit, il y a une différence importante entre la vitesse par laquelle les peptides sont clivés par l'une ou l'autre enzyme, PC1/3 et furine, dans des conditions similaires. Dans le premier cas, presque la totalité des peptides en solution étaient clivés après 40 à 60 minutes, tandis que la furine mettait plusieurs heures. Il semble que le clivage n'ait lieu qu'à un seul endroit dans la chaîne peptidique, tel que nous l'avons démontré (figure 21). Ce résultat nous a permis de localiser le site où la substitution d'un lien peptidique par un lien isostère empêcherait le clivage.

Il est également possible que la liaison se fasse à un autre site sur l'enzyme, localisé à l'extérieur du site actif, comme cela a été rapporté pour l'inhibition de PC2 par la région C-terminale de 7B2, le CT peptide (Hwang et Lindberg, 2001). Les résultats obtenus avec les peptides I-B et I-C cycliques et linéaires pour l'inhibition de la furine semblaient d'ailleurs

indiquer un type d'inhibition mixte où, comme nous l'avons vu à la section 1.3.1.3, I peut se lier sur E ou sur ES, au même site (mixte-compétitif), ou à un site extérieur ou exosite (mixte-non compétitif). Dans les deux cas la capacité de E à hydrolyser S est altérée. Un site actif très large chez les PCs, tel que discuté au paragraphe précédent, serait effectivement propice à l'inhibition mixte non-compétitive par des peptides offrant plusieurs sites potentiels de reconnaissance.

Nous remarquons donc une corrélation des résultats, selon qu'ils agissent envers PC1/3 ou la furine, au niveau a) de la constante et du mode d'inhibition; b) de l'effet de la cyclisation; et c) de la vitesse d'hydrolyse des peptides. Le K_i des peptides I-B et I-C, qui semblent être des inhibiteurs mixtes de PC1/3 et de la furine, est plus élevé pour les peptides cycliques que pour les peptides linéaires. Le K_i du peptide I-D est plus bas dans le cas de sa forme cyclique que pour sa forme linéaire. De plus, il semble se comporter comme un inhibiteur compétitif de PC1/3, et également de la furine quand il est sous sa forme cyclique. Au contraire, il serait un inhibiteur non-compétitif sous sa forme linéaire. Tous les peptides I-B, I-C et I-D, peu importe leur mécanisme et leur forme cyclique ou linéaire, sont hydrolysés plus rapidement par PC1/3 que par la furine. Finalement, tous les peptides sont des inhibiteurs plus puissants de PC1/3 que de la furine, ce qui est tout à fait cohérent avec leurs vitesses d'hydrolyse respectives qui sont représentatives de meilleurs substrats à long terme. Les enzymes dénotent donc une certaine spécificité envers ces peptides, et l'élucidation de la structure de leur site actif nous permettrait de mieux comprendre toutes ces relations.

Il est à noter que les K_i déterminés avec les peptides sans lien isostère sont en fait des K_i "apparents", sachant que les peptides sont clivés par les enzymes. Les véritables K_i auraient pu être mesurés avec chacun

des peptides correspondants mais comportant un lien P1-P1' non-hydrolysable. Cependant, étant donné que les mesures d'inhibition ont été prises à court terme, alors qu'il y avait un fort excès de substrat et les peptides pratiquement encore intacts, nous pouvons assumer que les conditions étaient assez semblables à une situation où aucun clivage des inhibiteurs ne survient, et donc que les valeurs de K_i obtenues sont très près de la réalité.

4.4 Inhibition par les pseudopeptides

Les résultats obtenus avec les pseudopeptides semblent indiquer que ces derniers inhibent spécifiquement la furine. Il s'agit d'un phénomène unique car aucun inhibiteur sélectif des PCs n'a été identifié jusqu'à présent. L' α_1 -PDX a bien sûr, comme nous l'avons mentionné à la section 1.3.4.2, une spécificité plus grande envers la furine relativement aux autres PCs, mais uniquement en ce qui concerne le mécanisme, car il agit comme un inhibiteur suicide en causant une liaison stable de très forte affinité (Dufour et al. 1998; Jean et al. 1998). Les mêmes résultats avaient été observés lors d'études préliminaires dans notre laboratoire avec un pseudopeptide ayant la même séquence que le peptide I-B, mais avec une Tyr en P2' au lieu d'une Lys. Ce peptide n'inhibait pas PC1/3 même à des concentrations de 100 μ M, et inhibait la furine à des concentrations légèrement plus élevées que notre peptide I-B. Cela nous démontre encore une fois que l'introduction de la Lys en P2' a un effet positif sur l'inhibition.

Dans le cas des peptides sans lien isostère, nous pouvons supposer que la fonction carbonyle sur l'Arg59 forme un pont hydrogène avec l'Asn188 sur PC1/3 puisqu'ils sont très rapprochés dans le site actif, tel que

nous l'avons observé lors d'une étude de modélisation dont nous discuterons plus loin. Par conséquent, il est probable que la formation du lien isostère, qui élimine cette fonction C=O, provoque une déficience dans l'interaction avec PC1/3. La furine possède cette même Asn 188, mais il semble que la fonction carbonyle du résidu en P1 n'interagisse pas directement avec elle, ou du moins cette interaction serait-elle de moindre importance, puisque son absence n'empêche pas la liaison. Cela nous démontre encore l'intérêt et l'importance cruciale qu'il y aurait à concentrer des efforts pour mener des études cristallographiques et ainsi établir la structure du site actif de PC1/3, de la furine, et des autres membres de la famille des PCs.

L'inhibition observée avec les pseudopeptides envers la furine est à long terme car le lien isostère protège de la protéolyse, par contre les concentrations d'inhibiteurs requises sont plus élevées par rapport aux peptides dépourvus du lien isostère. Du travail reste donc à faire au niveau de l'amélioration du pouvoir inhibiteur de ces peptides.

4.5 Validité de l'approche expérimentale

Les résultats obtenus nous permettent tout de même de valider l'approche consistant à produire de petites molécules inhibitrices des PCs, dont PC1/3 et furine, en se basant sur la séquence et la structure d'un inhibiteur naturel de plus haut poids moléculaire, le BSPI-2. La possibilité de préparer ce type d'inhibiteur de certaines subtilisines avait été démontrée par Leatherbarrow et Salacinski (1991). Dans le domaine des protéases à sérine, cette approche s'est aussi avérée efficace pour synthétiser des inhibiteurs au moyen de boucles encore plus petites (11 acides aminés) de

type Bowman-Birk (pour revue voir Birk, 1985). L'architecture du site réactionnel de ces inhibiteurs est rendue très rigide par la présence de plus nombreux ponts disulfures. Les valeurs de K_i obtenues par Domingo et al. (1995) varient entre 0,05 et 2 μM pour la chymotrypsine et entre 0,01 et 2 μM pour la trypsine, selon les séquences utilisées, dérivées de la boucle inhibitrice des molécules de type Bowman-Birk. Par contre, les vitesses d'hydrolyse des peptides par chacune des enzymes varient grandement et démontrent peu de corrélation avec ces valeurs de K_i . Maeder et al. (1992) ont aussi essayé certains peptides dérivés de cette boucle inhibitrice contre la trypsine et ont obtenu des K_i de même ordre (0,1 à 1 μM), mais ils ont aussi remarqué une baisse du pouvoir inhibiteur en fonction du temps d'incubation, causée par l'hydrolyse des peptides. La modification des boucles du troisième domaine de l'ovomucoïde (OMTKY3) et de l' α_2 -macroglobuline, rapportées aux sections 1.3.8.1. et 1.3.8.2, s'est avérée produire de bons inhibiteurs de la furine, mais il s'agit de molécules de très grande taille qui n'offrent pas les avantages pratiques des petits peptides.

4.6 Perspectives

4.6.1 Poursuite de la caractérisation des inhibiteurs

Les étapes immédiates de la poursuite de ce projet de recherche impliquent la détermination des constantes et des mécanismes d'inhibition des pseudopeptides ψ -B et ψ -D envers la furine. Cela nous aidera par le fait même à comprendre à quel niveau le fait d'introduire ce lien empêche complètement l'inhibition de PC1/3. Ce phénomène laisse entrevoir la possibilité d'une spécificité des pseudopeptides envers la furine, alors qu'avec les peptides sans ce lien isostère nous avons observé une inhibition

plus puissante de PC1/3 que de la furine. Également, la caractérisation des peptides sans lien isostère du point de vue de l'efficacité et du mode d'inhibition devra être poussée davantage en profondeur, afin de comprendre et d'améliorer la distinction par les différentes enzymes entre les formes cycliques et linéaires, et aussi améliorer leur discrimination relativement à PC1/3 et furine. Le fait de tester les peptides avec les autres membres de la famille des convertases pourrait fournir de précieux indices à cet effet. Nous avons procédé à des essais préliminaires d'inhibition de PC7 par nos peptides (données non présentées au chapitre III), et nous avons constaté que les résultats sont semblables à ceux obtenus pour la furine au niveau du comportement relatif de chaque peptide vis-à-vis de l'enzyme et de leur clivage à long terme, quoique les concentrations de peptides nécessaires soient légèrement plus élevées. Cela n'est pas vraiment surprenant puisque PC7 et la furine peuvent être classées dans la même "sous-catégorie" à l'intérieur de la famille des PCs: leur distribution tissulaire est très répandue, elles clivent les précurseurs à la membrane cellulaire via la voie de sécrétion constitutive, et leur spécificité de clivage est similaire (Munzer et al., 1997). Il serait donc plus intéressant de comparer les résultats obtenus de PC1/3 et furine avec des PCs appartenant à d'autres "sous-catégories", telles PACE4 ou PC5/6, qui sont exprimées à la fois dans les cellules endocriniennes et non-endocriniennes et agissent sur les précurseurs de la voie constitutive aussi bien que de la voie régulée; ou encore PC4, qui n'est présente que dans les cellules germinales mâles.

4.6.2 Études d'inhibition *in vivo*

Nous avons procédé uniquement à des études *in vitro*, car l'un des avantages de ce type d'expérimentation est de permettre un plus grand contrôle des conditions expérimentales. Donc, particulièrement dans le cas d'études d'inhibition, les concentrations de substrat, d'enzyme et d'inhibiteur

ont pu être soigneusement déterminées pour établir des données cinétiques précises. Toutefois, et bien que les conditions idéales d'activité de PC1/3 et de furine aient été reproduites ici en se basant sur des études préalables (Cieplik et al. 1998; Boudreault et al. 1998a), l'apport de protéines endogènes ou d'autres facteurs physiologiques possibles qui, *in vivo*, influenceraient la préférence enzymatique pour un site de liaison ou de clivage d'un type de substrat ou d'inhibiteur, n'est pas pris en considération. Entre autres, on sait que la compartimentation cellulaire est un élément important de l'activité différentielle des PCs vis-à-vis de leurs substrats, en premier lieu pour les variations qu'elle procure au niveau des conditions physiologiques telles le pH et la concentration en calcium, mais également au niveau des protéines qui s'y retrouvent et qui participent de quelque façon à la maturation de ces substrats. Notamment, à l'intérieur des granules de sécrétion des cellules neuroendocriniennes, on retrouve les sécrétogranines, une famille de protéines acides connues pour interagir avec certains substrats des PCs et participer à leur conversion en molécules actives. Par exemple, la chromogranine B et la sécrétogranine II influencent la réaction de conversion du précurseur pro-NGF en NGF par la furine (Seidah et al., 1996b). De plus, les protéines accessoires liant les PCs, telle 7B2 pour PC2, ne seront pas présentes. Finalement, il nous est impossible d'évaluer la capacité des peptides à franchir ces compartiments. Ainsi des essais biologiques *in vivo* seraient intéressants pour compléter cette recherche.

4.6.3 Modélisation moléculaire et préparation de nouveaux inhibiteurs

À l'aide d'un logiciel de modélisation, nous avons analysé la structure de BSPI-2 insérée dans le site actif de PC1/3 (figures 28 et 29), et essayé diverses substitutions d'acides aminés qui pourraient nous permettre d'autres modifications de notre séquence de départ. Tout d'abord, la Gly54

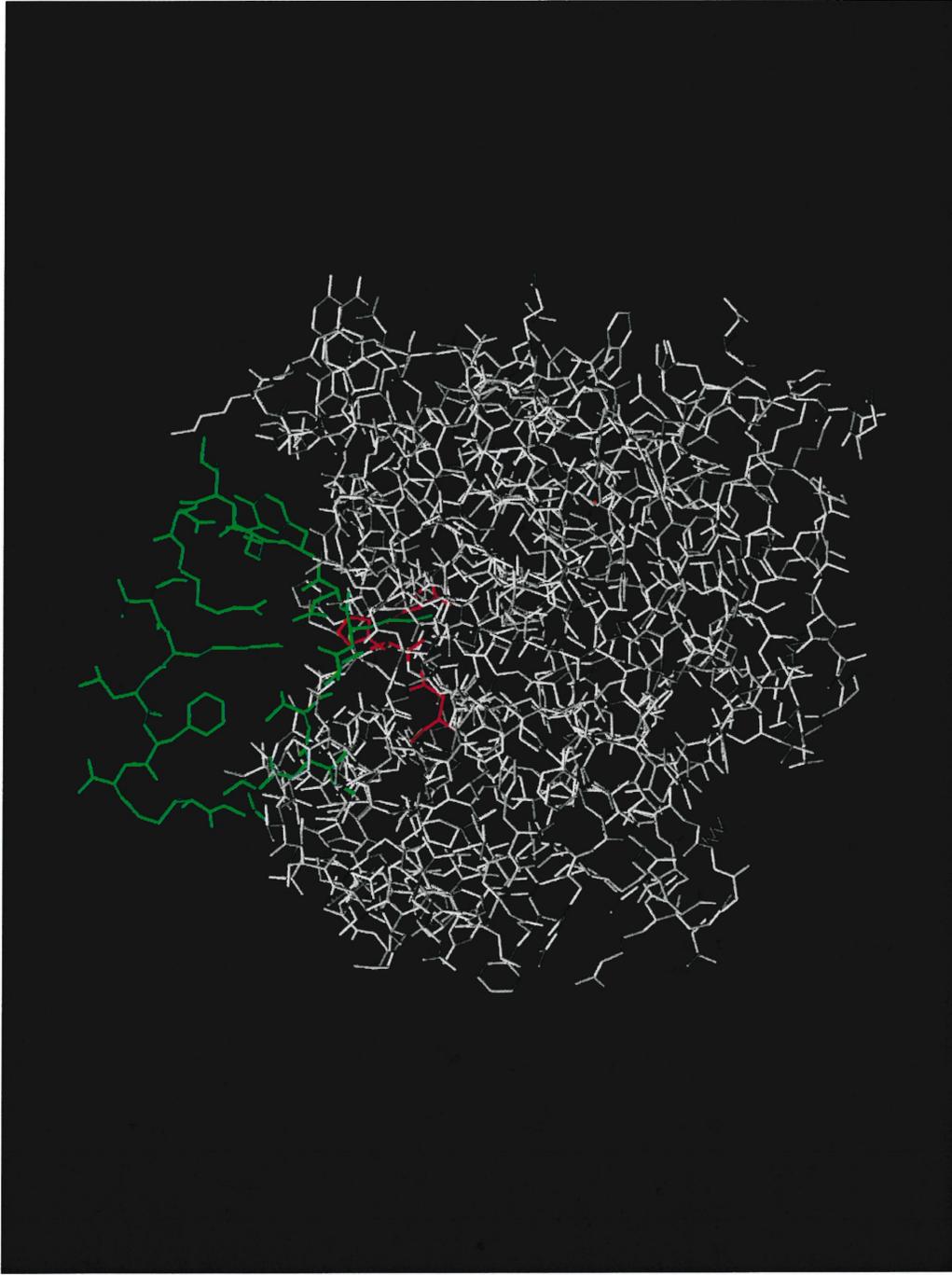


Figure 28: Modélisation de la boucle BSPI-2 insérée dans le site actif de PC1/3. La boucle est représentée en vert et l'enzyme en blanc, à l'exception des acides aminés de la triade catalytique (Asp, His, Ser) qui sont indiqués en rouge. La structure a été obtenue avec le logiciel SYBYL.

