

2M11.2644.4

Université de Montréal

Caractérisation et expression d'une nouvelle glycoprotéine humaine : GP56

par
Richard Gingras
Département de Biochimie
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 Biochimie

décembre, 1997

©Richard Gingras, 1997



2411-2044-4

W
4
U58
1998
V.097

(Université de Montréal)

Caractérisation et expression d'une nouvelle glycoprotéine humaine

par
Richard Gingras
Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences (M.Sc.)
en Biochimie

décembre 1997

Richard Gingras 1997



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation et expression d'une nouvelle glycoprotéine humaine : GP56

présenté par :
Richard Gingras

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

*Le Jean Moras
Michel Potier
Alexey I. Shevchetsky
Louis Rokeach*

Mémoire accepté le : 19. 08. 1998

SOMMAIRE

GP56 est une nouvelle glycoprotéine humaine de 56 kDa qui est co-purifiée avec la cathepsine A à partir de placenta humain par affinité à un gel d'agarose couplé au dipeptide Phe-Leu. L'analyse de la séquence N-terminale en acides aminés de GP56 à l'aide des programmes informatiques disponibles n'a révélée aucune homologie avec une protéine connue. Cette séquence en acides aminés a été utilisée pour chercher le cDNA correspondant dans la banque de séquences exprimées anonymes (ESTs). Ce cDNA homologue à 100% à la séquence de GP56 a été obtenu de l'Université de Washington via le consortium I.M.A.G.E.

Ce travail présente la caractérisation de GP56 dans le but d'identifier sa fonction biologique. Afin d'y parvenir, différentes études ont été réalisées au niveau de l'ARNm, mais surtout au niveau protéique. Parmi ces études, notons la localisation intracellulaire, la distribution tissulaire, la maturation qui ont été faites à l'aide d'anticorps produits contre GP56. La séquence de GP56 a aussi été clonée dans un vecteur d'expression eucaryotique.

La séquence de GP56 a également été comparée aux séquences de protéines disponibles dans la banque de données GenBank. Trois enzymes sont homologues à GP56 : une leucine-aminopeptidase provenant de *Aeromonas proteolytica*, une glutamate-carboxypeptidase G2 provenant de *Pseudomonas sp.* et une histidine-dipeptidase issue de *Lactobacillus delbrueckii lactis*.

L'alignement de séquences montre que les acides aminés communs entre GP56 et les autres protéines sont impliqués dans la liaison d'atomes de zinc nécessaires à leur activité enzymatique. De plus, l'acide aminé du site actif impliqué dans l'hydrolyse du substrat de l'aminopeptidase (Glu 151) et de la carboxypeptidase (Glu 175) sont présents chez GP56. Des dosages enzymatiques ont été effectués pour confirmer une activité chez GP56. Malgré que les tests aient été négatifs pour les activités aminopeptidasique et carboxypeptidasique, une activité endopeptidasique de type calpaïne contre le substrat artificiel Suc-Leu-Tyr-AMC a été observée dans des homogénats et les milieux de culture de cellules COS transfectées avec le vecteur d'expression eucaryotique pCMV-GP56.

Dans ce travail, nous présentons la caractérisation d'une nouvelle endopeptidase humaine d'une masse moléculaire de 56 kDa et de fonctions biologiques inconnues. Nos études sur le placenta et les fibroblastes cutanés en culture indiquent qu'il s'agit d'une protéine sécrétée.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations et symboles.....	x
Code des acides aminés.....	xii
1.0 INTRODUCTION.....	1
1.1 La découverte de GP56.....	2
1.2 La génomique fonctionnelle.....	5
1.3 Buts poursuivis.....	8
2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	11
2.1 MATÉRIEL.....	12
2.2 MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	14
2.2.1 Purification de GP56 à partir de placenta humain.....	14
2.2.2 Électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide et immunobuvardage.....	15
2.2.3 Détermination de la séquence N-terminale de GP56.....	19
2.2.4 Obtention de l'ADN complémentaire de GP56.....	19
2.2.5 Préparation de la protéine de fusion GP56-GST.....	20
2.2.6 Production d'anticorps polyclonaux anti-GP56.....	22
2.2.7 Dosage enzymatique de la cathepsine A.....	23
2.2.8 Dosage enzymatique de la cathepsine D.....	23
2.2.9 Déglycosylation des glycoprotéines.....	24
2.2.10 Localisation intracellulaire de GP56 par immunocytofluorescence.....	24
2.2.11 Localisation intracellulaire de GP56 par microscopie électronique.....	26
2.2.12 Clonage et correction de la séquence de GP56.....	27
2.2.13 Purification du plasmide pCMV-GP56.....	32

2.2.14	Expression de pCMV-GP56 dans les cellules eucaryotes....	33
2.2.15	Dosage enzymatique de la β -galactosidase.....	34
2.2.16	Marquage métabolique et immunoprécipitation de GP56....	35
2.2.17	Isolement et détection de l'ARNm de GP56.....	36
2.2.18	Préparation de la colonne d'immunoaffinité.....	39
2.2.19	Purification de GP56.....	40
2.2.20	Dosages enzymatiques d'aminopeptidases et d'endopeptidases.....	41
3.0	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	44
3.1	Purification de GP56 par la colonne d'affinité d'agarose-Phe-Leu.....	45
3.2	Séquence de GP56.....	54
3.3	Détection de l'ARNm de GP56.....	59
3.4	Production d'anticorps anti-GP56.....	59
3.5	Expression de pCMV-GP56 dans les cellules COS.....	64
3.6	Marquage métabolique de GP56 (pulse-chase).....	65
3.7	Localisation intracellulaire de GP56.....	72
3.8	Distribution tissulaire de GP56.....	77
3.9	Déglycosylation de GP56.....	82
3.10	Purification de GP56 par immunoaffinité à partir du plasma.....	85
3.11	Alignement de séquences entre GP56 et différents enzymes.....	88
3.12	Dosages enzymatiques de GP56.....	89
4.0	CONCLUSIONS.....	103
5.0	BIBLIOGRAPHIE.....	109
	Remerciements.....	xiii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Composition des gels de SDS-polyacrylamide.....	17
Tableau II	Substrats utilisés pour le dosage enzymatique de GP56 dans les cellules COS transfectées avec pCMV-GP56.....	42

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Clonage et correction de la séquence de GP56.....	30
Figure 2	Profil d'élution des produits des fractions appliquées sur la colonne échangeuse d'anions Mono Q.....	46
Figure 3	Analyse en gel de SDS-polyacrylamide des produits élués de la colonne Mono Q.....	48
Figure 4	Profil d'élution des produits des fractions 2-5 appliquées sur la colonne Superose 12 en FPLC.....	50
Figure 5	Analyse des fractions éluées de la colonne Superose 12 en FPLC..	52
Figure 6	Séquence de GP56.....	56
Figure 7	Détection de l'ARNm de GP56.....	60
Figure 8	Purification de la protéine de fusion GP56-GST.....	62
Figure 9	Expression du vecteur pCMV-GP56 dans des cellules eucaryotes..	66
Figure 10	Analyse des milieux de culture des cellules COS transfectées avec pCMV-GP56.....	68
Figure 11	Etude de la maturation de GP56.....	70
Figure 12	Localisation intracellulaire de GP56 par immunocytofluorescence.	73
Figure 13	Localisation intracellulaire de GP56 par microscopie électronique.	75
Figure 14	Distribution tissulaire de GP56.....	78
Figure 15	Distribution de GP56 dans le sang.....	80
Figure 16	Déglycosylation de GP56.....	83

Figure 17	Purification de GP56 à partir de plasma.....	86
Figure 18	Alignement de séquences entre GP56 et autres protéines.....	91
Figure 19	Site catalytique de l'aminopeptidase <i>Aeromonas proteolytica</i>	95
Figure 20	Site catalytique de la carboxypeptidase G2 de <i>Pseudomonas sp.</i>	97
Figure 21	Dosages enzymatiques d'extraits d'homogénats de placenta de souris, de placenta humain et de plasma humain.....	99
Figure 22	Dosages enzymatiques d'homogénats et de milieux de culture des cellules COS transfectées avec pCMV-GP56.....	101

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

β-gal :	β-galactosidase
A :	Adénine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMC :	7-amino-4-méthylcoumarin
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
BS :	vecteur Bluescript
BSA :	Albumine de sérum de bovin
C :	Cytosine
cAMP :	Adénosine monophosphate cyclique
CAPS :	Acide sulfonique cyclohexylaminopropane
CBZ :	Carbobenzoxy
cDNA :	ADN complémentaire
cGMP :	Guanosine monophosphate cyclique
CIAP :	Phosphatase alcaline intestinale de veau
con A :	Gel de concanavaline A
COS :	Cellules de reins de singes verts d'Afrique
cpm :	compte par minute
D.O. :	Densité optique
dCTP :	2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate
DMSO :	Diméthyl sulfoxyde
DOC :	Acide desoxycholate
DTT :	Dithiotréitol
EDTA :	Éthylène diamine tétracétate de disodium
EMBL :	Laboratoire de Biologie Moléculaire Européen
ESTs :	Expressed Séquences Tags (séquences exprimées anonymes)
FPLC :	Chromatographie liquide à performance rapide
G :	Guanine
GP56 :	Glycoprotéine de 56 kDa
GSDB :	Banque de Données de Séquences du Génome
GST :	Glutathione-S-transférase
IgG :	Immunoglobulines de type G
I.M.A.G.E. :	Integrated Molecular Analysis of Genome Expression
I.P.30 :	γ-interféron induced protein de 30 kDa
IPTG :	Isopropylthiogalactoside
kb :	Kilobases
kDa :	KiloDalton
LB :	Milieu de culture de bactéries Luria-Bertani
Mb :	Mégabases

MDa :	MégaDalton
MEM :	Milieu essentiel minimum
min :	minute
MOPS :	Acide sulfonique-3-[N-morpholino]propane
Mr :	Marqueurs de masses moléculaires
MUFGAL :	4-méthylumbelliféryl- β -D-galactopyranoside
NCBI :	Centre National d'Information en Biotechnologie
nm :	Nanomètre
NP-40 :	Nonidet P-40
PATGAL :	p-aminophényl- β -D-thiogalactopyranoside
pb :	Paires de bases
PBS :	Solution saline tamponnée avec du phosphate
PCR :	Réactions en chaîne à la polymérase
PEG :	Polyéthylène glycol
PenStrep :	Pénicilline-streptomycine
PMSF :	Phénylméthylsulfonyl fluoride
pNA :	p-naphtylamide
pNPH :	p-nitrophényl
PVDF :	Polyvinylidène difluoride
RACE/PCR :	Amplification rapide des extrémités d'ADNc par PCR
RB :	Tampon d'électrophorèse pour northern blot
RIPA :	Tampon de radioimmunoprécipitation
SDS :	Dodécylsulfate de sodium
SFV :	Sérum foetal de veau
SSC :	Chlorure de sodium, citrate de sodium
ssDNA :	ADN de sperme de saumon
SSPE :	Sodium, phosphate de sodium, EDTA
STE :	Chlorure de sodium, Tris, EDTA
Suc :	Succinyl
SV40 :	Simian virus 40
T :	Thymine
TAE :	Tris, acétate, EDTA
TBE :	Tris, acétate, EDTA
TBS :	solution saline tamponnée avec du Tris
TE :	Tris, EDTA