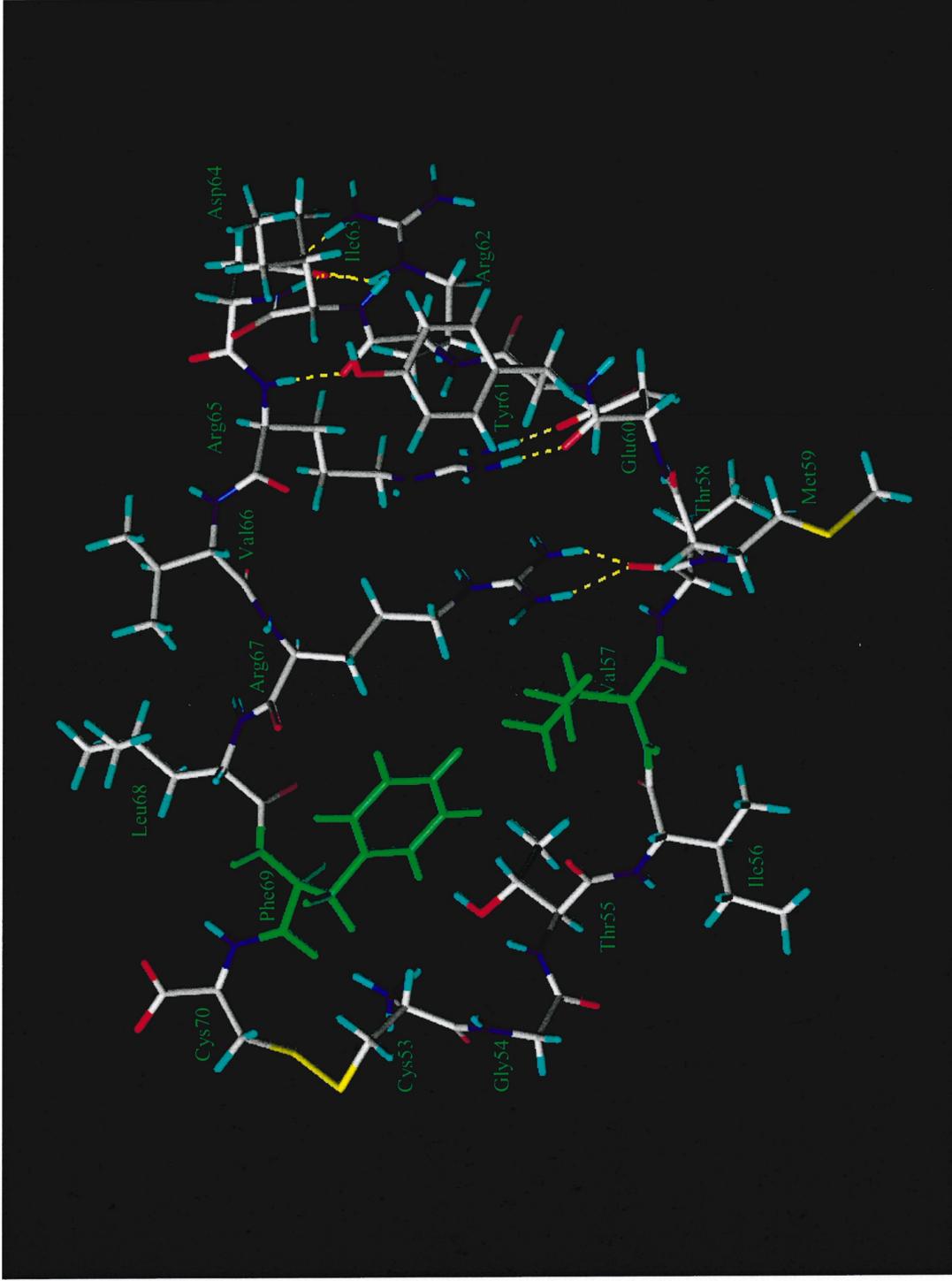


Figure 29: Modélisation de la boucle de BSPI-2 et des interactions qui maintiennent son intégrité structurale. Les ponts hydrogènes prédits entre Arg62 et Asp64, entre Arg65 et Glu60, et entre Arg67 et Thr58 sont symbolisés par des pointillés jaunes. Les résidus Phe69 et Val57 indiqués en vert pourraient interagir via leur chaîne latérale hydrophobe. La structure a été obtenue avec le logiciel SYBYL. Les différents atomes sont identifiés comme suit : C = blanc; H = bleu pâle; S = jaune; N = bleu foncé; et O = rouge.

peut être remplacée par n'importe quel résidu excepté Pro. La Thr55 peut être substituée par une Ala ou par certains résidus ayant une chaîne latérale polaire non-chargée, tels Asn, Ser ou Gln. La Val57 peut également être remplacée par Asn, Thr, Ser ou Ala, ou encore par Asp, car ce résidu acide formerait possiblement un pont hydrogène avec Arg67 sans provoquer d'encombrement stérique comme le ferait Glu. Le résidu en P1', Glu60, est conservé car il participe à la formation d'un pont hydrogène avec Arg65. Selon le modèle, Lys61 est située juste à la sortie du site actif et pourrait être remplacée par un résidu aromatique ou hydrophobe; par contre nous démontrons qu'elle contribue à l'inhibition par nos peptides (voir section 3.3.3 et chapitre IV). Arg62 et Asp64 forment un pont hydrogène entre eux (figure 29) et ne doivent pas être remplacés, car cette interaction est importante pour la stabilité de la boucle. Ile63 peut être substituée par un résidu soit aromatique ou hydrophobe sans modification de la structure. Par contre il se trouve à proximité du résidu Lys305 de l'enzyme, donc il pourrait être préférablement remplacé par un résidu acide, ce qui améliorerait possiblement l'interaction par le gain d'un pont salin ou hydrogène. Arg65 et Arg67 ne doivent pas être remplacés, dû aux ponts hydrogènes qu'ils peuvent former avec Glu60 et Thr58 respectivement (figure 29). Thr66 et Ser68 peuvent être changés pour n'importe quel résidu. Le résidu Phe69 doit demeurer aromatique ou hydrophobe car il forme une interaction hydrophobe avec Val57 (figure 29), et cette interaction distale est importante pour le maintien de la structure en boucle de la molécule.

Le principal intérêt de ces observations est qu'elles peuvent nous permettre de concevoir des boucles semblables mais plus petites, tout en conservant les mêmes propriétés inhibitrices. Les petites boucles sont plus stables, plus facilement synthétisables et modélisables. En se basant sur les possibilités énumérées au paragraphe précédent, il est évident que Gly54 pourrait être complètement retirée et le cycle formé entre une Cys à cette

position et Cys70. Une autre possibilité serait de cycliser entre Glu60 et Arg65 en remplaçant le pont hydrogène entre eux par un lien covalent, ce qui nous permettrait de retirer les résidus Cys53, Arg62, Ile63, Asp64 et Cys70. La boucle serait ainsi plus petite mais comporterait un pont hydrogène en moins.

Ainsi la poursuite des études de modélisation nous permettrait de réduire la taille des peptides pour la préparation éventuelle de peptidomimétiques. L'utilisation de bibliothèques peptidiques combinatoires (comme décrit à la section 1.3.7) et/ou par l'utilisation de phages serait aussi un bon moyen de sélectionner les séquences peptidiques les plus efficaces pour l'inhibition. Cette dernière méthode a l'avantage de permettre l'expression à la surface de bactéries de peptides ayant les extrémités N- et C-terminales contraintes, ce qui assure que le peptide est dans une conformation très rigide et bien définie. Pour les besoins de notre recherche, la séquence insérée dans le vecteur d'expression serait le dodécapeptide CGTXXXXXXXXRIDRTRSFC où X=n'importe quel acide aminé aux positions P4 à P2'. Cela nous permettrait non seulement de sélectionner toutes les séquences qui lient efficacement PC1/3 et la furine, mais aussi de les différencier par comparaison aux autres PCs.

4.7 Conclusion

Pour terminer, résumons les principales conclusions pouvant être tirées des résultats de cette recherche. D'abord, l'approche générale consistant à synthétiser de petites molécules inhibitrices en conservant uniquement le site actif d'un inhibiteur connu de plus haut poids moléculaire

se trouve validée par les résultats obtenus. En effet, nous avons produit trois inhibiteurs efficaces de PC1/3 et de furine (K_i allant de 0,2 à 87 μM), en conservant 18 des 83 acides aminés de BSPI-2, un inhibiteur des subtilisines, et en modifiant certains d'entre eux pour correspondre à la régiospécificité des PCs. Nos résultats démontrent que les enzymes ont toutes deux une préférence pour le peptide I-D comportant les résidus P4Arg, P2Lys, P1Arg et P2'Lys. Le peptide I-B est le deuxième meilleur inhibiteur avec la combinaison P4Arg, P1Arg et P2'Lys, suivi du peptide I-C dont la séquence comprend P1Arg et P2'Lys. En fonction de la séquence, les peptides agissent selon un mode d'inhibition compétitif, non-compétitif ou mixte. De plus, ils semblent inhiber plus fortement lorsque sous leur forme linéaire carboxyméthylée que sous leur forme cyclique. Toutefois, ils sont tous clivés au site P1-P1' après un certain temps d'incubation avec PC1/3 ou furine. L'introduction d'un lien isostère non scissile à ce site a permis d'éliminer le problème dans le cas de la furine, quoiqu'en diminuant la puissance de l'inhibiteur; alors que pour PC1/3 cela a complètement empêché l'inhibition. Cela tend à démontrer l'importance de la fonction carbonyle dans le site actif des deux enzymes.

L'étude de ces inhibiteurs nous a donc permis d'obtenir plusieurs indices sur la conformation des sites actifs de PC1/3 et de furine. Ainsi dans le futur, grâce à la poursuite des travaux d'enzymologie combinés aux études de modélisation, nous pourrions élucider davantage cet aspect. Cela nous permettrait, en plus de mieux comprendre leur mécanisme d'action, d'obtenir un meilleur niveau de spécificité de nos inhibiteurs envers chacune des enzymes.

BIBLIOGRAPHIE

Abrami,L., Fivaz,M., Decroly,E., Seidah,N.G., Jean,F., Thomas,G., Leppla,S.H., Buckley,J.T., et Van der Goot,F.G. (1998). The pore-forming toxin proaerolysine is activated by furin. *J Biol Chem.* 273: 32656-32661.

Anderson,E.D., Thomas,L., Hayflick,J.S., et Thomas,G. (1993). Inhibition of HIV-1 gp160-dependant membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J Biol Chem.* 268: 24887-24891.

Anderson,E.D., VanSlyke,J.K., Thulin,C.D., Jean,F., et Thomas,G. (1997). Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification an internal propeptide cleavage. *EMBO J.* 16: 1508-1518.

Angliker,H. (1995). Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J Med Chem.* 38: 4014-4018.

Apletalina,.E., Appel,J., Lamango,N.S., Houghten,R.A., et Lindberg,I. (1998). Identification of inhibitors of prohormone convertases 1 and 2 using a peptide combinatorial library. *J Biol Chem.* 273: 26589-26595.

Apletalina,.E., Muller,L., et Lindberg,I. (2000). Mutations in the catalytic domain of prohormone convertases 2 result in decreased binding to 7B2 and loss of inhibition with 7B2 C-terminal peptide. *J Biol Chem.* 275: 14667-14677.

Ayoubi,T.A., van Duijnhoven,H.L., van de Ven,W.J., Jenks,B.G., Roubos,E.W., et Martens,G.J. (1990). The neuroendocrine polypeptide 7B2 is a precursor protein. *J Biol Chem.* 265: 15644-15647.

Ballinger,M.D., Tom,J., et Wells,J.A. (1996). Furlisin: a variant of subtilisin BPN' engineered for cleaving tribasic substrates. *Biochemistry* 35: 13579-13585.

Barrett,A.J., et Starkey,P.M. (1973). The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J.* 133: 709-724.

Basak,A., Jean,F., Seidah,N.G., et Lazure,C. (1994) Design and synthesis of novel inhibitors of prohormone convertases. *Int J Pept Protein Res.* 44: 253-261.

Basak,A., Schmidt,C., Ismail,A.A., Seidah,N.G., Chrétien,M., et Lazure,C. (1995). Peptidyl substrates containing unnatural amino acid at the P'1 position are potent inhibitors of prohormone convertases. *Int J Pept Protein Res.* 46: 228-237.

Basak,A., Gauthier,D., Seidah,N.G., et Lazure,C. (1999a). Synthetic proregion-related peptides of proprotein convertases, PC1 and furin, represent potent inhibitors of each protease. pp.676-677. Dans: Proceedings of the XVth American Peptide Symposium, "Peptides: frontiers of peptide science". Tam.,J.P., et Kaumaya,P.T. (Eds) *Kluwer Academic Publishers*, Boston.

Basak,A., Cooper,S., Roberge,A.G., Banik,U.K., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1999b). Inhibition of proprotein convertases-1, -7 and furin by diterpines of *Andrographis paniculata* and their succinoyl esters. *Biochem J.* 338: 107-113.

Basak,A., Zhong,M., Minzer,J.S., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (2001). Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides. *Biochem J.* 353: 537-545.

Bassi,D.E., Lopez De Cicco,R., Mahloogi,H., Zucker,S., Thomas,G., et Klein-Szanto,A.J. (2001). Furin results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10326-10331.

Benjannet,S., Rondeau,N., Day,R., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1991). PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3564-3568.

Benjannet,S., Reudelhuber,T., Mercure,C., Rondeau,N., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1992). Pro-protein conversion is determined by a multiplicity of factors including convertase processing, substrate specificity and intracellular environment. *J Biol Chem.* 267: 11417-11423.

Benjannet,S., Rondeau,N., Paquet,L., Boudreault,A., Lazure,C., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1993). Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphatation and

identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem J.* 294: 735-743.

Benjannet,S., Savaria,D., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1995). 7B2 is a specific intracellular binding protein of the prohormone convertase PC2. *J Neurochem.* 64: 2303-2311.

Bennett,D.L., Bailyes,E.M., Nielsen,E., Guest,P.C., Rutherford,N.G., Arden,S.D., et Hutton,J.C. (1992). Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family. *J Biol Chem.* 267: 15229-15236.

Bertagna,X. (1994). Proopiomelanocortin derived peptides. pp. 467-485. Dans: *Endocrinology and metabolism clinics of north america: Cushing's syndrome.* 23rd ed. Aron,D.C., et Tyrrel,J.B. (Eds) *WB Saunders Company*, Philadelphia.

Birk,Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Int J Pept Protein Res.* 25:113-131.

Blazquez,M., Docherty,K., et Shennan,K.I. (2001). Association of prohormone convertase 3 with membrane lipid rafts. *J Mol Endocrinol.* 27: 107-116.

Bloomquist,B.T., Eipper,B.A., et Mains,R.E. (1991). Prohormone-converting enzymes: regulation and evaluation of function using antisense RNA. *Mol Endocrinol.* 5: 2014-2024.

Borch,R.F., Bernstein,M.D., Durst,H.D. (1971). The cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent. *J Am Chem Soc.* 93: 2897-2904.

Boudreault,A., Gauthier,D., Rondeau,N., Savaria,D., Seidah,N.G., Chrétien,M., et Lazure,C (1998a). Molecular characterization, enzymatic analysis, and purification of murine proprotein convertase-1/3 (PC1/PC3) secreted from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif.* 14: 353-366.

Boudreault,A., Gauthier,D., et Lazure,C. (1998b). Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J Biol Chem.* 273: 31574-31580.

Brakch,N., Rist,B., Beck-Sickinger,A.G., Goenaga,J., Wittek,R., Burger,E., Brunner,H.R., et Grouzmann,E. (1997). Role of prohormone convertases in pro-neuropeptide Y processing: coexpression and *in vitro* kinetic investigations. *Biochemistry* 36: 16309-16320.

Braks,J.A., et Martens,G.J. (1994). 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell* 78:263-273.

Bryan,P., Pantoliano,M.W., Quill,S.G., Hsiao,H.Y., et Poulos,T. (1986). Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3743-3745.

Bruzzaniti,A., Goodge,K., Jay,P., Traviaux,S.A., Lam,M.H., Berta,P., Martin,T.J., Moseley,J.M., et Gillespie,M.T. (1996). PC8 [corrected], a new member of the convertase family [published erratum appears in *Biochem J.* (1996). 316: 1007]. *Biochem J.* 314: 727-731.

Cameron,A., Fortenberry,Y., et Lindberg,I. (2000a). The SAAS granin exhibits structural and fonctionnal homology to 7B2 and contains a highly potent hexapeptide inhibitor of PC1. *FEBS Lett.* 473: 135-138.

Cameron,A., Appel.J., Houghten,R.A., et Lindberg,I. (2000b). Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem.* 275: 36741-36749.

Cameron,A., et Apletalina,E.V., and Lindberg,I. (2002). The enzymology of PC1 and PC2. À paraître dans : The Enzymes. Dalbey,R., et Sigman,D. (Eds), *Academic Press*, San Diego.

Chance,R.E., Ellis,R.M., et Broomer,W.W. (1968). Porcine proinsulin: characterization and amino acid sequence. *Science* 161: 165-167.

Cheng,Y., et Prusoff,W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 22: 3099-3108.

Cheng,M., Watson,P.H., Paterson,J.A., Seidah,N.G., Chrétien,M., et Shiu,R.P. (1997). Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer* 71: 966-971.

Chou,T. (1974). Relationships between inhibition constants and fractional inhibition in enzyme-catalyzed reactions with different numbers of reactants, different reaction mechanisms, and different types and mechanisms of inhibition. *Mol Pharmacol.* 10: 235-247.

Chrétien,M., et Li,C.H. (1967). Isolation and charaterization on γ -lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem.* 45: 1163-1174.

Cieplik,M., Dieter Klenk,H., et Garten,W. (1998). Identification and characterization of *Spodoptera frugiperda* furin: a thermostable subtilisin-like endoprotease. *Biol Chem.* 379: 1433-1440.

Coates,L.C, et Birch,N.P. (1997). Posttranslational maturation of the prohormone convertase SPC3 in vitro. *J Neurochem.* 68: 828-836.

Coates,L.C, et Birch,N.P. (1998). Differential cleavage of provasopressin by the major molecular forms of SPC3. *J Neurochem.* 70: 1670-1678.

Cornish-Bowden,A. (1974). A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem J.* 137: 143-144.

Cornish-Bowden,A. (1995). Fundamentals of enzyme kinetics. (Ed.), *Portland Press*, London.

Creemers,J.W., Roebroek,A.J., et Van de Ven,W.J. (1992). Expression in human lung tumor cells of the proprotein processing enzyme PC1/3. Cloning and primary sequence of a 5kb cDNA. *FEBS Lett.* 23: 82-88.

Dahlen,J.R., Jean,F., Thomas,G., Foster,D.C., et Kisiel,W. (1998). Inhibition of soluble recombinant furin by human proteinase inhibitor 8. *J Biol Chem.* 273: 1851-1854.

Day,R., Schafer,M.K., Cullinan,W.E., Watson,S.J., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1993). Region specific expression of furin mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett.* 149: 27-30.

DeBie,I., Marcinkiewicz,M., Malide,D., Lazure,C., Nakayama,K., Bendayan,M., et Seidah,N.G. (1996). The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J Cell Biol.* 135: 1261-1275.

Decroly,E., Vanderbranden,M., Ruyschaert,J.M., Cogniaux,J., Jacob,G.S., Howard,S.C., Marshall,G., Kompelli,A., Basak,A., Jean,F., Lazure,C., Benjannet,S., Chrétien,M., Day,R., et Seidah,N.G. (1994). The convertases furin and PC1 can both cleave the immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-I SU) and gp41 (HIV0I TM). *J Biol Chem.* 269: 12240-12247.

Decroly,E., Wouters,S., Di Bello,C., Lazure,C., Ruyschaert,J.M., et Seidah,N.G. (1996). Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on *in vitro* assays and expression in CD4(+) cell lines [published *erratum* appears in *J Biol Chem* 1997 Mar 28;272(13):8836]. *J Biol Chem.* 271: 30442-30450.

Demuth,H.U. (1990). Recent developments in inhibiting cysteine and serine proteases. *J Enzym Inhib.* 3: 249-278.

Denault,J.B., Lazure,C., Day,R., et Leduc,R. (2000). Comparative characterization of two forms of human SPC1 secreted from Schneider 2 cells. *Protein Expr Purif.* 19: 113-124.

Dixon,M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J.* 55:170-171.

Domingo,G.J., Leatherbarrow,R.J., Freeman,N., Patel,S., et Weir,M. (1995). Synthesis of a mixture of cyclic peptides based on the Bowman-Birk reactive

site loop to screen for serine protease inhibitors. *Int J Pept Prot Res.* 46: 79-87.

Dufour,E.K., Denault,J.B., Hopkins,P.C., et Leduc,R. (1998). Serpin-like properties of alpha1-antitrypsin Portland towards furin. *FEBS Lett.* 426: 41-46.

Fehrentz,J.A., et Castro,B. (1983). An efficient synthesis of optically active α -(*t*-Butoxycarbonylamino)-aldehydes from α -amino acids. *Synthesis* 676 : 676-678.

Fehrentz,J.A., Heitz,A., et Castro,B. (1985). Synthesis of aldehydic peptides inhibiting renin. *Int J Pept Protein Res.* 26:236-241.

Fields,G., et Noble,R. (1990). Solid phase peptide synthesis utilising 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* 35: 161-224.

Fricker,L.D., McKinzie,A.A., Sun,J., Curran,E., Qian,Y., Yan,L., Patterson,S.D., Courchesne,P.L., Richards,B., Levin,N., Mzhavia,N., Devi,L.A., et Douglass,J. (2000). Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci.* 20: 639-648.

Fuller,R.S., Brake,A.J., et Thorner,J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* 246: 482-486.

Fuller,R.S., Brenner,C., Gluschankof,P., et Wilcox,C.A. (1991). The yeast prohormone-processing Kex2 protease, an enzyme with specificity for paired basic residues. pp.205-214. Dans: *Methods in Protein Sequence Analysis.*

Jörnvall,H., Höög,J..O., et Gustavsson,A.M. (Eds), *Birkhäuser Verlag*, Basel.

Furuta,M., Yano,H., Zhou,A., Rouille,A., Holst,J.J., Carroll,R., Ravazzola,M., Orci,L., Furuta,H., et Steiner,D.F. (1997). Defective prohormone processing and altered pancreatic islets morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6646-6651.

Furuta,M., Carroll,R., Martin,S., Swift,H.H., Ravazzola,M., Orci,L., et Steiner,D.F. (1998). Incomplete processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of Des-31,32 proinsulin intermediates in islets of mice lacking active PC2. *J Biol Chem.* 273: 3431-3437.

Garred,O., van Deurs,B., et Sandvig,K. (1995). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem.* 270: 10817-10821.

Germain,D., Thomas,D.Y., et Boileau,G. (1993). Processing of Kex2 pro-region at two interchangeable cleavage sites. *FEBS Lett.* 323: 129-131.

Gisin,B.F. (1973). The preparation of Merrifield-resins through total esterification with cesium salts. *Helv Chim Acta* 56: 1476-1482.

Goodman,L.J., et Gorman,C.M. (1994). Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochem Biophys Res Commun.* 201, 795-804.

Gotoh,B., Ohnishi,Y., Inocencio,N.M., Esaki,E., Nakayama,K., Barr,P.J., Thomas,G., et Nagai,Y. (1992). Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/3. *J Virol.* 66: 6391-6397.

Gros,P., Kalk,K.H., et Hol,W.G. (1991). Calcium binding to thermitase. Crystallographic studies of thermitase at 0, 5, and 100 mM calcium. *J Biol Chem.* 266: 2953-2961.

Guichard,G., Briand,J.P., et Friede,M. (1993). Synthesis of arginine aldehydes for the preparation of pseudopeptides. *Peptide Res.* 6: 121-124.

Hallenberger,S., Bosch,V., Angliker,H., Shaw,E., Klenk,H.D., Garten,W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature (London)* 360: 358-361.

Hatsuzawa,K., Hosaka,M., Nakagawa,T., Nagase,M., Shoda,A., Murakami,K., et Nakayama,K. (1990). Structure and expression of mouse furin, a yeast Kex2-related protease. Lack of processing of coexpressed prorenin in GH4C1 cells. *J Biol Chem.* 265: 22075-22078.

Hatsuzawa,K., Nagahama,M., Takahashi,S., Takada,K., Murakami,K., et Nakayama,K. (1992). Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 267: 16094-16099.

Heinz,D.W., Priestle,J.P., Rahuel,J., Wilson,K.S., et Grütter,M.G. (1991). Refined crystal structures of subtilisin Novo in complex with wild-type and two mutant eglins: comparison with other serine proteinase inhibitor complexes. *J Mol Biol.* 217: 353-371.

Hooper,N.M., Karran,E.H., et Turner,A.J. (1997). Membrane protein secretases. *Biochem J.* 321: 265-279.

Huntington, J.A., Read, R.J., et Carrel, R.W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407: 923-926.

Hwang, J.R., et Lindberg, I. (2001). Inactivation of the inhibitory CT peptide depends on a functional furin cleavage site. *J Neurochem.* 79: 437-444.

Inocencio, N.M., Moehring J.M., et Moehring T.J. (1993). A mutant CHO-K1 strain with resistance to *Pseudomonas* exotoxin A is unable to process the precursor fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Virol.* 67: 593-595.

Jackson, R.S., Creemers, J.W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.L., Sanders, L., Montague, C.T., Hutton, J.C., et O'Rahilly, S (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet.* 16: 303-306.

Jean, F., Basak, A., Rondeau, N., Benjannet, S., Hendy, G.N., Seidah, N.G., Chrétien, M., et Lazure, C. (1993). Enzymic characterization of murine and human prohormone convertase-1 (mPC1 and hPC1) expressed in mammalian GH4C1 cells. *Biochem J.* 292: 891-900.

Jean, F., Basak, A., Dugas, H., Seidah, N.G., Chrétien, M., et Lazure, C. (1994). Design of octapeptide loop structures by modeling the active-site region of barley serine proteinase inhibitor-2. pp.613-615. Dans: Proceedings of the XIIIth American Peptide Symposium, "Peptides: chemistry, structure and biology". Hodges, R.S., et Smith, J.A. (Eds) ESCOM, Leiden.

Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N.G., et Lazure, C. (1995a). Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity

of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J Biol Chem.* 270: 19225-19231.

Jean,F., Basak,A., DiMaio,J., Seidah,N.G., et Lazure,C. (1995b). An internally quenched fluorogenic substrate of prohormone convertase 1 and furin leads to a potent prohormone convertase inhibitor. *Biochem J.* 307: 689-695.

Jean,F., Stella,K., Thomas,G., Foster,D.C., et Kisiel,W. (1998). alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci.* 95: 7293-7298.

Jiménez,C.R., Huang,L., Qui,Y., et Burlingame,A.L. (1998). Sample preparation for MALDI mass analysis of peptides and proteins. pp.13.3.1-16.3.6. Dans: *Current protocols in protein science 2*. Coligan,J.E., Dunn,B.M., Ploegh,H.L., Speicher,D.W., et Wingfield,P.T. (Eds) *John Wiley and Sons,Inc.*, New-York.

Johanning,K., Juliano,M.A., Lazure,C., Lamango,N.S., Steiner,D.F., et Lindberg,I. (1998). Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates. *J Biol Chem.* 273: 22672-22680.

Jonassen,I. (1980). Characteristics of *Hiproly Barley I*. Isolation and characterisation of two water-soluble high-lysine proteins. *Carlsberg Res Commun.* 45: 47-58.

Jones,B.J., Thomas,L., Molloy,S.S., Thulin,C.D., Fry,M.D., Walsh,K.A., et Thomas,G. (1995). Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J.* 14: 5869-5883.

Julius,D., Brake,A., Blair,L., Kunisawa,R., et Thorner,J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopaptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* 37: 1075-1089.

Jutras,I., Seidah,N.G., Reudelhuber,T., et Brechler,V. (1997). Two activation states of the prohormone convertase PC1 in the secretory pathway. *J Biol Chem.* 272: 15184-15188.

Kaiser,E., Colescott,R.L., Bossinger,C.D., et Cook,P.I. (1970). Color test for detection of free terminal amino group in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem.* 34: 595-598.

Kettner,C., et Shaw,E. (1981). Inactivation of trypsin-like enzymes with peptides of arginine chloromethyl ketone. pp.826-842. Dans: *Methods in Enzymology* 80. Lorand,L. (Ed.), *Academic Press,Inc.*, New-York.

Kiefer,M.C., Tucker,J.E., Joh,R., Landsberg,K.E., Saltman,D., et Barr,P.J. (1991). Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol.* 10: 757-769.

Klimpel,K.R., Molloy,S.S., Thomas,G., et Leppla,S.H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of the furin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10277-10281.

Landry,F., Lombardo,C.R., et Smith,J.W. (2000). A method for application of samples to matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight targets that enhances peptide detection. *Anal Biochem.* 279: 1-8.

Lazure,C., Gauthier,D., Jean,F., Boudreault,A., Seidah,N.G., Bennett,H.P., et Hendy,G.N. (1998). In vitro cleavage of internally quenched fluorogenic human parathyroid hormone and parathyroid-related peptide substrates by furin. Generation of a potent inhibitor. *J Biol Chem.* 273: 8572-8580.

Leatherbarrow,R.J., et Salacinski,H.J. (1991). Design of a small peptide-based proteinase inhibitor by modelling the active-site region of barley chymotrypsin inhibitor 2. *Biochemistry* 30: 10717-10721.

Leduc,R., Molloy.S.S., Thorne,B.A., et Thomas,G. (1992). Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem.* 267: 14304-14308.

Li,Y., Hu,Z., Jordan,F., et Inouye,M. (1995). Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. *J Biol Chem.* 270: 25127-25132.

Lipkind,G.M., Gong,Q. et Steiner,D.F. (1995). Molecular modeling of the substrate specificity of prohormone convertases SPC2 and SPC3. *J Biol Chem.* 270: 13277-13284.

Lipkind,G.M., Zhou,A., et Steiner,D.F. (1998). A model for the structure of the P domains in the subtilisin prohormone convertases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7310-7315.

Lipkind,G.M., et Steiner,D.F. (1999). Predicted structural alterations in proinsulin during its interactions with prohormone convertases. *Biochemistry* 38: 890-896.

Longstaff,C., Campbell, A.F., et Fersht,A.R. (1990). Recombinant chymotrypsin inhibitor 2: expression, kinetic analysis of inhibition with α -chymotrypsin and wild-type and mutant subtilisin BPN', and protein engineering to investigate inhibitory specificity and mechanism. *Biochemistry* 29: 7339-7347.

Lu,W., Zhang,W., Molloy,S.S., Thomas,G., Ryan,K., Chiang,Y., Anderson,S., et Laskowski,M.Jr. (1993). Arg15-Lys17-Arg18 turkey ovomucoid third domain inhibits human furin. *J Biol Chem.* 268: 14583-14585.

Lusson,J., Vieau,D., Hamelin,J., Day,R., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1993). cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6691-6695.

Maeder,D.L., Sunde,M., et Botes,D.P. (1992). Design and inhibitory properties of synthetic Bowman-Birk loops. *Int J Peptide Protein Res.* 40: 97-102.

Malide,D., Seidah,N.G., Chrétien,M., et Bendayan,M. (1995). Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic β -cells. *J Histochem Cytochem.* 43: 11-19.

Maquoi,E., Noel,A., Frankenne,F., Angliker,H., Murphy,G., et Foidart,J.M. (1998). Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. *FEBS Lett.* 424: 262-266.

Marcinkiewicz,M., Day,R., Seidah,N.G., et Chrétien,M. (1993). Ontogeny of the prohormone convertase PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and α -melanotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4922-4926.

Martens,G.J., Braks,J.A., Eib,D.W., Zhou,Y., et Lindberg,I. (1994). The neuroendocrine polypeptide 7B2 is an endogenous inhibitor of prohormone convertase PC2. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5784-5787.

Matthews,D.J., Goodman,L.J., Gorman,C.M., et Wells, J.A. (1994a). A survey of furin substrate specificity using substrate phage display. *Protein Sci.* 3: 1197-1205.

Matthews,G., Shennan,K.I., Seal,A.J., Taylor,N.A., Colman,A., et Docherty,K. (1994b). Autocatalytic maturation of the prohormone convertase PC2. *J Biol Chem.* 269: 588-592.

McPhalen,C.A., et James,M.N. (1987). Crystal and molecular structure of the serine proteinase inhibitor CI-2 from barley seeds. *Biochemistry* 26: 261-269.

McPhalen,C.A., et James,M.N. (1988). Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: eglin-c-subtilisin Carlsberg and CI-2-subtilisin Novo. *Biochemistry* 27: 6582-6598.

Meerabux,J., Yaspo,M.L., Roebroek,A.J., Van de Ven,W.J., Lister,T.A., et Young,B.D. (1996). A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at the chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res.* 56: 448-451.

Mizuno,K., Nakamura,T., Ohshima,T., Tanaka,S., et Matsuo,H. (1988). Yeast KEX2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun.* 156: 246-254.

Moehring,J.M., Inocencio,N.M., Robertson,B.J., et Moehring,T.J. (1993). Expression of mouse furin in a Chinese hamster cell resistant to *Pseudomonas* exotoxin A and viruses complements the genetic lesion. *J Biol Chem.* 268: 2590-2594.

Molloy,S.S., Bresnahan,P.A., Leppla,S.H., Klimpel,K.R., et Thomas,G. (1992). Human furin is a calcium-dependant serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem.* 267: 16396-16402.

Molloy,S.S., Thomas,L., VanSlyke,J.K., Stenberg,P.E., et Thomas,G. (1994). Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* 13: 18-33.

Molloy,S.S., Thomas,L., Kamibayashi,C., Mumby,M.C., et Thomas,G. (1998). Regulation of endosome sorting by a specific PP2A isoform. *J Cell Biol.* 142: 1399-1411.

Molloy,S.S., Anderson,E.D., Jean,F., et Thomas,G. (1999). Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* 9: 28-35.