CODE DES ACIDES AMINÉS

Nom	Code à trois lettres	Code à une lettre
alanine	Ala	A
arginine	Arg	R
asparagine	Asn	N
acide aspartique	Asp	D
cystéine	Cys	C
glutamine	Gln	Q
acide glutamique	Glu	E
glycine	Gly	G
histidine	His	H
isoleucine	Ile	I
leucine	Leu	L
lysine	Lys	K
méthionine	Met	M
phénylalanine	Phe	F
proline	Pro	P
sérine	Ser	S
thréonine	Thr	T
tryptophane	Trp	W
tyrosine	Tyr	Y
valine	Val	V

1.0 INTRODUCTION

1.1 La découverte de GP56.

La galactosialidose est une maladie de surcharge métabolique lysosomiale causée par la déficience d'une protéine lysosomiale appelée cathepsine A (d'Azzo *et al.* 1982). Cette déficience en cathepsine A cause une déficience secondaire de deux autres enzymes lysosomiaux, la sialidase (ou neuraminidase) et la β -galactosidase qui lui sont associées. Dans les lysosomes, la sialidase et la β -galactosidase nécessitent la présence de la cathepsine A qui agit comme une protéine protectrice pour la formation d'un complexe de 1.27 MDa (Pshezhetsky *et al.* 1995). La formation de ce complexe est nécessaire à l'expression de l'activité sialidasique (van der Horst *et al.* 1989). L'absence d'activité de ces deux enzymes provoque une accumulation d'oligosaccharides et de gangliosides au niveau des lysosomes dans plusieurs des tissus et une excrétion urinaire augmentée de ces substances. Cliniquement, cette maladie se manifeste par une hypertonie, des taches maculaires rouge cerise bilatérales et des crises myocloniques et une absence de retard mental (Wenger *et al.* 1978).

La cathepsine A est synthétisée sous forme d'un précurseur de 54 kDa qui devient une protéine hétérodimérique contenant deux sous-unités de 30 et 20 kDa liées par des ponts disulfures (Potier *et al.* 1990). Dans les cellules, environ 20% de la cathepsine A totale est dans le complexe alors que 80% est sous forme libre (D'Agrosa *et al.* 1992).

En plus d'agir comme protéine protectrice à l'intérieur des lysosomes, elle possède une activité carboxypeptidasique propre à elle-même et dont la fonction physiologique est largement inconnue. Elle possède cependant la capacité de dégrader plusieurs hormones peptidiques *in vitro* telle que les tachykinines et la substance P (Jackman *et al.* 1990), l'angiotensine I (Miller *et al.* 1988) et l'angiotensine II (Grynbaum et Marks 1976).

L'absence du complexe formé de la cathepsine A, la sialidase, la β -galactosidase et d'autres enzymes comme la N-acétylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (Pshezhetsky et Potier, 1996) ne semble pas due à une absence de la cathepsine A, mais plutôt à un manque d'interactions entre la carboxypeptidase et les deux autres enzymes car l'activité enzymatique de la protéine protectrice est toujours présente dans les cellules atteintes de la galactosialidose selon les groupes de Zhou *et al.* (1991) et Shimmoto *et al.* (1993).

La purification de la cathepsine A était nécessaire afin de pouvoir étudier en profondeur son implication dans cette maladie. Pour purifier cette protéine à partir de placenta humain, Pshezhetsky *et al.* (1994), ont synthétisé un gel d'affinité composé d'agarose couplé à l'extrémité N-terminale du dipeptide hydrophobe Phe-Leu. Ce dipeptide est un substrat spécifique de la cathepsine A qui possède une préférence marquée pour les acides aminés C-terminaux hydrophobes. Une première étape de purification consistait en l'application d'un extrait d'homogénat de placenta sur une colonne de concanavaleine A-Sepharose (con A).

Cette colonne lie les glycoprotéines de l'homogénat qui, après élution avec du α -D-méthylmannopyranoside et du α -D-méthylglucoside, ont été déposées sur la colonne d'affinité d'agarose-Phe-Leu. Cette étape de purification est suivie d'une séparation sur une colonne échangeuse d'anions en chromatographie liquide à performance rapide (FPLC) permettant de séparer la cathepsine A de la cathepsine D et d'une autre protéine appelée I.P. 30 (Luster *et al.* 1988). Le pic de la cathepsine D contient aussi une protéine de 56 kDa par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide. Cette protéine a été séparée de la cathepsine D par tamisage moléculaire et séquencée en N-terminale. La séquence obtenue ne possédait aucune homologie avec les séquences connues de la banque de données GenBank et il s'agissait donc d'une nouvelle protéine humaine. Cette protéine a été désignée GP56 pour glycoprotéine de 56 kDa.

La possibilité que GP56 soit une protéine impliquée dans le complexe lysosomal avec la sialidase, la β -galactosidase et la cathepsine A a été rapidement éliminée puisque GP56 est purifiée à partir de la colonne d'agarose-Phe-Leu qui a la fonction de lier le complexe via la cathepsine A alors qu'il n'est pas possible de purifier GP56 à partir de la colonne *p*-aminophénylthio- β -D-galactopyranoside (PATGAL), qui permet de purifier le complexe via la β -galactosidase. Suite à ces observations, il est évident que GP56 n'est pas impliquée dans la galactosialidose et que sa co-purification à partir du placenta humain n'a aucun lien avec les enzymes impliqués dans le complexe lysosomal tout comme la cathepsine D.

La séquence unique de GP56 et sa présence dans l'extrait de placenta de même que dans la fraction de glycoprotéines obtenue de la colonne de concanavaline A-Sepharose (con A) nous a stimulé à essayer de caractériser la fonction biologique de cette protéine inconnue.

1.2 La génomique fonctionnelle.

La génomique fonctionnelle constitue une nouvelle science utile dans l'analyse du génome de diverses espèces. Selon Hieter et Boguski (1997), la génomique fonctionnelle est le développement et l'application des approches expérimentales afin de déterminer les fonctions des gènes et de séquences connues codant pour des protéines inconnues en utilisant toutes les informations disponibles. Tout ceci nécessite le développement de nouvelles techniques qui permettront l'utilisation de cette information pour établir la fonction des produits des gènes. Dans cette analyse, la bioinformatique joue un rôle essentiel car elle a pour but d'acquérir, d'entreposer, d'analyser et d'organiser les séquences d'ADN, ARNm et protéines disponibles de façon à pouvoir les utiliser pour déterminer la fonction des gènes. Les séquences sont contenues dans de nombreuses banques de données qui ont leur site sur l'internet comme le National Center for Biotechnology Information (NCBI), le Genome Sequence Data Bank (GSDB) et le European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ainsi que le MEDline ou le programme SwissProt (pour l'analyse de protéines). La génomique fonctionnelle vise à réduire la distance entre le séquençage d'un gène et la détermination de la fonction du produit de ce gène.

Parmi les méthodes expérimentales disponibles : les ESTs (Expressed Sequence Tags) provenant de différents laboratoires tel que Adams *et al.* (1991), le séquençage partiel de protéines, les gel de protéines à deux dimensions et la spectroscopie de masse pouvant relier un ou des peptides à une ou plusieurs séquences de gènes spécifiques (Yates *et al.* 1995 et Wilm *et al.* 1996). La possibilité facilitée de déterminer la fonction biologique d'une protéine de séquence connue ne dépend que de la méthode employée et du gène impliqué.

Le génome humain est composé de 50 000 à 100 000 gènes. Au début des années 90, le projet du Génome Humain a vu le jour. Ce projet consiste à séquencer et identifier tous les gènes de l'humain et de certains organismes sélectionnés (Rowen *et al.* 1997). Afin de parvenir à identifier et localiser ces gènes, il a fallu développer des techniques de séquençage rapides et efficaces ainsi que des programmes informatiques pouvant traiter les données et les analyser. En date de 1996, environ 800 000 ESTs ont été cataloguées (Rowen *et al.* 1997). Il s'agit de gènes exprimés dans différents tissus humains qui ont été partiellement ou totalement séquencés à partir de leur ARNm et transformés en cDNA pour former des bibliothèques (Adams *et al.* 1995). Ces séquences sont toutes disponibles via le site internet de NCBI.

Ce projet a permis le développement de la bioinformatique en permettant la création des nombreuses banques de données. Ces banques permettent de comparer des séquences afin d'identifier un motif structural, un motif régulateur, des séquences répétées ou une composition en nucléotides. Ces banques sont surtout très utiles pour les analyses d'identité entre différentes séquences en nucléotides ou en acides aminés.

Présentement, seulement 2% (60 Mb sur 3000 Mb) du génome humain a été séquencé. En comparaison, le génome de *E. coli* (4.6 Mb) de même que d'autres bactéries et celui de *Saccharomyces cerevisiae* (13 Mb) ont été complètement séquencés (Rowen *et al.* 1997). Dans le cas de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il s'agit du premier génome de cellule eucaryote à être totalement séquencé (Goffeau *et al.* 1996). La connaissance et la disponibilité de ce génome est un outil important pour l'analyse du génome humain puisqu'il permet de servir de guide dans la recherche de fonctions biologiques via l'utilisation de la bioinformatique. Cette analyse n'élimine toutefois pas la partie expérimentale de la détermination d'une fonction biologique, mais a pour but de diriger la recherche d'une façon concise afin d'y parvenir le plus rapidement possible. Ce système d'analyse (séquences et bioinformatique) qui s'améliore constamment se veut un rouage important dans la détermination de fonctions biologiques de gènes ou de protéines.

1.3 Buts poursuivis.

Le principal objectif de ce travail est de déterminer la fonction biologique de GP56. Une méthode très largement employée pour essayer d'établir la fonction d'une protéine consiste à utiliser la bioinformatique afin de comparer sa séquence avec celles présentes dans les banques de données de séquences pour déterminer à quelle famille elle appartient. La séquence en acides aminés de l'extrémité N-terminale de GP56 obtenue sera donc comparée aux autres séquences disponibles. De plus, à partir de cette séquence, il sera possible de produire des anticorps polyclonaux contre GP56 en utilisant la méthode de protéine de fusion avec la glutathione-S-transférase (GST) selon la méthode de Smith et Johnson (1988). En effet, la purification de GP56 à partir de placenta humain ne donne que de très petites quantités de protéines, insuffisantes pour la production d'un anticorps. D'autre part, un anticorps spécifique est un outil essentiel pour caractériser une protéine, pour son processus de maturation, sa localisation intracellulaire et sa quantification dans différents tissus.

La séquence de GP56 (cDNA) sera également clonée dans un vecteur d'expression qui sera transfecté dans des cellules eucaryotes pour étudier la maturation de GP56, après marquage avec la [³⁵S]-méthionine, par immunoprécipitation et séparation des protéines marquées par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide.

L'ARN total de placenta sera analysé pour y détecter celui qui code pour GP56 selon la technique de buvardage northern en utilisant la séquence d'ADN complémentaire de GP56 comme sonde.

GP56 a été purifiée à partir du placenta humain, mais quelle est sa distribution tissulaire ? Est-elle concentrée dans le placenta ou est-il possible de la détecter dans d'autres tissus ? Il sera possible de répondre à ces questions en analysant différents tissus humains tels que le rein, le cerveau, le foie, les fibroblastes et le sang par immunobuvardage en utilisant les anticorps dirigés contre GP56.

La fonction physiologique d'une protéine est déterminée en partie par sa localisation intracellulaire. Dans le cas de GP56, sa localisation intracellulaire est inconnue. Celle-ci sera étudiée selon deux méthodes : l'immunocytofluorescence et la microscopie électronique en utilisant des anticorps marqués à l'or colloïdal. Cette dernière méthode sera réalisée en collaboration avec le Dr C. Morales du Département d'anatomie de l'Université McGill.