Muller,L., Cameron,A., Fortenberry,Y., Apletalina,E.V, et Lindberg,I. (2000). Processing and sorting of the prohormone convertase 2 propeptide. *J Biol Chem.* 275: 39213-39222.

Muller,L., et Lindberg,I. (2000). The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 63: 69-108.

Munzer,J.S., Basak,A., Zhong,M., Mamarbachi,M., Hamelin,J., Savaria,D., Lazure,C., Benjannet,S., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1997). In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J Biol Chem.* 272: 19672-19681.

Nakagawa,T., Hosaka,M., Torii,S., Watanabe,T., Murakami,K., et Nakayama,K. (1993). Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J Biochem (Tokyo)* 113: 132-135.

Nakayama,K., Kim,W.S., Torii,S., Hosaka,M., Nakagawa,T., Ikemizu,J., Baba,T., et Murakami,K. (1992). Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J Biol Chem.* 267: 5897-5900.

Nakayama,K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J.* 327: 625-635.

Ohta,Y., Hojo,H., Aimoto,S., Kobayashi,T., Zhu,X., Jordan,F., et Inouye,M. (1991). Pro-peptide as an intramolecular chaperone: renaturation of denatured subtilisin E with a synthetic pro-peptide. *Mol Microbiol.* 5: 1507-1510.

O'Rahilly,S., Gray,H., Humphreys,P.J., Krook,A., Polonski,K.S., White,A., Gibson,S., Taylor,K., et Carr,C. (1995). Brief report: impaired processing of

prohormones associated with abnormalities of glucose homeostasis and adrenal function. *N Engl J Med.* 333: 1386-1390.

Ortmann,D., Ohuchi,M., Angliker,H., Shaw,E., Garten,W., et Klenk,H.D. (1994). Proteolytic cleavage of wild type and mutants of the F protein of human parainfluenza virus type 3 by two subtilisin-like endoproteases, furin and Kex2. *J Virol.* 68: 2772-2776.

Owen,M.C., Brennan,S.O., Lewis,J.H., et Carrell,R.W. (1983). Mutation of antitrypsin to antithrombin. α_1 -antitrypsin Pittsburg (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med.* 309: 694-698.

Paquet,L., Bergeron,F., Boudreault,A., Seidah,N.G., Chrétien,M., Mbikay,M., et Lazure,C. (1994). The neuroendocrine precursor 7B2 is a sulfated protein proteolytically processed by a ubiquitous furin-like convertase. *J Biol Chem* 269: 19279-19285.

Park,C.G., Jung,M.Y., Choi,Y., et Winslow,G.M. (1995). Proteolytic processing is required for viral superantigen activity. *J Exp Med.* 181: 1899-1904.

Pei,D., et Weiss,S.J. (1995). Furin-dependant intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375: 244-247.

Peterson,F.C., et Gettings,P.G. (2001). Insight into the mechanism of serpin-proteinase inhibition from 2D. *Biochemistry* 40: 6284-6292.

Plaimauer,B., Mohr,G., Wernhart,W., Himmelspach,M., Dorner,F., et Schlokot,U. (2001). "Shed" furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus. *Biochem J.* 354: 689-695.

Polette, M., et Birembaut, P. (1998). Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 30: 1195-1202.

Powers, J.C. (1977). Haloketone inhibitors of proteolytic enzymes. pp. 65-178. Dans: Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides, and proteins 4. Weinstein, B. (Ed.), *Marcel Dekker, Inc.*, New-York.

Qian, Y., Devi, L.A., Mzhavia, N., Munzer, S., Seidah, N.G., et Fricker, L.D, (2000). The C-terminal region of proSAAS is a potent inhibitor of prohormone convertase 1. *J Biol Chem.* 275: 23596-23601.

Raffin-Sanson, M.L., Bertagna, X., Mbikay, M., Seidah, N.G., et Chrétien, M. (1997). Les cliniciens se convertissent aux convertases. *médecine/sciences* 13: 1448-1453.

Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Leunissen, J.A., Onnekink, C., Bloemers, H.P., et Van de Ven, W.J. (1986). Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J.* 5: 2197-2202.

Roebroek, A.J., Umans, L., Pauli, I.G., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J., et Constam, D.B. (1998). Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* 125: 4863-4876.

Rothenberg, M.E., Eilertson, C.D., Klein, K., Mackin, R.B., et Noe, B.D. (1996). Evidence for redundancy in propeptide/prohormone convertase activities in processing proglucagon: an antisense study. *Mol Endocrinol.* 10: 331-341.

Rouille,Y., Westermark,G., Martin,S.K., et Steiner,D.F (1994). Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3242-3246.

Rouille,Y., Martin,S., et Steiner,D.F. (1995). Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem.* 270: 26488-26496.

Rovère,C., Luis,J., Lissitzky,J.C., Basak,A., Marvaldi,J., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1999). The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin alpha5beta1. *J Biol Chem.* 274: 12461-12467.

Sakai,J., Rawson,R.B., Espenshade,P.J., Cheng,D., Seegmiller,A.C., Goldstein,J.L., et Brown,M.S. (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell.* 2: 505-514.

Santavicca,M., Noel,A., Angliker,H., Stoll,I., Segain,J.P., Anglard,P., Chrétien,M., Seidah,N.G., et Basset,P. (1996). Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin-3 activation by 4-aminophenylmercuric acetate and furin-type convertases. *Biochem J.* 315: 953-958.

Sasaki,Y., et Coy,D.H. (1987). Solid phase synthesis of peptides containing the CH₂NH peptide bond isostere. *Peptides* 8: 119-121.

Sayah,M., Fortenberry,Y., Cameron,A., et Lindberg,I. (2001). Tissue distribution and processing of proSAAS by proprotein convertases. *J Neurochem.* 76: 1833-1841.

Schafer,M.K., Day,R., Cullinan,W.E., Chrétien,M., Seidah,N.G., et Watson,S.J. (1993). Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative *in situ* hybridization analysis. *J Neurosci.* 13: 1258-1279.

Schafer,W., Stroh,A., Berghofer,S., Seiler,J., Vey,M., Kruse,M.L., Kern,H.F., Klenk,H.D., et Garten,W. (1995). Two independant targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J.* 14: 2424-2435.

Schalken,J.A., Roebroek,A.J., Oomen,P.P., Wagenaar,D.S., Debruyne,F.M., Bloemers,H.P., et Van de Ven,W.J. (1987). fur gene expression as a discriminating marker for small cell nonsmall cell lung carcinomas. *J Clin Invest.* 80: 1545-1549.

Schechter,I., et Berger,A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* 27: 157-162.

Segel,I.H. (1993). Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. (Ed.), *John Wiley and Sons,Inc.*, New-York.

Seidah, N.G., Gaspar,L., Mion,P., Marcienkiewicz,M., Mbikay,M., et Chrétien,M. (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs

encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol.* 9: 789.

Seidah,N.G., Marcienkiewicz,M., Benjannet,S., Gaspar,L., Beaubien,G., Mattei,M.G., Lazure,C., Mbikay,M., et Chrétien,M, (1991a). Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol.* 5: 111-122.

Seidah,N.G., Day,R., Marcienkiewicz,M., Benjannet,S., et Chrétien,M, (1991b). Mammalian neural and endocrine pro-protein and pro-hormone convertases belonging to the subtilisin family of serine proteases. *Enzyme* 45: 271-284.

Seidah,N.G., Day,R., Hamelin,J., Gaspar,A., Collard,M.W., et Chrétien,M. (1992). Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol Endocrinol.* 6: 1559-1570.

Seidah,N.G. (1995). The mammalian family of subtilisin/kexin-like pro-protein convertases. pp. 181-203. Dans: Intramolecular chaperones and protein folding. Shinde,U., et Inouye,M. (Eds), *R.G. Landes Cie*, Austin,TX.

Seidah,N.G., Hamelin,J., Mamarbachi,M., Dong,W., Tadros,H., Chrétien,M., et Day,R. (1996a). cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3388-3393.

Seidah,N.G., Benjannet,S., Pareek,S., Savaria,D., Hamelin,J., Goulet,B., Laliberté,J., Lazure,C., Chrétien,M., et Murphy,R.A. (1996b). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian proprotein convertases. *Biochem J.* 314: 951-960.

Seidah,N.G., Day,R., Marcinkiewicz,M., et Chrétien,M. (1998). Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann NY Acad Sci.* 839: 9-24.

Seidah,N.G., Mowla,S.J., Hamelin,J., Mamarbachi,M., Benjannet,S., Touré.,B.B., Basak,A., Munzer,J.S., Marcinkiewicz,J., Zhong,M., Barale,J.C., Lazure,C., Murphy,R.A., Chrétien,M., et Marcinkiewicz,M. (1999). Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1321-1326.

Seidah,N.G., et Chrétien,M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 848: 45-62.

Shen,F.S., Seidah,N.G., et Lindberg,I. (1993). Biosynthesis of the prohormone convertase PC2 in Chinese hamster ovary cells and in rat insulinoma cells. *J Biol Chem.* 268: 24910-24915.

Shinde,U., Li,Y., Chatterjee,S., et Inouye,M. (1993). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6924-6928.

Sieber,P. (1987). An improved method for anchoring of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-amino acids to 4-alkoxybenzyl alcohol resin. *Tetrahedron Lett.* 49: 6147-6150.

Siezen,R.J., De Vos,W.M., Leunissen,J.A., et Dijkstra,B.W. (1991). Homology modelling and protein engineering strategy subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Eng.* 4: 719-737.

Siezen,R.J., Creemers,J.W., et Van De Ven,W.J. (1994). Homology modelling of the catalytic domain of human furin. *Eur J Biochem.* 222: 255-266.

Siezen,R.J. et Leunissen,J.A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* 6: 501-523.

Smeekens,S.P. et Steiner,D.F. (1990). Identification of a cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem.* 265: 2997-3000.

Smeekens,S.P., Avruch,A.S., LaMendola,J., Chan,S.J., et Steiner,D.F. (1991). Identification of a human insulinoma cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 340-344.

Smeekens,S.P., Chan,S.J., et Steiner,D.F. (1992a). The biosynthesis and processing of neuroendocrine peptides: identification of proprotein convertases involved in intravesicular processing. *Prog Brain Res.* 92: 235-243.

Smeeckens,S.P., Montag,A.G., Thomas,G., Albiges-Rizo,C., Carroll,R., Benig,M., Phillips,L.A., Martin,S., Ohagi,S., Gardner,P., Swift,H.H., et Steiner,D.F. (1992b). Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC1 and PC3. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8822-8826.

Spence,M.J., Sucic,J.F., Foley,B.T., et Moehring,T.J. (1995). Analysis of mutations in alleles of the *fur* gene from an endoprotease-deficient Chinese hamster ovary cell strain. *Somat Cell Mol Genet.* 21: 1-18.

Steiner,D.F., Cunningham,D., Spiegelman,L., et Aten,B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 157: 697-700.

Stieneke-Grober,A., Vey,M., Angliker,H., Shaw,E., Thomas,G., Roberts,C., Klenk,H.D., et Garten,W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 11: 2407-2414.

Svendsen,I., Martin,B., et Jonassen,I. (1980). Characteristics of *Hiproly Barley III*. Amino acid sequences of two lysine-rich proteins. *Carlsberg Res Commun.* 45: 79-85.

Takahashi,S., Kasai,K., Hatsukawa,K., Kitamura,N., Misumi,Y., Ikehara,Y., Murakami,K., et Nakayama,K. (1993). A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 195: 1019-1026.

Takahashi,S., Hatsukawa,K., Watanabe,T., Murakami,K., et Nakayama,K. (1994). Sequence requirements for endoproteolytic processing of precursor

proteins by furin: transfection and *in vitro* experiments. *J Biol Chem.* 116: 47-52.

Takahashi,S., Nakagawa,T., Kasai,K., Banno,T., Duguay,S.J., Van de Ven,W.J., Murakami,K., et Nakayama,K. (1995). A second mutant allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. Evidence for involvement of the homo B domain in autocatalytic activation. *J Biol Chem.* 270: 26565-26569.

Thomas,L., Leduc,R., Thorne,B.A., Smeekens,S.P., Steiner,D.F., et Thomas,G. (1991). Kex2-like endoproteases PC2 and PC3 accurately cleave a model prohormone in mammalian cells: evidence for a common core neuroendocrine processing enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5297-5301.

Tsuneoka,M., Nakayama,K., Hatsukawa,K., Komada,M., et Mekada,E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem.* 268: 26461-26465.

Van Rompaey,L., Ayoubi,T., Van De Ven,W., et Marynen,P. (1997). Inhibition of intracellular proteolytic processing of soluble proproteins by an engineered alpha 2-macroglobulin containing a furin recognition sequence in the bait region. *Biochem J.* 326: 507-514.

Vey,M., Schafer,W., Berghofer,S., Klenk,H.D., et Garten,W. (1994). Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol.* 127: 1829-1942.

Vey,M., Schafer,W., Reis,B., Ohuchi,R., Britt,W., Garten,W., Klenk,H.D., et Radsak,K. (1995). Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin. *Virology* 206: 746-749.

Vidricaire,G., Denault,J.B., et Leduc,R. (1993). Characterization of a secreted form of human furin endoprotease. *Biochem Biophys Res Commun.* 195: 1011-1018.

Van Horssen,A.M., van den Hurk,W.H., Bailyes,E.M., Hutton,J.C., Martens,G.J., et Lindberg,I. (1995). Identification of the region within the neuroendocrine polypeptide 7B2 responsible for the inhibition of prohormone convertase PC2. *J Biol Chem.* 270: 14292-14296.

Vishnuvardhan,D., et Beinfeld,M.C. (2000). Use of expression of antisense mRNA for proprotein convertases 1 and 2 in prohormone processing. *Methods Enzymol.* 314: 103-117.

Walker,J.A., Molloy,S.S., Thomas,G., Sakaguchi,T., Yoshida,T., Chambers,T.M., et Kawoaka,Y. (1994). Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *J Virol.* 68: 1213-1218.

Watanabe,M., Hirano,A., Stenglein,S., Nelson,J., Thomas,G., et Wong,T.C. (1995). Engineered serine protease inhibitor prevents furin-catalyzed activation of the fusion glycoprotein and production of infectious measles virus. *J Virol.* 69: 3206-3210.

Watson,D.G., Moehring,J.M., Moehring,T.J. (1991). A mutant CHO-K1 strain with resistance to Pseudomonas exotoxin A and alphaviruses fails to cleave Sindbis virus glycoprotein PE2. *J Virol.* 65: 2332-2339.

Westphal,C.H., Muller,L., Zhou,A., Zhu,X., Bonner-Weir,S., Schambelan,M., Steiner,D.F., Lindberg,I., et Leder,P. (1999). The neuroendocrine protein 7B2 is required for peptide hormone processing *in vivo* and provides a novel mechanism for pituitary Cushing's disease. *Cell* 96: 689-700.

Wilcox,C.A., et Fuller,R.S. (1991). Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *J Cell Biol.* 115: 297-307.

Wilson,H.E., et White,A. (1998). Prohormones: their clinical relevance. *Trends Endocrinol Metab.* 9: 396-402.

Zarkik,S., Decroly,E., Wattiez,R., Seidah,N.G., Burny,A., et Ruyschaert,J.M. (1997). Comparative processing of bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp72 by subtilisin/kexin-like mammalian convertases. *FEBS Lett.* 406: 205-210.

Zheng,M., Streck,R.D., Scott,R.E., Seidah,N.G., et Pintar,J.E. (1994). The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic capacity. *J Neurosci.* 14: 4656-4673.

Zhong,M., Munzer,J.S., Basak,A., Benjannet,S., Mowla,S.J., Decroly,E., Chrétien,M., et Seidah,N.G. (1999). The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. *J Biol Chem.* 274: 33913-33920.

Zhou,Y., et Lindberg,I. (1993). Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *J Biol Chem.* 268: 5615-5623.

Zhou,A., et Mains,R.E. (1994). Endoproteolytic processing of proopiomelanocortin and prohormone convertases 1 and 2 in neuroendocrine cells overexpressing prohormone convertases 1 or 2. *J Biol Chem.* 269: 17440-17447.

Zhou,A., Martin,S., Lipkind,G.M., LaMendola,J., et Steiner,D.F. (1998). Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem.* 273: 11107-11114.

ANNEXE 1

Article :

**« Characterization of ostrich (*Struthio camelus*) β -
microseminoprotein (MSP): identification of homologous
sequences in EST databases and analysis of their evolution
during speciation »**

N.B. : J'ai eu la chance, au cours de mes études de maîtrise, de participer à un tout autre projet dans le laboratoire du Dr Lazure, qui a généré cet article. Je l'ai placé en annexe car, même si le sujet est différent de celui de ce mémoire, cela m'a permis de mettre en pratique une bonne partie des apprentissages acquis dans le cadre de ma maîtrise. Inversement, cela m'a fait découvrir de nouvelles techniques qui m'ont ensuite été utiles dans la poursuite de mon projet de recherche.