GP56 est une glycoprotéine puisque lors de sa purification à partir du placenta humain, une colonne d'affinité de type con A est utilisée. Cette colonne lie les protéines glycosylées. Afin de déterminer le contenu en sucre de GP56, sa masse moléculaire sera analysée par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide avant et après déglycosylation par traitement à la N-glycosidase F. Cet enzyme libère les oligosaccharides liés à des résidus d'asparagine dans la séquence d'une protéine.

Dans ce travail, nous présentons une caractérisation complète de GP56. Les résultats de l'analyse de la séquence en acides aminés de GP56, sa distribution tissulaire, sa localisation intracellulaire, son processus de maturation dans les cellules eucaryotes nous ont permis de formuler l'hypothèse que GP56 est une endopeptidase de 56 kDa sécrétée dans le sang à partir de différents tissus tels que le placenta, les fibroblastes et probablement d'autres tissus. Nous présentons aussi une nouvelle méthode de purification de GP56 à partir du plasma humain en utilisant une colonne d'affinité composée d'immunoglobulines anti-GP56 couplées au Sepharose.

2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL

Le gel de concanavoline A-Sepharose, les colonnes de FPLC Mono Q et FPLC Superose 12 ont été obtenus de la compagnie Pharmacia-LKB (Baie d'Urfé, Québec). Le QAE-Sephadex, Les substrats CBZ-Phe-Leu, α -D-méthylmannopyranoside et α -D-méthylglucoside, les substrats pour le dosage de l'activité carboxypeptidique ainsi que le gel de Sepharose 4B-activé au CNBr ont été acquis de la compagnie Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). Le gel d'agarose-Phe-Leu a été synthétisé selon la méthode de Pshezhetsky *et al.* (1994). La trousse de détection par chemiluminescence après immunobuvardage a été achetée de la compagnie Boehringer-Mannheim (Laval, Québec) tout comme la N-glycosidase F.

Le clone 30142 a été obtenu du Washington University School of Medicine. Les enzymes de restriction *Bgl II*, *EcoRI*, *Hind III*, *Not I*, *Pst I* et *Sma I*, les enzymes de modification fragment de Klenow et CIAP (phosphatase alcaline d'intestin de veau) ainsi que le matériel de culture cellulaire tel que le milieu minimum essentiel (MEM), le sérum foetal de veau (SFV) et la trypsin 0.25% (p/v) ont été acquis de Gibco/BRL (Gaitersburg, MD). Le vecteur pGEX2T a été acheté de la compagnie Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Québec) tout comme la trousse de purification de protéine de fusion GST (contenant le gel glutathione-Sepharose 4B) ainsi que le module de détection de l'activité GST. Le plasmide pBluescript KS polylinker M13+ a été obtenu de la compagnie Stratagene (La Jolla, CA). Les oligonucléotides ont été synthétisés par la compagnie ACGT (Toronto, Ont).

Le vecteur d'expression pCMV- β gal provient de la compagnie Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, CA). La lipofectAMINE a été acquise de Gibco/BRL (Gaitersburg, MD). La méthionine radioactive a été achetée de la compagnie ICN Pharmaceuticals Inc. (Costa Mesa, CA). Les cellules Pansorbin utilisées lors des immunoprécipitations proviennent de Calbiochem (La Jolla, CA) alors que la solution Amplify a été achetée de la compagnie Amersham Life Science (Oakville, Ont) tout comme la membrane de nylon Hybond-N. La trousse de marquage radioactif de la sonde (oligolabelling Kit) et le gel de Sephadex G-50 proviennent de Pharmacia. Les substrats utilisés pour doser l'activité enzymatique de type aminopeptidase ont été achetés de la compagnie Bachem Bioscience Inc (King of Prussia, PA).

2.2 MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.2.1 Purification de GP56 à partir du placenta humain.

Environ 10 kg de placentas frais obtenus post-partum et perfusés avec une solution saline pour enlever le maximum de sang, ont été homogénéisés dans un mélangeur en présence de deux volumes de tampon acétate de sodium 20 mM, pH 5.2, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM et 5 mg/L de leupeptine (tampon A). L'homogénat a été centrifugé à 25 000xg pendant 60 min et le surnageant obtenu a été appliqué sur une colonne de con A de 200 ml (Pharmacia-LKB). La colonne a été lavée avec 20 volumes de tampon A contenant du NaCl 0.15 M (tampon B) et la fraction de glycoprotéines a été éluée avec 700 ml de tampon B contenant du α -D-methylmannopyranoside 0.75 M et du α -D-methylglucoside 0.15 M.

La fraction de glycoprotéines a été déposée sur une colonne d'affinité d'agarose-Phe-Leu (20 ml). Ce gel d'affinité a été développé pour absorber spécifiquement les cathepsines A et D. Suite à l'application, la colonne est lavée avec 400 ml de tampon acétate de sodium 20 mM, pH 4.75, NaCl 0.15 M, NaN₃ 0.02% (p/v) (tampon C) puis éluée avec 100 ml de CBZ-Phe-Leu 5 mM dans un tampon Tris/HCl 0.1 M, pH 7.5 (tampon D). La fraction éluée a été concentrée jusqu'à un volume de 4 ml dans un concentrateur Amicon muni d'une membrane de type PM-10, dialysée contre un tampon Tris 10 mM/HCl, pH 7.5 puis centrifugée à 10 000xg pendant 10 min. Le surnageant a ensuite été appliqué sur une colonne échangeuse d'anions Mono Q (FPLC) équilibrée avec le tampon D.

Les protéines ont été éluées par un gradient linéaire de NaCl entre 0.00 à 0.40 M sur un volume total de 60 ml dans le tampon D. Trois pics majeurs de protéines sont élués par le gradient. Le premier pic contient un mélange de GP56 et de cathepsine D. Les fractions contenant ce pic ont été recueillies puis concentrées jusqu'à un volume de 600 µl dans un concentrateur Amicon muni d'une membrane PM-10. La solution concentrée est appliquée sur une colonne de filtration sur gel Superose 12 éluee avec du tampon acétate de sodium 20 mM, pH 5.2, NaCl 0.15 M, NaN₃ 0.02% (p/v). Les fractions contenant GP56 seulement ont été analysées par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide et la concentration en protéines a été dosée selon la méthode de Bradford (1976).