Characterization of ostrich (*Struthio camelus*) β -microseminoprotein (MSP): Identification of homologous sequences in EST databases and analysis of their evolution during speciation

CLAUDE LAZURE,¹ MICHÈLE VILLEMURE,¹ DANY GAUTHIER,¹ RYNO J. NAUDÉ,²
AND MAJAMBU MBIKAY³

¹Laboratory of Structure and Metabolism of Neuropeptides, Institut de recherches cliniques de Montréal (affiliated with the University of Montréal), Montréal, Québec H2W 1R7, Canada

²Department of Biochemistry and Microbiology, University of Port Elizabeth, Port Elizabeth 6000, Republic of South Africa

³Ottawa Health Research Institute at Ottawa Hospital (University of Ottawa), Ottawa, Ontario K1Y 4K9, Canada

(RECEIVED February 15, 2001; FINAL REVISION July 18, 2001; ACCEPTED August 6, 2001)

Abstract

β -Microseminoprotein, alternatively called prostatic secretory protein of 94 amino acids, is a hydrophilic, unglycosylated, small protein rich in conserved half-cystine residues. Originally found in human seminal plasma and prostatic fluids, its presence was later shown in numerous secretions and its homologs were described in many vertebrate species. These studies showed that this protein had rapidly evolved, but they failed to unambiguously identify its biological role. Here, we show that a protein isolated from ostrich pituitary gland is closely related to a similar one isolated from chicken serum and that the two are structurally related to the mammalian β -microseminoprotein. The complete 90-amino acid sequence of the ostrich molecule was established through a combination of automated Edman degradation and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometric procedures, including postsource decay (PSD) and ladder sequencing analyses. This study documents for the first time that β -microseminoprotein is present in aves. It is also the first report of a C-terminal amidated form for a member of this protein family and the first in which the disulfide linkages are established. Database searches using the herein-described amino acid sequence allowed identification of related proteins in numerous species such as cow, African clawed frog, zebrafish, and Japanese flounder. These small proteins show a strikingly high rate of amino acid substitutions, especially across phyla boundaries. Noticeably, no β -microseminoprotein-related gene could be found in the recently completed fruit fly genome, indicating that if such a gene exists in arthropods, it must have extensively diverged from the vertebrate ones.

Keywords: Microseminoprotein; prostate secretory protein; protein evolution; *Struthio camelus*; protein sequencing; disulfide bonds

β -Microseminoprotein (MSP), also called the prostate secretory protein of 94 amino acids (PSP₉₄), is a small ungly-

cosylated protein derived from a 114-amino acid prepro-tein. It was initially reported as an abundant protein of the human seminal plasma (1 mg/mL) showing inhibin-like activity, that is, it is capable of inhibiting pituitary secretion of follicle-stimulating hormone (Thakur et al. 1981). However, other studies failed to confirm this activity (Kohan et al. 1986; Gordon et al. 1987). A variety of roles and potential uses of this protein, some not mutually exclusive, have been

Reprint requests to: Claude Lazure, Laboratory of Structure and Metabolism of Neuropeptides, Institut de recherches cliniques de Montréal, 110 Pine Avenue West, Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7; e-mail: lazurec@ircm.qc.ca; fax: (514) 987-5542.

Article and publication are at <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1101/ps.06501>.

proposed (Table 1), resulting in its designation by other names such as immunoglobulin-binding factor (Liang et al. 1991) and prostatic inhibin peptide (Garde et al. 1993b). MSP is primarily expressed in the prostate and is found in prostatic secretions of various mammals. However, immunohistochemical and Northern blot analyses have shown its presence in other tissues and biological fluids. Indeed, studies have shown it to be present in nonreproductive organs such as the gastrointestinal tract (especially in gastric mucosa, where it is expressed in mucin-producing cells [M-cells] and endocrine-type cells [E-cells]; Weiber et al. 1999; Ulvsbäck et al. 1989) and the respiratory tract (including tracheal, bronchial, and lung tissues; Ulvsbäck et al. 1989; Weiber et al. 1990). Even within a single species, the MSP sequence has been observed in cDNA libraries from a variety of tissues. For example, the UniGene site at National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>) lists 398 expressed sequence tag (EST) sequences of human MSP arising from expression in blood, brain, lung, testis, and prostate. Finally, MSP was shown not to be restricted to male tissues because the protein was isolated from porcine ovarian lutein cells (Tanaka et al. 1995), and its gene expression was recently reported in female reproductive tissues, breast, and endometrial cancer cell lines (Baijal-Gupta et al. 2000). Its single gene in human has been mapped on chromosome 10q11.2 (Ulvsbäck et al. 1991; Sasaki et al. 1996), outside the previously identified LOH (loss of heterozygosity) regions in prostate can-

cer cells, thereby casting a doubt on its putative role as a tumor suppressor gene. However, in one report, PSP₉₄ has been shown to inhibit the growth of a human prostatic carcinoma cell line in culture and in athymic mice (Garde et al. 1999). Also, an abstract at the most recent European Peptide Symposium described results showing that synthetic decapeptides corresponding to the extreme MSP C-terminal region show growth inhibitory properties on prostate tumor cells (Kele et al. 2000).

Despite the lack of a well-established biological function, MSP has attracted scientific interest as a unique example of a rapidly evolving protein (Nolet et al. 1991; Fernlund et al. 1996; Mäkinen et al. 1999). Indeed, the primary structure of MSP shows a remarkably low level of conservation in amino acids among the species studied, often resulting in great variation of physico-chemical properties. Such a great number of amino acid substitutions has for years rendered the identification of MSP using immunological or hybridization techniques difficult in more distant species. Indeed, comparison of known sequences from human (Mbikay et al. 1987), rhesus monkey (Nolet et al. 1991), baboon (Xuan et al. 1997), cotton-top tamarin (Mäkinen et al. 1999), pig (Fernlund et al. 1994; Tanaka et al. 1995), rat (Fernlund et al. 1996), and mice (Xuan et al. 1999) reveals that apart from the 10 completely conserved half-cystine residues, these proteins share very few other conserved residues. This is further confirmed in sequence identities. For example, between the human sequence and that of rhesus monkey,

Table 1. Putative biological roles and uses of β -microseminoprotein (MSP) (1981–2000)

Proposed biological role and/or use	References
Inhibitor of FSH secretion (inhibin) ^a	Thakur et al. 1981
Sperm-coating protein	Tsuda et al. 1982
Barrier to interspecies fertility ^b	Brooks et al. 1986
	Doctor et al. 1986
Marker of prostate gland hyperplasia and neoplasia ^c	Dubé et al. 1987a
	Abrahamsson et al. 1988
Factor modifying mucus properties ^d	Weiber et al. 1990
Protective function for mucus (enzyme inhibitor and/or antibacterial agent) ^d	Weiber et al. 1990
Immunoglobulin Binding Factor (IgBF) ^e	Liang et al. 1991
	Garde et al. 1993a,b
Hormone-refractory prostate tumor growth inhibitor ^f	Lokeshwar et al. 1993
	Mundel and Sheth 1993
Sperm motility inhibiting factor (Na ⁺ , K ⁺ -ATPase inhibitor)	Chao et al. 1996
Binding to proteins found on LNCaP and PC-3 cells	Yang et al. 1998a,b
Tumor marker for gastric carcinoid disease	Weiber et al. 1999

^a This role could not be confirmed through in vitro biological assays (Kohan et al. 1986; Gordon et al. 1987).

^b This role though also ascribed to MSP (Mbikay et al. 1988) was associated *vide infra*, with molecules of evolutionary divergent structures found in urogenital tissues.

^c The usefulness of MSP as a cancer marker is disputed, considering the demonstrated lack of correlation (Von der Kammer et al. 1993) and its demonstrated presence in numerous nonurogenital tissues (Weiber et al. 1990).

^d Both of these roles are still hypothetical as no data to substantiate them is currently available.

^e Involvement of MSP as a member of an Ig-binding protein family was further proposed (Kamada et al. 1998).

^f Further studies showed that MSP appears able to induce apoptosis of prostate tumor cancer cells (Garde et al. 1999).

porcine, and rat, the identity is of 79%, 51%, and 45%, respectively. Furthermore, analysis of the cloned cDNA and genomic sequences also revealed that most amino acid substitutions did not occur following the classical "wobble hypothesis" by mutations at the third base of codons, but rather by mutations at the first and second bases (Fernlund et al. 1996; Mäkinen et al. 1999). In addition, comparative analysis of the complete genomic sequences indicates that exons evolve at double the rate of introns (Mäkinen et al. 1999). In some species, further MSP diversity is generated through gene duplications and alternate transcription. In cotton-top tamarin, for example, there are three known functional genes specifying closely related MSP sequences (Mäkinen et al. 1999). In human tissues, two different MSP mRNAs resulting from alternate splicing have been identified. The major one encodes the prostatic form of 94 amino acids; the minor one, a frame-shift variant of 57 amino acids that is mostly expressed in urogenital tissues (Xuan et al. 1995).

Studying the sequence, expression pattern, and tissue distribution of homologous or orthologous MSP genes could contribute to a better understanding of the molecular evolution of this protein and to eventual elucidation of its biological role. This paper describes for the first time the primary structure of a MSP-like molecule isolated from pituitary extracts of a ratite, the ostrich (*Struthio camelus*). Database searches led to the identification of related sequences in several species including bovids, batracians, and fish.

Results

From 1987 to 1992, we purified and characterized numerous ostrich adenohypophyseal hormones and/or proteins, including corticotropin (Naudé and Oelofsen 1977), both neurophysins (Lazure et al. 1989, 1990), a chromogranin A-related fragment (Lazure et al. 1987), and the N-terminal proopiomelanocortin fragment (Naudé et al. 1993). In 1987, we determined a 33-amino acid N-terminal sequence of a protein that proved, in its native form, remarkably resistant to cleavage by proteases. The sequence showed no significant resemblance to any protein known at the time. For many years, we searched protein and DNA databases for related sequences to no avail. More recently, we identified a unique partial sequence that displayed >50% sequence identity to the ostrich's sequence. This sequence corresponded to a chicken blood plasma protein that was antigenically cross-reactive with chicken β_2 -microglobulin but completely dissimilar in sequence to the latter (Warr 1990). With the emergence of fast and reliable means to determine nucleic acid sequences, there has been a tremendous increase in available cDNA sequences known as ESTs. Using the TBLASTN algorithm, we screened EST databases for sequences related to the chicken protein and identified two

EST hits: one from liver (GenBank accession No. AW198358), the other from activated T cell libraries (GenBank accession No. AI979828; Tirunagaru et al. 2000). These ESTs clearly encoded a MSP-related protein based on the distribution and number of half-cystines as well as the size of the protein. To gain some insight into evolution of this intriguing molecule, we decided to also determine the complete amino acid sequence of the ostrich protein.

Determination of the ostrich MSP primary sequence and disulfide linkages

Though it is difficult to estimate the amount of protein extracted and purified from ostrich pituitary, it was nevertheless possible to recover ~1.1 mg of relatively pure MSP in the original reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) fraction 6D-2 (see Materials and Methods). Following reduction and alkylation, we determined the first 49 N-terminal residues in a single sequenator run (Fig. 1). This determination not only confirmed the assignment of the first 33 amino acids we made >10 years ago, but it also allowed (1) positive identification of seven half-cystine residues occupying positions identical to those in mammalian MSPs (positions 2, 16, 34, 37, 39, 46, and 47, respectively) and (2) the localization at position 44 of the Met residue, predicted on the basis of amino acid composition of ostrich MSP (data not shown).

Subsequent sequences and mass analyses of the various peptides resulting from either endoproteinase AspN digestion (Fig. 2A) or cyanogen bromide (CNBr) cleavage (Fig. 2B) allowed us to determine the complete sequence (Fig. 3). It is worth noting that chemical cleavage through CNBr was

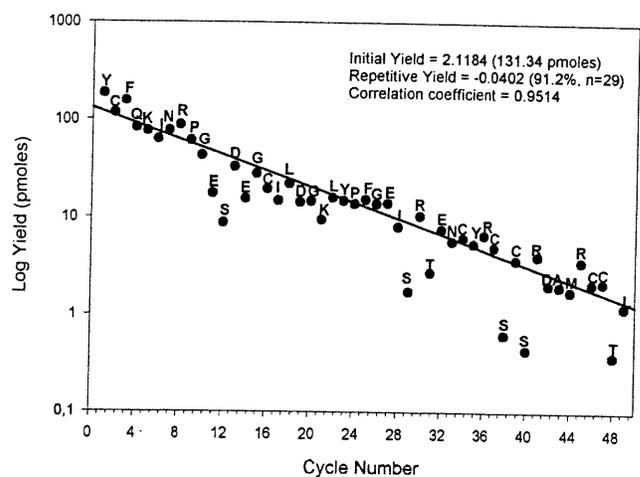


Fig. 1. Automatic N-terminal sequence of reduced and carboxamidated ostrich β -microseminoprotein. Quantitative yields of phenylthiohydantoin (PTH) amino acids normalized to a PTH internal standard are illustrated as a function of residue numbers. The slope and intercept were obtained by a linear regression analysis on 29 selected stable PTH amino acids.

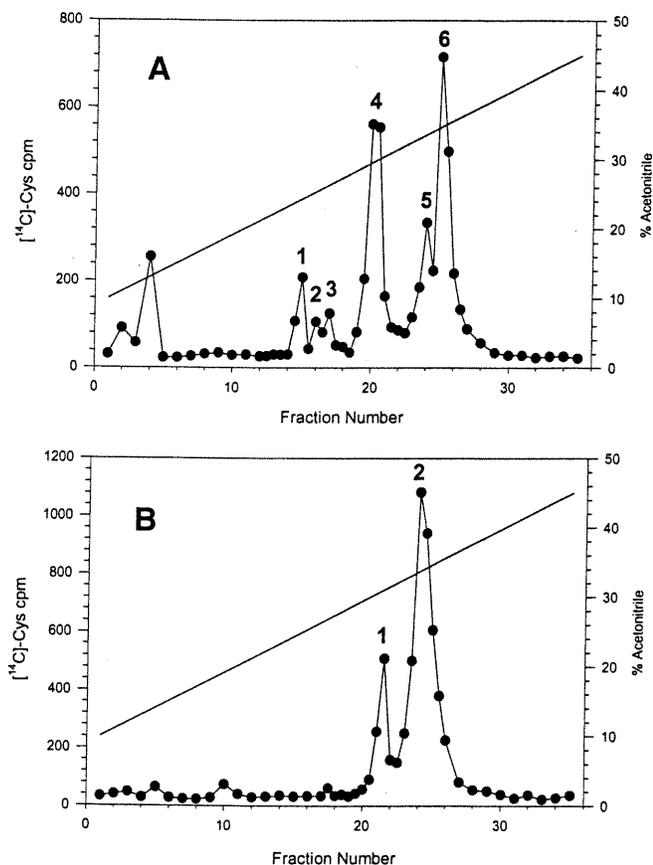


Fig. 2. Narrow-bore reverse-phase high-performance liquid chromatography separation of peptides, resulting from enzymatic digestion with endoproteinase AspN (A) and chemical cleavage with cyanogen bromide (B) of reduced and carboxamidated ostrich β -microseminoprotein. Elution was performed as described in the Materials and Methods section and using a TFA/acetonitrile gradient as shown. Fractions of 100 μL were manually collected, and the amount of radioactivity (in 5 μL aliquots) was determined by scintillation counting.

far from quantitative, as can be seen from the ratio of radioactivity in each peak. Indeed, ideally the ratio should have been unity as each fragment contains the same number (five) of half-cystine residues. This discrepancy is most probably because of extensive oxidation of the single Met residue over the years of storage, making it unreactive to CNBr. Nevertheless, sequencing of the material present in the early eluting peak (peak 1 in Fig. 2B) yielded positions 45–75 (repetitive yield, 87.9%; initial yield, 37 pmoles with a correlation coefficient of 0.9160 [$n = 15$]; data not shown). Peak 2 (Fig. 2B) contained both the CNBr-unreactive material as well as the N-terminal fragment 1–44. Isolation and chemical characterization of peptides AspN1, AspN3, and AspN4 arising from the endoproteinase AspN provided an independent confirmation of residues occupying positions 1–12 (peak 1 in Fig. 2A), 19–41 (peak 4), and 42–65 (also present in peak 4), respectively. The C-terminal sequence was determined from a peptide encompassing po-

sitions 73–90 (peak 3) and hence containing a Lys-Asp-Asp-Pro sequence that was cleaved very poorly by the AspN enzyme. This peptide, which contained AspN5, AspN6, and AspN7 together, also proved difficult to sequence because of a consistently poor repetitive yield (~75% to 77%; data not shown). Together, each position was sequenced on two to four occasions, with the exception of the Ser occupying position 69. Similarly, because of the rapidly decreasing repetitive yield, it was difficult to unambiguously deduce the amino acid sequence following position 87.

The C-terminal sequences of peptide AspN3 and AspN4 were confirmed through analysis of the peptides derived following carboxypeptidase-P digestion and ladder sequencing by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) as shown in Figure 4A and 4B. The deduced sequence for AspN3 corresponded to C(CAM)-Y-R-C(CAM)-S-C(CAM)-S-R; for AspN4, it corresponded to V-G-Y-N-K-E-K-C(CAM)-K-V-V-F-N-K-E-S-C(CAM)-N-Y and confirmed the Ser at position 69 and the Tyr at position 72. On the other hand, a similar analysis could not be conducted with the two C-terminal peptides 73–90 (AspN5/6/7) and 78–90 (AspN7, present in peak 2), as these proved resistant to the action of carboxypeptidase-P or -Y. A possible explanation for this resistance was that their C terminus is amidated. The AspN5/6/7 and AspN7 peptides, which yielded ions of m/z of 2175.4 and 1605.1, respectively (theoretical m/z , 2174.1 and 1604.8), were analyzed using fragmentation of the parent ion induced through laser excitation with the postsource decay (PSD) mode. Results deduced from analysis of the y-series (from y_3 to y_{11}) and b-series (from b_2 to b_{11}) ions confirmed the sequence C(CAM)-F-V-Y-S-R-V (data not shown). Furthermore, following enzymatic digestion by Arg-C protease of a fraction containing fragment 78–90; 80–90 (m/z , 1371.0; likely to result from acid cleavage of the Asp-Pro bond); and 83–90 (m/z , 1058.7; likely to result from cleavage by AspN N-terminal to a Glu residue as sometimes noticed; see discussion forum at <http://www.abrf.org>), all masses of the resulting peptides were decreased by 98.2 mass units, and these peptides were no longer resistant to the action of carboxypeptidases, hence confirming that the Val is amidated (data not shown). Such analyses confirmed the previously deduced sequence and further identified positions 87–88 as being Tyr-Ser and 89–90 as being Arg-Val. Identification of these residues is in full agreement with the observed masses of each respective parent ion.

In our effort to determine the disulfide linkages of ostrich MSP, one major difficulty was its resistance in its native state to trypsin and other proteolytic enzymes (data not shown). Indeed, even under prolonged digestion with a high ratio of enzyme to substrate, numerous potential sites of cleavage were not efficiently cleaved. This rendered identification of fragments difficult by the very sensitive

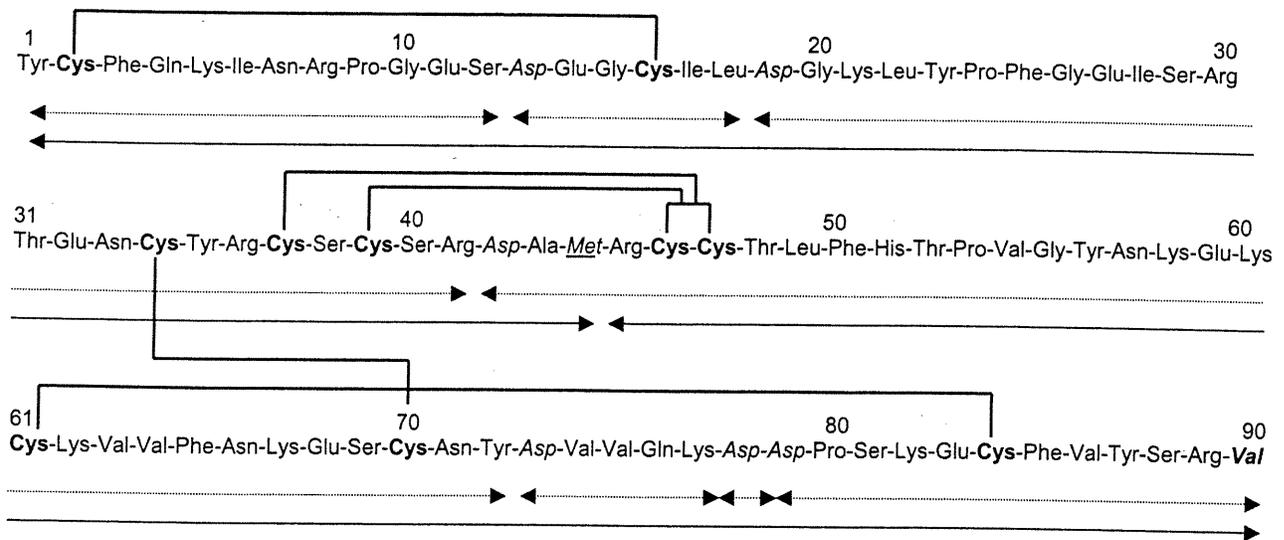


Fig. 3. The complete amino acid sequence of ostrich β -microseminoprotein. The peptides resulting from cyanogen bromide cleavage are shown with full arrows, whereas those resulting from cleavage using endoproteinase AspN are shown with broken arrows. Half-cysteine residues are shown in bold lettering, whereas Asp and Met residues are shown in italics and underlined italics, respectively. The proposed disulfide pairing is indicated by the thick lines joining the half-cysteine residues, whereas the proposed amidated C-terminal Val residue is shown in bold italics.

MALDI-TOF analysis. Nevertheless, as indicated in Table 2, with a single exception, we were able to isolate each disulfide-linked peptide and, on reduction and alkylation, to identify the peptides involved in the linkage. The exception was the peptide pair involving peptide 37–41 and peptide 46–58, linked by two disulfide bridges. In this case, it was not possible to determine the linkages between Cys-37 and Cys-41 to the Cys residues composing the pair 46–47 (see Fig. 3). This linkage may eventually be determined by de novo chemical synthesis, nuclear magnetic resonance or X-ray crystallography studies.

Comparison of the ostrich MSP sequence to mammalian, chicken, and EST-derived sequences

Table 3 provides the pairwise percentages of overall identity between the various MSP-related proteins (signal peptides excluded). These identities are illustrated in a multiple alignment of their amino acid sequences shown in Figure 5A. Except between baboon and rhesus monkey, they are generally <80%. Expectedly, they are greater within orders than between orders. Thus, although the ostrich and chicken sequences show 57% overall similarity, the similarity of either one to the related sequences in other species generally decreases <40%. Within orders, one can easily identify continuous stretches of relatively high similarities and identities between species. Such stretches are observed between rat and mouse, human and other primates, chicken and ostrich, and flounder and zebrafish (boxed in Fig. 5A). Such an

intraspecific conservation of amino acid clusters has been previously pointed out for rodent and primate MSP sequences (Fernlund et al. 1996; Mäkinen et al. 1999). A consensus sequence was difficult to derive from the alignment of all the sequences as, apart from the half-cysteine residues, there is very little amino acid conservation across species. This observation explains the great difficulty previously encountered in finding homologs and/or orthologs in species other than primates.

We searched in the various databases for related proteins using the TBLASTN v2.0.12 algorithm, and as a query, either the full ostrich sequence determined in this study, the previously found chicken EST (GenBank, accession Nos. AI97928 and AW198358), or a hypothetical sequence containing the most conserved residues in all available oligonucleotide or amino acid sequences. The search allowed the identification of five candidate MSP-related sequences. The first sequence identified in the nonhuman and nonmouse EST bank was a partial bovine sequence (accession No. AW336761; E value of 2×10^{-7}), encompassing the first 42 N-terminal residues of the mature protein preceded by a 20-amino acid signal peptide. This sequence was present in a cDNA library of pooled lymph node, ovary, fat, hypothalamic, and pituitary tissues. It encodes a segment of the mature MSP that is 100% identical to the porcine homolog and highly similar to other mammalian MSP sequences (data not shown). The second EST sequence identified in the search yielded an open reading frame encoding a protein of 111 amino acids, including a 20-amino acid putative

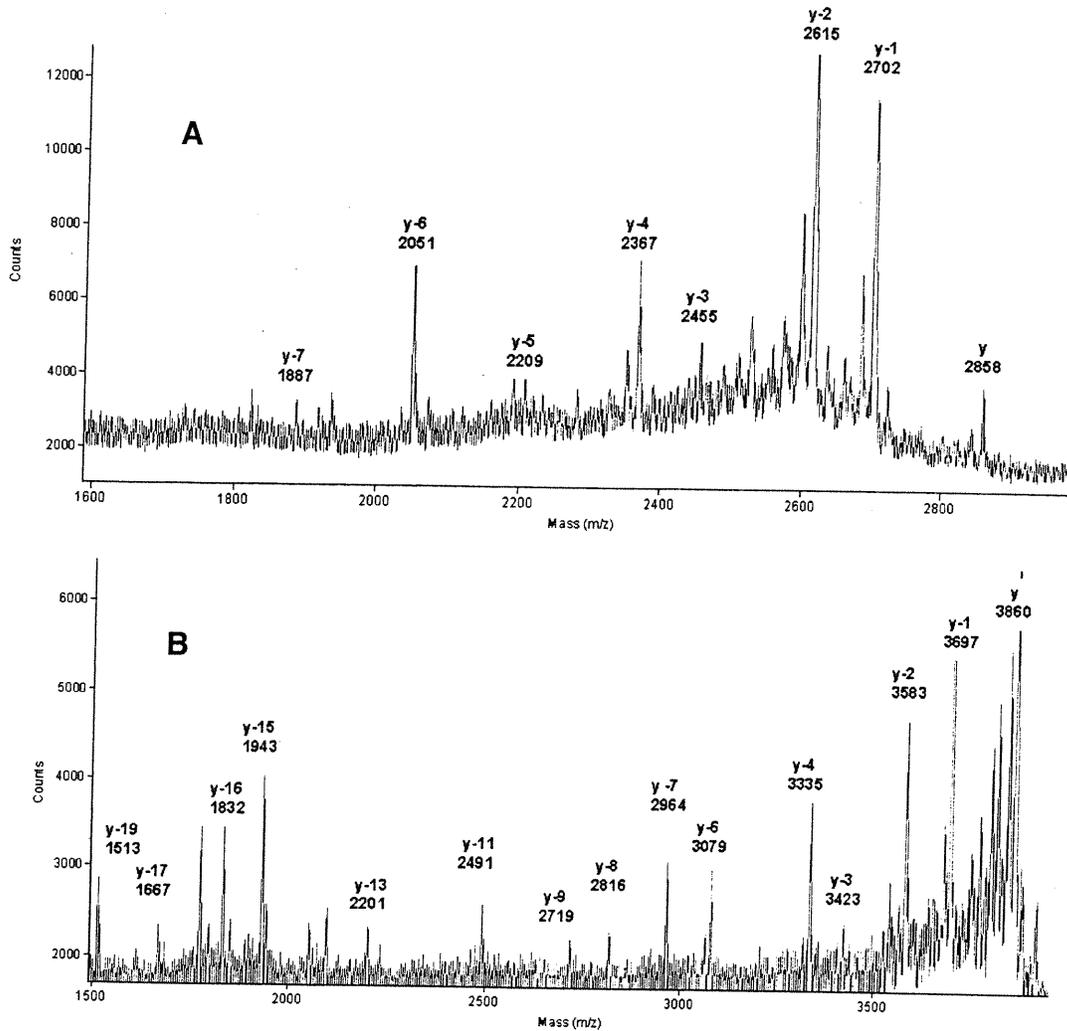


Fig. 4. (A) C-terminal ladder sequencing of peptide AspN3 following carboxypeptidase-P digestion. The reverse-phase high-performance liquid chromatography isolated, reduced, and carboxamidated AspN3 peptide was digested with carboxypeptidase-P for 30 sec as described in Materials and Methods, and the resulting mass spectrogram was obtained. The y ion corresponds to the complete peptide 19–41 (theoretical m/z , 2859), and the y-n label denotes the loss of n amino acids from the C terminus. (B) C-terminal ladder sequencing of peptide AspN4 following carboxypeptidase-P digestion. The RP-HPLC isolated reduced and carboxamidated AspN4 peptide was digested with carboxypeptidase-P for 60 sec as described in Materials and Methods, and the resulting mass spectrogram was obtained. The y ion corresponds to the complete peptide 42–72 (theoretical m/z , 3857), and the y-n label denotes the loss of n amino acids from the C terminus.

signal peptide (accession No. AW641318; E-value of 2×10^{-15}). It was isolated from a *Xenopus* egg cDNA library. Its closest relatives are the chicken and ostrich MSPs (see Table 3 and Fig. 5A). The third EST sequence was from zebrafish (accession No. AI497271; E value of 8×10^{-5}); it encoded a 90–amino acid mature protein preceded by a 20-residue signal sequence. Apart from the conserved 10 half-cystines, this sequence was unique as it bears little identity with MSP from other species. The last two EST sequences identified were found in a cDNA library of Japanese flounder liver and spleen. One of them (herein referred to as flounder-1, accession No. C23089; E-value of

3×10^{-6}) encodes an 87–amino acid mature protein containing 10 half-cystine residues and preceded by a 19-residue signal peptide; the other one (herein referred to as flounder-2, accession No. C23023; E-value of 0.81) encodes a 97–amino acid mature protein containing 12 half-cystines preceded by a 19-residue signal sequence. Despite the little similarity between the flounder-2 sequence and other MSPs (see Fig. 5A), it was nevertheless included in this family because of its significant overall identity (54%) with flounder-1 sequence (Table 3). These sequences are very probably related to MSPs despite the extensive non-conservation of residues with mammalian species. To verify

Table 2. Proposed disulfide linkages of ostrich β -microseminoprotein (MALDI-TOF)

Native tryptic peptide (M + H) ⁺		Reduced and alkylated peptide pairs (M + H) ⁺				Tryptic peptides identified (positions)
Observed	Computed	Observed	Computed	Observed	Computed	
2389.5	2392.1	741.6	746.3	1760.7	1760.8	(1–5) + (6–21)
1967.5	1970.8	843.6	843.3	1242.7	1241.5	(31–36) + (68–77)
1950.4	1953.9	—	565.3	1503.0	1503.7	(59–62) + (78–89)
1693.3	1696.8	—	307.1	1503.0	1503.7	(61–62) + (78–89)
2037.6	2038.9	671.3	670.2	1599.6	1597.7	(37–41) + (46–58)

this relatedness, we computer analyzed the phylogenic arrangement of all sequences (signal peptide excluded) shown in Table 3. In the resulting evolutionary tree (Fig. 5B), sequences are clearly grouped into specific branches for fish, amphibians, birds, rodents, ungulates, and primates. Based on this tree, cotton-top tamarin sequences diverged early from those of other primates, consistent with the percentages of primary structure identities among them (see Table 3).

Interestingly, unlike their mammalian counterparts, non-mammalian MSP sequences (the chicken one excepted) contain a Gly residue at either the penultimate or the C-terminal position (see Fig. 5A), indicating that like ostrich MSP, they might be terminally amidated through the activity of the peptidylglycine α -amidating monooxygenase (PAM). In cases in which the Gly residue occupies the penultimate position, as in the flounder and zebrafish sequences, this residue could be easily uncovered by removal of the C-terminal Lys residue through the action of carboxypeptidase-E or -H. Both PAM and carboxypeptidase-E are processing enzymes normally found in the secretory granules of the regulated pathway of secretion.