2.2.2 Electrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide et immunobuvardage avec un anticorps anti-GP56.

L'électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide (dodécylsulfate de sodium) a été utilisée pour analyser les protéines selon la méthode de Laemmli (1972). Le système utilisé consistait en un gel de concentration de 4 % (p/v) et un gel de séparation de 11% (p/v). Les gels ont été préparés selon le tableau I. Le gel a été coloré avec une solution de bleu de Coomassie 0.2% (p/v) dans du méthanol 50% (v/v) et acide acétique glacial 10% (v/v). Pour les immunobuvardages, les protéines ont été électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose dans un appareil BIORAD trans blot cell pendant 90 min à 450 mA à 4°C en utilisant un tampon de transfert Tris/HCl 25 mM, glycine 192 mM, pH 8.0, méthanol 20 % (v/v).

Les incubations avec les anticorps, les lavages et la détection par chemiluminescence ont été réalisés selon le protocole établi par Bronstein *et al.* (1989). Les dilutions utilisées lors des essais sur GP56 étaient de 1 : 10 000 pour l'anticorps anti-GP56 ainsi que de 1 : 5 000 pour l'anticorps jumelé au système de détection. Les membranes ont été autoradiographiées sur des films Kodak (modèle X-OMAT AR)

TABLEAU I**Composition des gels de SDS-polyacrylamide.**

Les pourcentages d'acrylamide étaient de 11% (p/v) pour le gel de concentration et de 4% (p/v) pour les gels de séparation.

	GEL DE CONCENTRATION 11%	GEL DE SÉPARATION 4%
H ₂ O distillée	3.98 ml	4.1 ml
Tris 1.5 M/HCl, pH 8.8	-	2.77 ml
Tris 0.5 M/HCl, pH 6.8	1.67 ml	-
SDS 10% (p/v)	66.7 µl	110 µl
Acrylamide/Bis-acrylamide (30 % p/v)	890 µl	4.07 ml
TEMED	5.3 µl	4.43 µl
persulfate d'ammonium 10% (p/v)	66.7 µl	110 µl

2.2.3 Détermination de la séquence N-terminale de GP56.

Une partie de la fraction de GP56 purifiée a été utilisée (environ 30 µg) pour le séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine. Après électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11 % (p/v), les protéines ont été électrotransférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) en présence de tampon de transfert cyclohexylaminopropane sulfonic acid 10 mM (CAPS) pH 11, MeOH 10% (v/v), pendant deux heures à 450 mA. Après transfert, la membrane a été colorée dans une solution de bleu de Coomassie 0,1 % (p/v) dans du MeOH 50% (v/v). Une décoloration partielle de la membrane a été réalisée dans une solution de MeOH 50% (v/v), acide acétique glacial 10% (v/v). La bande correspondant à GP56 a été découpée et envoyée à l'Institut de recherche en biotechnologie de Montréal pour être séquencée avec un séquenceur automatique Applied Biosystems.

2.2.4 Obtention de l'ADN complémentaire de GP56.

L'obtention de la séquence N-terminale de GP56 a permis de vérifier dans les banques de données l'existence de la séquence en nucléotides codant pour cette protéine. La banque de donnée GenBank a révélée la disponibilité d'une séquence de nucléotides codant pour une série d'acides aminés identique à 100 % avec la séquence N-terminale de GP56 dans la banque de séquences anonymes exprimées (ESTs). Le clone 30142 a été obtenu du Washington University School of Medicine via le consortium I.M.A.G.E. (Integrated Molecular Analysis of Genome Expression).

Une amplification rapide des extrémités de cDNA par réactions en chaîne à la polymérase (RACE/PCR) a été faite sur une population d'ADN complémentaires provenant d'ARN de placentas afin d'obtenir la séquence 5' du cDNA de GP56 et confirmer la présence de la séquence complète dans le clone 30142. Cette analyse a révélé l'absence d'un seul nucléotide dans la séquence de GP56 du clone 30142, soit la première adénine du codon d'initiation de la transcription.

2.2.5 Préparation de la protéine de fusion GP56-GST.

Environ 5 µg du clone 30142 ont été digérés par les enzymes de restriction *EcoRI* et *Bgl II* (Gibco/BRL) pendant 1 h à 37°C créant ainsi quatre fragments ayant des poids de 3.7 kb, 773 pb, 577 pb et 63 pb. Le fragment de 577 pb a été traité au phénol/chloroforme et incubé avec le fragment Klenow de la polymérase T4 pendant 15 min à 30°C afin d'obtenir des extrémités franches. Le cDNA de GP56 a été purifié à partir d'un gel d'agarose à bas point de fusion 1% (p/v) puis quantifié par comparaison à des standards en gel d'agarose 0.8% (p/v). 2 µg du vecteur pGEX2T (Pharmacia) ont été linéarisés en un seul fragment de 4.9 kb en incubant pendant une heure à 30°C avec l'enzyme *SmaI* (Gibco/BRL). Le vecteur pGEX2T contient la séquence codant pour la GST qui est immédiatement suivie d'un site unique de restriction pour les enzymes *BamHI*, *SmaI* et *EcoRI*. Le vecteur digéré a été traité au phénol/chloroforme puis déphosphorylé avec l'enzyme CIAP (Gibco/BRL) pendant une heure à 50°C. Le vecteur déphosphorylé a été purifié dans les mêmes conditions que précédemment puis sa quantité a été déterminée par comparaison avec des standards en gel d'agarose 0.8% (p/v).