Discussion

This study reveals that a peptide long thought to function in mammalian reproductive tissues not only is expressed in a variety of other tissues, many of them without any role in reproduction, but also is present in many other species. MSP-related sequences are now known for representatives of the following classes and orders: artiodactyls (cow and porcine), primates (human, apes, and monkeys), rodents (rat and mouse), birds (chicken and ostrich), amphibians (*Xenopus*), and fish (zebrafish and flounder). The avian MSP closely resembles the *Xenopus* one, in agreement with the now favored view of evolutionary divergence of amniote vertebrates, which places birds closer to reptilians (such as crocodiles) and amphibians than to mammals (Hedges 1994; Hedges and Poling 1999). MSP could thus be considered a valid marker of speciation. The finding of related sequences in metatheria (marsupials), reptiles, and insects may allow further verification of this proposal. Intriguingly, no sequence that, by overall size and half-cystine distribution, could unambiguously be related to MSP was identified among back-translated proteins deduced from the now com-

Table 3. Sequence identity between reported β -microseminoprotein

Species	B	Rh	Ta-e1	Ta-j1	Ta-a1	P	R	M	O	C	X	F-1	F-2	Z
H	79	79	71	70	60	51	45	44	39	38	33	28	21	24
B		94	67	66	51	51	49	44	39	37	35	29	20	21
Rh			67	67	52	53	50	46	40	40	36	28	19	22
Ta-e1				69	64	49	44	40	36	37	34	26	21	25
Ta-j1					64	52	43	38	40	38	39	30	22	23
Ta-a1						49	42	34	40	41	35	30	23	26
P							43	40	33	32	36	27	24	25
R								62	33	31	28	25	19	22
M									33	33	28	23	23	21
O										57	40	35	23	29
C											43	32	22	31
X												37	24	26
F-1													54	37
F-2														29

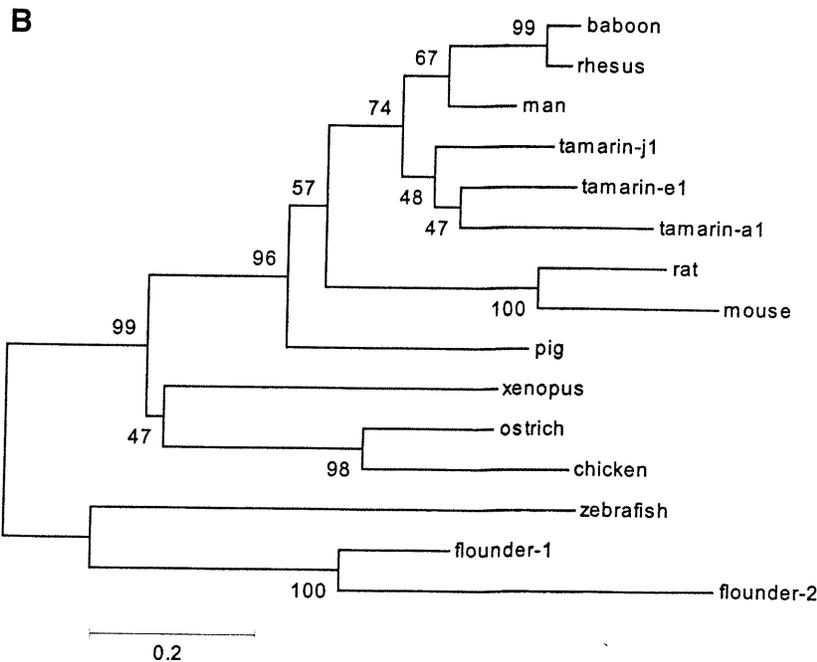
The sequence identities in percentages (to the nearest full integer) were determined following pair-wise comparison of full-length sequences of β -microseminoproteins (signal peptides excluded) using the Align algorithm at <http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align.guess.cgi>.

B, Baboon; Rh, Rhesus monkey; Ta, cotton-tail tamarin; P, pig; R, rat; M, murine; O, ostrich; C, chicken; X, African clawed-frog; F, Japanese flounder; Z, zebrafish; and H, human.

A

man	SCYFIPNEGVPDSTRK CMDLK-GNKH PINSEWQTDN CETCTCYET-EISCC TL	52
baboon	SCSFMPNERFPDSTRE CTDLK-GNKH PINSKWQTDN CEACTCYET-EIIC CCTL	52
rhesus	SCSFIPNERFPDSTRE CTDLK-GNKH PINSKWKTDN CERCTCYKT-EIIC CCTL	52
tamarin-e1	SCYLMPNKMVPGDSTKE CTDLK-GNKH PLNSRWKTEC CDECDCLEK-EISCC SL	52
tamarin-j1	SCYIILNDMIPGDSTNE CTDLK-GNKH PINSKWRTDN CDSCTCREK-EISCC TL	52
tamarin-a1	SCYVIRHKIVPGETIKE CTDLK-GNKH PLDSRWRTED CELCACRDI-EISCC SL	52
pig	QCYFIPNQSLK--- PNECQDLK-GVSH PLNSVWKT KDCEECTCGQN-AISCC NT	49
rat	ACSIQRLKRLPNEK SDECTBVD-GGKH VLNITYWQ-KNCEW CFCEKT-AITC CTK	51
mouse	VCSIENREIFPNQMSDD CMDAD-GNKH FLNTP WK-KNCTW SCD KT-SITC CTL	51
ostrich	YCFQKINRPGESDESDED CILD-GKLY PFGEI SRTENCYRCS SRD-AMR CC TL	52
chicken	FCFSKLFKPGEA EKG---CMLD-GVLY PFGEI PRTENCFRCS SKN-EMH CC SL	49
xenopus	FCFT---ELPKMGQTE GCLYK-DKLH R LGSKFRTNDCMDCT CHMDG KMACC QA	49
flounder-1	DCFQ---ILTKPGM THCQDHDDGTW HEVGSSWRNSR CYDCSCEG ---- CCAA	41
flounder-2	DCFQ---ILTKPGM THCQDHDDGTW HEVGSSWRNSR CYDCSCEG ---- CCAA	45
zebrafish	YCF---K LQKEGAKYCE GD DQTRHEL G STWINSKCL RL CI CS ST-EME CCDT	49
CONSENSUS	. C c.d.g.h w C.C.C CC ..	

man	VST--PVG YDKDN C QRI F KKED - CKYI V VEKK K DEKKT CSVS--EW II -----	94
baboon	IAT--PVG YDKNK C QRI F KKEE - CKYI V VEKK N PKKT CPID--QW IL -----	94
rhesus	IAT--PVG YDKKK C QRI F KKED - CKYI V VEKK N PKKT CPID--QW IL -----	94
tamarin-e1	VAI--PVG YDQDN C QKI F KQED - CKYI V VEKK D PNKT CEVT--QW I -----	93
tamarin-j1	VST--PVG YDTHK C QKI F NKED - CRIS V VEKND PS KTCEVN --AW IM -----	94
tamarin-a1	VST--PVG YDRHN CR KI F NKET - CKIS V VEKTD PNR PGVS --GW IS -----	94
pig	AAI--PTG YDTNK C QKI L NKKT - CTYT V VEKK D PGKT CDVT--GW VL -----	91
rat	TLI--PVS YDKKR C QRQ F HSN - CTYS V VERT NP GKTCPVN --GW TI -----	93
mouse	ATR--PLS YDKDN C DVQ F HPEN - CTYS V DRKN PG KT CRVD--SW TM -----	93
ostrich	FHT--PVG YNKEK C KVV F NKET - CNND V VQKDD PS KECFVS --YR V -----	93
chicken	YHT--PV NYDKET V KVI F NKLN C DYEV V QK-HPS K PCSGY --AR V -----	90
xenopus	YAT--PVE YDKEK C IAV F NRKA - CHYR V VEKRN RS KECEVL --AM VG -----	91
flounder-1	FS---TPK RIPAE C VSV FD-S NEC V YRV F KDD PT VLC PIL--AA VGK -----	87
flounder2	FQPL NVSR L NVCQ CS TQMN V CTECSR RM TRO Y CVQ FW LQ LAS DAVIG PG GIGK	98
zebrafish	MG---RA IKTEG CT VKYD -Y STCK F DV F HPED PN IKCEY G--AV GK -----	90
CONSENSUS p.yd C ... f C ... vv.k.p.k C	



plete *Drosophila* genome. Many of the retrieved sequences showed partial alignment of half-cystines and little else. Most often, the aligned half-cystines belong to domains of proteins far larger than most MSPs. This could indicate that this protein, and hence its function, appeared following divergence of vertebrates from invertebrates. On the other hand, it is possible that current algorithms cannot find related sequences in too distant species, leaving open the possibility that MSP-like proteins might be present in insects too.

Inasmuch as expression and/or abundance of mRNAs cannot be taken as conclusive evidence that a protein is present in a given tissue (for example, see Anderson and Seilhamer 1997), the presence of MSP in reproductive and nonreproductive tissues can conclusively be established only through its purification or by immunocytochemistry. Where these criteria have been met, MSP is generally associated with secretory cells, of both endocrine and exocrine types. As mentioned in the Introduction, MSP has been found in E-cells of the gastric mucosa (Ulvsbäck et al. 1989). Our identification of this protein in ostrich pituitary extracts further supports this association. Furthermore, MSP is found in significant amounts in chicken serum (0.06 g/L; Warr 1990). Thus, birds may possess an active endocrine pathway of MSP secretion into plasma. The pituitary may be one of the secreting endocrine organs. Indeed, using primers corresponding to the reported chicken MSP cDNA, we have been able to detect its mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in total RNA from the brain of this bird (M. Mbikay and C. Lazure, unpubl.).

In mammals, MSP appears to be most abundant in seminal plasma (in humans, its concentration in this fluid is as high as 0.9 to 2.2 g/L). It is also elevated in numerous other body fluids, especially in nasal (0.009 to 0.011 g/L) and tracheal (0.013 to 1.4 g/L) secretions (Weiber et al. 1990).

It is detectable in the plasma of asymptomatic men at a concentration of ~0.02 mg/L and at a slightly elevated level in patients with prostate cancer (0.12 mg/L; Dubé et al. 1987b). Its serum level, however, is of no diagnostic or prognostic value for this type of cancer (Von der Kammer et al. 1993). The biological function of MSP remains unknown. Whatever that function is, it is uncertain that it is the same among species. In this context, it would prove interesting and possibly revealing to examine the cellular and tissular distribution of MSP in birds and in other distant species such as amphibians and fish. Some preliminary immunofluorescence data with the chicken MSP tend to favor its relation with bursa and thymus cells (Warr 1990).

Structural studies on MSP are scarce. Disulfide pairing in all of them has not been determined. Their sequences bear no significant resemblance to proteins of known function. These facts make it difficult to even speculate about their biological functions. Indeed, the only structural data known so far have indicated that the secondary structure of chicken MSP shows negligible α -helicity but elevated β -sheet (68%) content. This property is also shown by β_2 -microglobulin, which is antigenically cross-reactive with MSPs (Warr 1990). A high β -sheet content is observed in the epithelin/granulin protein family, another class of small proteins with a high number of half-cystines (for review, see Bateman and Bennett 1998). In the latter case, the overall structure is composed of four stacked β -sheet structures that are highly stabilized by a central axial rod of disulfide bridges. On the other hand, there is no a priori reason to consider the relationship of MSPs to epithelin/granulin to be stronger than possible relationships to other classes of small proteins highly rich in half-cystines, such as the defensin family of endogenous antibiotic peptides (for review, see Lehrer et al. 1991) or the disintegrin family of integrin inhibitory peptides from snake venoms (for review, see McLane et al. 1998). Interestingly, apart from the obvious

Fig. 5. (A) Multiple amino acid sequence alignment of mature β -microseminoproteins. Sequences retrieved from databases were automatically aligned using the CLUSTAL W algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) and the Multalin v5.4.1 software (<http://www.toulouse.inra.fr>). Gaps are indicated with dashes. Residues conserved in 14 of 15 sequences (>90%) are bolded and written in white over a black background; those conserved in >11 of 15 sequences (>70%) are bolded and shaded. Continuous stretches of five residues or more that are highly conserved among members of the same order (e.g., primates, rodents, aves, and fish) are boxed. The β -microseminoprotein amino acid sequences were either obtained from previously reported sequences—human (*Homo sapiens*; accession No. AJ13356; Mbikay et al. 1987), rhesus monkey (*Macacca mulatta*; accession No. M92161; Nolet et al. 1991), baboon (*Papio hamadryas anubis*; accession No. U49786; Xuan et al. 1997), cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*; accession Nos. mspE1, AJ010154; mspA1, AJ010158; and mspJ1, AJ010156; Mäkinen et al. 1999), porcine (*Sus scrofa*; accession No. S41663; Fernlund et al. 1994; Tanaka et al. 1995), rat (*Rattus norvegicus*; accession No. U65486; Fernlund et al. 1996), murine (*Mus musculus*; accession No. J89840; Xuan et al. 1999), ostrich (*Struthio camelus*; this study), and chicken (*Gallus gallus*; Warr 1990)—or back-translated from the reported cDNA sequences in the nonmouse and nonhuman expressed sequence tag entries maintained at the NCBI: chicken (accession Nos. AI97928 and AW198358), African clawed frog (*Xenopus laevis*; accession No. AW641318), zebrafish (*Danio rerio*; accession No. AI497271), and the two Japanese flounder sequences (*Paralichthys olivaceus*; accession Nos. C23089 and C23023). The bovine (*Bos taurus*; accession No. AW336761) was not included in the alignment because its full sequence has not been reported. (B) The phylogenetic tree of β -microseminoproteins. Based on the alignment shown in A, the phylogenetic tree analysis was conducted using neighbor-joining analysis (Poisson correction) with the MEGA v2.0 software (<http://www.megasoftware.net>). The confidence values obtained using a bootstrapping statistical analysis method are indicated on nodes; values of $\geq 95\%$ are considered statistically significant. The scale bar indicates the d value, which represents the number of amino acid substitutions per site.

presence of an elevated content in half-cystine residues, all of these three classes of peptides possess biological activities proposed at one time or another for MSP (see Table 1). Together with the present demonstration of MSP-related molecules in distant species, these relationships, as tenuous as they are, might eventually lead finally to a clear definition of the biological activity of MSP >20 years after its initial discovery.

Materials and methods

Purification of MSP from ostrich pituitaries

The protein was obtained following extraction of 1060 g of adenohypophyses using the classical acid-acetone extraction procedure previously described (Naudé and Oelofsen 1977). Briefly, the resulting powder was submitted to NaCl-fractionation, and the corticotropin-containing fraction D was recovered and further purified through chromatography on a carboxymethyl-cellulose column using an ammonium acetate gradient for elution. The resulting fraction 6 (see Fig. 1 in Naudé and Oelofsen 1977) was purified on a Sephadex G-100 column, and the last eluting fraction 6D was collected. The pooled fraction 6D was further purified by RP-HPLC and eluted using a *n*-propanol gradient. Fraction 6D-2, eluting between 15% and 20%, *n*-propanol was collected, lyophilized, and kept at -20°C . Earlier protein characterization studies were performed using this fraction as starting material.

Chemical modifications and CNBr cleavage

The dried RP-HPLC fraction was dissolved in 0.4 M Tris-HCl buffer (pH 8.4) containing 8 M urea and 1 mM EDTA. The protein was reduced and alkylated using a two-step procedure: it was first incubated for 30 min in the presence of 0.1 mM DTT before treatment with iodo-[$1-^{14}\text{C}$]-acetamide (5 μCi , 59 mCi/mmol; Amersham Pharmacia Biotech), and it was then fully reduced and alkylated using a 5 \times excess of unlabelled iodoacetamide over DTT. The reduced and alkylated protein was desalted using a PD-10 column (Biorad) using 0.1 M ammonium bicarbonate as eluent; the resulting labeled fraction was dried and kept at -20°C until used. Cleavage of 100 μg of the reduced and carboxamidated protein with CNBr was conducted in 70% acetic acid overnight at room temperature in the dark; the resulting fragments were purified by RP-HPLC as described below.

Enzymatic digestion

The reduced and carboxamidated protein (100 μg) was dissolved in 100 μL of 0.1 M ammonium bicarbonate, and 1 μg of endoproteinase Asp-N (Roche Diagnostics) was added. Incubation was overnight at 37°C , and the resulting fragments were purified by RP-HPLC as described below. Digestion of the C-terminal peptide by Arg-C protease (Roche Diagnostics) was accomplished using 0.5 μg of enzyme, reconstituted according to the manufacturer's protocol in 100 μL of 100 mM Tris-HCl containing 10 mM CaCl_2 (pH 7.6) overnight at 37°C . Digestion of the native ostrich MSP (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was performed with trypsin (Miles-Seravac) using a 1:50 (w/w) ratio in 0.1 M pyridine-acetate buffer (pH 6.5) for 24 h at 37°C . All enzymatic reactions were stopped by acidification using 0.1% CF_3COOH .

Peptide separation by RP-HPLC

Peptides resulting from the fragmentation mixtures were separated and purified using a $\mu\text{RPC C2/C18}$ narrow-bore column (SC 2.1/10; Amersham Pharmacia Biotech) maintained at 30°C . They were eluted using a 0.1% (v/v) TFA-acetonitrile system with linear gradient of either 0 to 100% acetonitrile in 35 min or 10% to 45% acetonitrile in 35 min at a flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. The eluting peaks were monitored through ultraviolet-absorbance at 225 nm and collected manually in 100- μL fractions, and radioactivity in each fraction was measured using a scintillation counter. All separations on HPLC were performed on an Applied Biosystems model 120A. A modification to the original configuration included addition of a manual rotating valve, allowing collection of the eluate immediately after the detector flow cell through a narrow bore PEEK tubing long enough to prevent degassing.

Isolation of the disulfide-linked peptides was accomplished on a CSC-Exsil A300 C_{18} column (25 \times 0.46 cm; Chromatography Sciences Co.). The buffer system consisted of an aqueous 0.1% (v/v) CF_3COOH solution and an organic phase of acetonitrile containing 0.1% (v/v) CF_3COOH . Elution was performed with a linear gradient from 0% to 60% organic phase in 60 min following a 5-min isocratic step at 0% at a flow rate of 1.0 mL/min. The eluate was monitored at 225 nm, and 500 μL fractions were collected. A Varian 9010 HPLC connected to a Varian 9050 ultraviolet-detector was used. Aliquots of each fraction were screened by MALDI-TOF as described below. Selected fractions were reduced and alkylated as described above before mass analysis.