Le fragment de GP56 a été ligaturé avec le vecteur pGEX2T en incubant une nuit à 16°C avec la ligase de T4. Un dixième de la réaction de ligation a été utilisée pour la transformation bactérienne. Des cellules α -DH5 (Gibco/BRL) compétentes ont été utilisées pour cette partie du travail. Les clones ont été sélectionnés sur pétri en milieu Luria-Bertani et ampicilline. Les colonies obtenues sur ces pétris ont été repiquées et des minipréparations ont été obtenues selon Sambrook (1989). L'orientation de l'insertion du cDNA de GP56 dans le vecteur a été vérifiée par une digestion avec l'enzyme de restriction *PstI* (Gibco/BRL).

L'expression de la protéine de fusion GP56-GST a été réalisée selon le protocole décrit dans Current Protocols in Molecular Biology. Les cellules bactériennes utilisées étaient de souche E. Coli 801-C. Ces bactéries ne contiennent qu'une faible quantité de protéases pour préserver les protéines de fusion exprimées.

Le milieu de culture contenait de l'ampicilline (10 μ g/ml) et l'induction du vecteur GP56-GST a été obtenue par addition d'isopropylthiogalactoside 0.1 mM (IPTG) au milieu de culture pendant 3 h à 37°C. Les cellules ont ensuite été récupérées par une centrifugation à 5000xg de 10 min. Les bactéries ont été resuspendues dans 2 ml d'un tampon de lyse composé d'une solution saline tamponnée avec du phosphate (PBS), pH 7.4, éthylène diamine tétraacétate de disodium 5 mM (EDTA), phénylméthylsulfonyl fluoride 0.1 mM (PMSF), 0.01 mg/ml de DNase, 10 μ g/ml de RNase, 5 mg/L de leupeptine, 0.25 mg/ml de lysozyme et de Triton X-100 1% (v/v).

Ces bactéries ont été soumises à deux traitements de sonication de 45 sec chacun et centrifugées à 10 000xg pendant 5 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré et la concentration de protéines a été dosée de même que l'activité GST. La présence de la protéine de fusion GP56-GST, d'une masse moléculaire d'environ 48 kDa, a été déterminée par immunobuvardage en utilisant des anticorps anti-GST. La protéine de fusion GP56-GST a été purifiée sur une colonne d'affinité de 5 ml de glutathione-Sepharose 4B équilibrée au préalable avec du PBS pH 7.4. Suite à l'application de l'échantillon de protéines, la colonne a été lavée avec 3 volumes de tampon PBS, pH 7.4, NaCl 0.5 M. Les protéines de fusion ont été éluées avec 5 volumes de tampon glutathione réduit 10 mM dans du tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.0. L'éluat a été concentré dans un concentrateur Amicon muni d'une membrane PM-10 jusqu'à une concentration de 0.5 mg de protéine/ml.

2.2.6 Production d'anticorps polyclonaux anti-GP56.

Le protocole utilisé pour l'immunisation d'un lapin a été celui décrit dans Current Protocols in Molecular Biology. Le procédé implique trois injections sous-cutanées : Une première avec la protéine GP56 purifiée à partir de placenta humain et les deux injections suivantes avec la protéine de fusion GP56-GST purifiée. La première injection a été réalisée au jour 0 alors que les deuxième et troisième injections de rappel ont été faites aux jours 30 et 40, respectivement. Au jour 50, l'animal a été sacrifié et son sérum a été récolté et titré contre GP56 pour déterminer la spécificité des anticorps produits.

2.2.7 Dosage enzymatique de la cathepsine A.

L'activité enzymatique de la cathepsine A a été déterminée à 37°C pendant 30 min selon la méthode de Tranchemontagne *et al.*, (1990) utilisant le CBZ-Phe-Leu 1.5 mM comme substrat dans du tampon acétate de sodium 20 mM, pH 5.2, NaCl 0.15 M. La réaction a été arrêtée en traitant le milieu d'incubation à 100°C pendant 3 min. La quantité de leucine libérée a été mesurée spectrophotométriquement au moyen d'une solution de coloration constituée de L-amino acid oxydase, de peroxidase et d'O-dianisidine (Stevens *et al.* 1986). Une unité d'activité enzymatique a été définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à la transformation de 1 μ mole de substrat/min.

2.2.8 Dosage enzymatique de la cathepsine D.

L'activité de la cathepsine D a été déterminée à 37°C pendant 60 min selon la méthode de Barret (1970) en utilisant de l'hémoglobine bovine à 2% (p/v) comme substrat dans du tampon formate de sodium 1.0 M, pH 3.5. La réaction est arrêtée par addition d'une solution d'acide trichloroacétatique concentrée à 100% (p/v), le mélange est centrifugé à 14 000xg pendant 3 min et la densité optique du surnageant mesurée à 280 nm. Une unité d'activité cathepsine D est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour augmenter la densité optique du milieu réactionnel à 280 nm d'une unité par min.

2.2.9 Déglycosylation des glycoprotéines.

Les protéines ont été déglycosylées selon la méthode de Haselbeck et Hösel (1988). Les protéines (40 µg) ont été diluées dans du tampon phosphate de potassium 20 mM, pH 7.2, EDTA 10 mM, SDS 0.1% (p/v) et DTT (dithiothréitol) 0.2% (p/v). Les protéines ont été dénaturées à 100°C pendant 3 min puis incubées à 37°C durant 10 min. Du Triton X-100 a ensuite été ajouté à la solution jusqu'à une concentration finale de 0.5 % (v/v) ainsi que l'enzyme de déglycosylation, la N-glycosidase F (1 unité). Cet enzyme coupe les oligosaccharides liés aux résidus Asn de la chaîne polypeptidique des protéines.

La déglycosylation s'effectue à 37°C pendant 17 h et la réaction est arrêtée par l'ajout d'un volume de tampon de coloration d'échantillon à électrophorèse et le mélange a été déposé en gel de SDS-polyacrylamide. La déglycosylation des protéines est observée par une diminution de la masse moléculaire déterminée par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide et immunobuvardage dont les méthodes sont décrites plus haut.