Edman degradation, amino acid, and mass spectrometry analysis

Automated Edman degradation of the native RP-HPLC purified protein was performed as described previously (Lazure et al. 1989) using a gas phase sequencer from Applied Biosystems (model 470A). The resulting phenylthiohydantoin (PTH) amino acids were analyzed directly on an Applied Biosystems (model 120A) PTH-analyser. Automated Edman degradation of the reduced and carboxamidated protein and fragments thereof was performed using an Applied Biosystems (model 477A) sequencer operated in gas phase mode using *N*-methylpiperidine as coupling buffer and directly linked to the PTH-analyser.

Amino acid analyses were performed in duplicate after hydrolysis of dried samples in 5.7 N HCl in vacuo for 18 to 24 h at 110°C on a Beckman autoanalyser (model 6300) with a postcolumn ninhydrin detection system and coupled to a Varian DS604 integrator/plotter.

MALDI-TOF analysis of RP-HPLC-purified fractions was performed on a Voyager DE-Pro MALDI-TOF instrument (PerSeptive Biosystems) equipped with a 337-nm nitrogen laser and a delayed-extraction ion source. Positively charged ions were analyzed in linear, reflector, and PSD mode. Spectra were obtained as the sums of ions recovered after 64 to 128 laser shots using an acceleration voltage of 20 kV. In PSD mode, spectra were obtained using ion reflector mirror ratio from 1.0 to 0.3 in decreasing steps, as recommended by the manufacturer. The matrix solution was freshly prepared using a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA; Sigma-Aldrich) in 50% (v/v) acetonitrile containing 0.3% TFA and was mixed in a 1:1 ratio with samples in 0.1% TFA. For ladder sequencing, 0.3 μL peptide solution (1 pmole/ μL in 0.1% TFA) was mixed with an equal volume of freshly prepared carboxypeptidase-P or -Y (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in 50 mM sodium citrate buffer at pH 6.0; Roche Diagnostics) and incubated at room temperature in a humid chamber for varying amounts of

time (from 3 to 60 sec). At the end of incubation, 0.6 μ L of freshly prepared matrix solution was added and cocrystallisation left to occur at ambient temperature. For determination of disulfide bridges, peptides, following reduction and alkylation, were deposited on the MALDI-TOF plate using C₁₈ ZipTip (Waters Corporation) prewetted with 2 \times 10 μ L 50% acetonitrile in water and equilibrated with 2 \times 10 μ L 0.1% CF₃COOH. After aspiration of the sample, bound peptides were eluted using 10 μ L of HCCA solution (10 mg/mL in 50% acetonitrile), and 2 μ L were spotted directly on the sample plate.

Sequence analysis

Amino acid sequences and/or nucleotide sequences were analysed using the Genetic Computer Group computer program package. Automated searches in the various databases were performed through the entrez search and retrieval system available at the NCBI site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the various BLAST algorithms operating in batch mode. Sequence alignment was accomplished using the Multalin v5.4.1 software (<http://www.toulouse.inra.fr; Corpet 1988>). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA (Kumar et al. 1994) version 2.0 (S. Kumar, K. Tamura, I.B. Jakobsen, and M. Nei, in prep.) down-loaded from the MEGA site (<http://www.megasoftware.net>). Peptide mass analyses were performed using the computer programs maintained at the University of California-San Francisco site (<http://www.donatello.ucsf.edu>).

The sequence data have been deposited with the Protein Identification Resource (accession No. A59385; National Biomedical Research Foundation, Georgetown University Medical Center, Washington, DC).

Acknowledgments

We thank Dr. Bernard F. Gibbs (MDS-Pharma) for MS/MS mass spectrometry data. We also thank Dr. S. Blair Hedges (Pennsylvania State University) for helpful comments and suggestions concerning species evolution. This work was initially supported by a program grant (PG-2) from the Medical Research Council of Canada and more recently by research grants (MT-14766) from the Medical Research Council of Canada, the South African National Research Foundation, and the University of Port Elizabeth. The authors also acknowledge the Protein Engineering Center of Excellence (PENCE) and the Ottawa Health Research Institute for providing funds to purchase the MALDI-TOF instrument.

The publication costs of this article were defrayed in part by payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734 solely to indicate this fact.

References

- Abrahamsson, P.A., Lilja, H., Falkmer, S., and Wodström, L.B. 1988. Immunohistochemical distribution of the three predominant secretory proteins in the parenchyma of hyperplastic and neoplastic prostate glands. *Prostate* 12: 39-46.
- Anderson, L. and Seilhamer, J. 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18: 533-537.
- Baijal-Gupta, M., Clarke, M.W., Finkelman, M.A., McLachlin, C.M., and Han, V.K.M. 2000. Prostatic secretory protein (PSP₉₄) expression in human female reproductive tissues, breast and in endometrial cancer cell lines. *J. Endocrinol.* 165: 425-433.
- Bateman, A. and Bennett, H.P.J. 1998. Granulins: The structure and function of an emerging family of growth factors. *J. Endocrinol.* 158: 145-151.
- Brooks, D.E., Means, A.R., Wright, E.J., Singh, S.P., and Tiver, K.K. 1986. Molecular cloning of the cDNA for two major androgen-dependent secretory proteins of 18.5 kDa synthesized by the rat epididymis. *J. Biol. Chem.* 261: 4956-4961.
- Chao, C.F., Chiou, S.T., Jeng, H., and Chang, W.C. 1996. The porcine sperm motility inhibitor is identical to β -microseminoprotein and is a competitive inhibitor of Na⁺, K⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218: 623-628.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16: 10881-10890.
- Doctor, V.M., Sheth, A.R., Sinha, M.M., Arbatti, N.J., Aaveri, J.P., and Sheth N.A. 1986. Studies on immunocytochemical localization of inhibin-like material in the human prostatic tissue: Comparison of its distribution in normal, benign and malignant prostates. *Br. J. Cancer* 53: 547-554.
- Dubé, J.Y., Frenette, G., Paquin, R., Chapdelaine P., Tremblay, J., Tremblay, R.R., Lazure, C., Seidah, N., and Chrétien, M. 1987a. Isolation from human seminal plasma of an abundant 16-kDa protein originating from the prostate, its identification with a 94-residue peptide originally described as β -inhibin. *J. Androl.* 8: 182-189.
- Dubé, J.Y., Pelletier, G., Gagnon, P., and Tremblay, R.R. 1987b. Immunohistochemical localization of a prostatic secretory protein of 94 amino acids in normal prostatic tissue, in primary prostatic tumors and in their metastases. *J. Urol.* 138: 883-887.
- Ferlund, P., Granberg, L., and Roepstorff, P. 1994. Amino acid sequence of β -microseminoprotein from porcine seminal plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 309: 70-76.
- Ferlund, P., Granberg, L., and Larsson, I. 1996. Cloning of β -microseminoprotein of the rat: A rapidly evolving mucosal surface protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 334: 73-82.
- Garde, S.V., Sheth, A., Porter, A.T., and Pienta, K.J. 1993a. A comparative study on expression of prostatic inhibin peptide, prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen in androgen independent human and rat prostate carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 70: 159-166.
- . 1993b. Effect of prostatic inhibin peptide (PIP) on prostate cancer cell growth in vitro and in vivo. *Prostate* 22: 225-233.
- Garde, S.V., Basrur, V.S., Li, L., Finkelman, M.A., Krishan, A., Wellham, L., Ben-Josef, E., Haddad, M., Taylor, J.D., Porter, A.T., and Tang, D.G. 1999. Prostatic secretory protein (PSP₉₄) suppresses the growth of androgen-independent prostate cancer cell line (PC-3) and xenografts by inducing apoptosis. *Prostate* 38: 118-125.
- Gordon, W.L., Liu, W.K., Akiyama, K., Tsuda, R., Hara, M., Schmid, K., and Ward, D.N. 1987. Beta-microseminoprotein (β -MSP) is not an inhibin. *Biol. Reprod.* 36: 829-835.
- Hedges, S.B. 1994. Molecular evidence for the origin of birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 261-264.
- Hedges, S.B. and Poling, L.L. 1999. A molecular phylogeny of reptiles. *Science* 283: 998-1001.
- Kamada, M., Mori, H., Maeda, N., Yamamoto, S., Kunimi, K., Takikawa, M., Maegawa, M., Aono, T., Futaki, S., and Koide, S.S. 1998. β -Microseminoprotein/prostatic secretory protein is a member of immunoglobulin binding factor family. *Biochem. Biophys. Acta* 1388: 101-110.
- Kele, P., Krishnan, A., and Leblanc, R.M. 2000. Decapeptide that can cure prostatic cancer? 26th European Peptide Symposium. *J. Pept. Sci.* 6: S172. Abstract.
- Kohan, S., Fröysa, B., Cederlund, E., Fairwell, T., Lerner, R., Johansson, J., Khan, S., Ritzen, M., Jörnvall, H., Cekan, S., and Diczfalusy, E. 1986. Peptides of postulated inhibin activity: Lack of in vitro inhibin activity of a 94-residue peptide isolated from human seminal plasma and of a synthetic replicate of its C-terminal 28-residue segment. *FEBS Lett.* 199: 242-248.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 1994. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* 10: 189-191.
- Lazure, C., Saayman, H.S., Naudé, R.J., Oelofsen, W., and Chrétien, M. 1987. Complete amino acid sequence of a VLDV-type neurophysin from ostrich differs markedly from known mammalian neurophysins. *Int. J. Pept. Protein Res.* 30: 634-645.
- . 1989. Ostrich MSEL-neurophysin belongs to the class of two-domains "big" neurophysin as indicated by complete amino acid sequence of the neurophysin/copeptin. *Int. J. Pept. Protein Res.* 33: 46-58.
- Lazure, C., Paquet, L., Lithauer, D., Naudé, R.J., Oelofsen, W., and Chrétien, M. 1990. The ostrich pituitary contains a major peptide homologous to mammalian chromogranin-A (1-76). *Peptides* 11: 79-87.
- Lehrer, R.I., Ganz, T., and Selsted, M.E. 1991. Defensins: Endogenous anti-biotic peptides of animal cells. *Cell* 64: 229-230.
- Liang, Z.G., Kamada, M., and Koide, S.S. 1991. Structural identity of immunoglobulin binding factor and prostatic secretory protein of human seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 180: 356-359.
- Lokeshwar, B.L., Hurkadli, K.S., Sheth, A.R., and Block, N.L. 1993. Human

- prostatic inhibin suppresses tumor growth and inhibits clonogenic cell survival of a model prostatic adenocarcinoma, the Dunning R3327G rat tumor. *Cancer Res.* **53**: 4855-4859.
- Mäkinen, M., Valtonen-André, C., and Lundwall, Å. 1999. New World, but not Old World, monkeys carry several genes encoding β -microseminoprotein. *Eur. J. Biochem.* **264**: 407-414.
- Mbikay, M., Nolet, S., Fournier, S., Benjannet, S., Chapdelaine, P., Paradis, G., Dubé, J.Y., Tremblay, R., Lazure, C., Seidah, N.G., and Chrétien, M. 1987. Molecular cloning of the cDNA for a 94-amino acid seminal plasma protein secreted by the human prostate. *DNA* **6**: 23-29.
- Mbikay, M., Linard, C.G., Sirois, F., Lazure, C., Seidah, N.G., and Chrétien, M. 1988. Tissue-specific expression of the prostatic secretory protein PSP₉₄ in cyanomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Cell. Mol. Biol.* **34**: 387-398.
- McLane, M.A., Marcinkiewicz, C., Vijay-Kumar, S., Wierzbicka-Patynowski, I., and Niewiarowski, S. 1998. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **195**: 168-171.
- Mundel, S.D. and Sheth, N.A. 1993. Suppression of DNA synthesis and induction of apoptosis in rat prostate by human seminal plasma inhibin (HSPI). *Cell Biol. Int.* **17**: 587-594.
- Naudé, R.J. and Oelofsen, W. 1977. The isolation and characterization of corticotropin from the pituitary gland of the ostrich *Struthio camelus*. *Biochem. J.* **165**: 519-523.
- Naudé, R.J., Litthauer, D., Oelofsen, W., Chrétien, M., and Lazure, C. 1993. The production of the ostrich NH₂-terminal POMC fragment requires cleavage at a unique signal peptidase site. *Peptides* **14**: 519-529.
- Nolet, S., St-Louis, D., Mbikay, M., and Chrétien, M. 1991. Rapid evolution of prostatic protein PSP₉₄ suggested by sequence divergence between rhesus monkey and human cDNAs. *Genomics* **9**: 775-777.
- Sasaki, T., Matsumoto, N., Jinno, Y., Niikawa, N., Sakai, H., Kanetake, H., and Saito, Y. 1996. Assignment of the human beta-microseminoprotein gene (MSMB) to chromosome 10q11.2. *Cytogenet. Cell Genet.* **72**: 177-178.
- Tanaka, T., Itahana, K., Andoh, N., Takeya, T., and Sato, E. 1995. Expression of prostatic secretory protein (PSP)-like protein in porcine corpus luteum: Isolation and characterization of a new gene encoding PSP₉₄-like protein. *Mol. Reprod. Dev.* **42**: 149-156.
- Thakur, A.N., Vaze, A.Y., Dattatreyaunthy, B., and Sheth, A.R. 1981. Isolation and characterization of inhibin from human seminal plasma. *Indian J. Exp. Biol.* **19**: 307-313.
- Tirunagaru, V.G., Sofer, L., Cui, J., and Burnside, J. 2000. An expressed sequence tag database of T-cell-enriched activated chicken splenocytes: Sequence analysis of 5251 clones. *Genomics* **66**: 144-151.
- Tsuda, R., Inoue, T., and Hara M. 1982. A seminal plasma specific antigen of prostate gland: Forensic immunological studies of body fluids and secretion. *Jpn. J. Legal Med.* **36**: 703-709.
- Ulvsbäck, M., Lindström, C., Weiber, H., Abrahamsson, P.A., Lilja H., and Lundwall, Å. 1989. Molecular cloning of a small prostate protein, known as β -microseminoprotein, PSP₉₄ or β -inhibin, and demonstration of transcripts in non-genital tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **164**: 1310-1315.
- Ulvsbäck, M., Spurr, N.K., and Lundwall, Å. 1991. Assignment of the human gene for β -microseminoprotein (MSMB) to chromosome 10 and demonstration of related genes in other vertebrates. *Genomics* **11**: 920-924.
- Von der Kammer, H., Jurincic-Winkler, C., Horlbeck, R., Klippel, K.F., Pixberg, H.U., and Scheit, K.H. 1993. The potential use of prostatic secretory protein of 94 amino acids (PSP₉₄) as a serum marker for prostatic tumor. *Urol. Res.* **21**: 227-233.
- Warr, G.W. 1990. A 12 kDa protein in chicken serum antigenically cross-reactive with, but unrelated to, beta₂-microglobulin. *Dev. Comp. Immunol.* **14**: 247-253.
- Weiber, H., Andersson, C., Murne, A., Rannevik, G., Lindström, C., Lilja, H., and Fernlund, P. 1990. β -Microseminoprotein is not a prostate-specific protein: Its identification in mucous glands and secretions. *Am. J. Pathol.* **137**: 593-603.
- Weiber, H., Borch, K., Sundler, F., and Fernlund, P. 1999. Beta-microseminoprotein in gastric carcinoids: A marker of tumour progression. *Digestion* **60**: 440-448.
- Xuan, J.W., Chin, J.L., Guo, Y., Chambers, A.F., Finkelman, M.A., and Clarke M.W. 1995. Alternative splicing of PSP₉₄ (prostatic secretory protein of 94 amino acids) mRNA in prostate tissue. *Oncogene* **11**: 1041-1047.
- Xuan, J.W., Wu, D., Guo, Y., Garde, S., Shum, D.T., Mbikay, M., Zhong, R., and Chin, J.L. 1997. Molecular cloning and gene expression analysis of PSP₉₄ (prostatic secretory protein of 94 amino acids) in primates. *DNA Cell Biol.* **16**: 627-638.
- Xuan, J.W., Kwong, J., Chan, F.L., Ricci, M., Imasato, Y., Sakai, H., Fong, G.H., Panchal, C., and Chin, J.L. 1999. cDNA, genomic cloning and gene expression analysis of mouse PSP94 (prostatic secretory protein of 94 amino acids). *DNA Cell Biol.* **18**: 11-26.
- Yang, J.P., Baijal-Gupta, M., Garde, S.V., Fraser, J.E., Finkelman, M.A., and Clarke, M.W. 1998a. Identification of binding proteins for PSP₉₄ in human prostate adenocarcinoma cell lines LNCaP and PC-3. *Prostate* **35**: 11-17.
- Yang, J.P., Finkelman, M.A., and Clarke, M.W. 1998b. Detection of PSP₉₄ and its specific binding sites in the prostate adenocarcinoma cell line LNCaP. *J. Urol.* **160**: 2240-2244.