2.2.10 Localisation intracellulaire de GP56 par immunocytofluorescence.

Des fibroblastes cutanées humains ont été mis en culture dans un flacon de 25 cm² contenant 6 ml de MEM de type alpha et 10% (v/v) de SFV (inactivé pendant 1 h à 56°C). Les flacons de culture sont incubés à 37°C en présence d'une atmosphère de CO₂ à 5% (v/v).

Pour la microscopie, certains des flacons ont été trypsinisés (0.1% (p/v)) et les cellules en suspension ont été repiquées sur des lamelles jusqu'à confluence complète. Les cellules ont ensuite été fixées avec une solution de MeOH 80% (v/v), acétone 20% (v/v) à -20°C pendant 10 min suivi d'une deuxième fixation avec du formaldéhyde 3.5% (v/v) dans du tampon PBS pendant 30 min. Les cellules fixées ont été perméabilisées dans du Triton 0.5% (v/v) pendant 30 min. Les liaisons non-spécifiques possibles ont été bloquées par une incubation des cellules dans une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) 2% (p/v) pendant 1 h et ensuite en présence de l'anticorps anti-GP56 (dilution 1 :100 dans la solution de blocage) pour le même temps.

Après l'incubation avec le premier anticorps, les fibroblastes ont été lavés avec du PBS puis incubés de nouveau avec le deuxième anticorps pendant 1 h à la température de la pièce. Le deuxième anticorps (dilution 1 :100) est couplé avec la rhodamine qui agit comme marqueur fluorescent selon la méthode de Baker *et al.* (1981). Les cellules ont, par la suite, été lavées au PBS et les lamelles ont été recouvertes de gélatine en éliminant les bulles d'air. Les lamelles peuvent être visionnées environ 45 min plus tard avec un microscope Zeiss Axioskop en mode fluorescence.

2.2.11 Localisation intracellulaire par microscopie électronique.

La localisation intracellulaire par microscopie électronique a été réalisée en collaboration avec le Dr Carlos Morales de l'Université McGill. Des fibroblastes en culture à 75% de confluence ont été trypsinisés, lavés avec du PBS puis fixés avec un tampon phosphate 50 mM, pH 7.5 contenant de la paraformaldéhyde 4% (v/v) et du glutaraldéhyde 0.5% (v/v). Les culots cellulaires ont été déshydratés dans du MeOH puis fixés dans du Lowicryl K4M suivant la méthode de Hermo *et al.* (1991). Les couches ultraminesces de Lowicryl ont été montées sur des grilles de nickel 300-Formvar (Polysciences, Inc., Warrington, PA). Chaque section a été incubée dans un tampon Tris 20 mM, pH 7.5 (TBS) contenant du Tween 20 0.1% (v/v) et du sérum de chèvre 15% (v/v) pendant 15 min puis dans un tampon TBS contenant l'anticorps anti-GP56 en dilution de 1 :500 pendant 30 min. Les couches ont ensuite été lavées quatre fois dans du TBS contenant du Tween 20 0.05% (v/v).

Après les lavages, les couches ont été incubées dans un tampon TBS contenant du sérum de chèvre 15% (v/v) pendant 15 min puis dans du TBS contenant des IgG de chèvre anti-lapins conjuguées à l'or colloïdal (Zollinger Incorporated, Montréal, Québec) pendant 30 min. Les couches ont été lavées deux fois dans du TBS contenant du Tween 20, 0.05% (v/v), deux fois dans de l'eau distillée puis traitées avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb tel que décrit par Sylvester *et al.* (1989). Le sérum de lapin a été utilisé comme témoin. Les couches ont été visualisées avec un microscope électronique Philips 400 (Philips Electronics, Toronto, Ontario).

2.2.12 Clonage et correction de la séquence de GP56.

La séquence de GP56 du clone 30142, obtenu du consortium I.M.A.G.E., ne possède pas la première adénine du codon d'initiation. Afin d'utiliser cette séquence (de 1.62 kb) pour l'expression eucaryotique de GP56, il a fallu la compléter et la cloner dans un vecteur d'expression adéquat (Figure 1). La correction de la séquence GP56 incomplète a, tout d'abord, nécessité le clonage de celle-ci dans le vecteur pBluescript KS Polylinker M13+ (BS) en utilisant les sites *HindIII* (en extrémité 5') et *NotI* (en extrémité 3') de BS. Le clone BS-GP56inc a été purifié et digéré avec les enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRI*. Ce dernier enzyme ne reconnaît qu'un seul site de restriction dans la séquence de GP56. Cette double digestion a permis de libérer un fragment d'environ 400 pb qui correspond au début de la séquence de GP56 (Figure 1A).

Simultanément, le clone BS-GP56inc a été utilisé pour effectuer une amplification par PCR de la séquence de 400 pb obtenue à l'étape précédente. Deux oligonucléotides ont été synthétisés pour cette étape, un antisens (5'-ACCCAGGATGGCTATCTTAT-3', T_m : 53°C) possédant une séquence d'affinité avec la séquence GP56 couvrant la région du site de restriction *EcoRI* et un oligonucléotide sens (5'-GATAAGCTTGCGGCCGCACGAGGCATGAAA-3', T_m : 69°C) possédant, en 5' de la séquence, un site de restriction *HindIII* suivi d'un autre site de restriction *NotI*, lui-même suivi d'une séquence d'affinité avec le début de la séquence de GP56. Cette séquence d'affinité incluait la correction du codon d'initiation.

Le PCR a été réalisé avec 4 µg de vecteur BS-GP56inc dans un tampon constitué de Tris 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, gélatine 0.001% (p/v) et DMSO 0.5% (v/v). Les oligonucléotides ont été utilisés à la concentration finale de 200 nM et les nucléotides à 200 µM. 32 cycles d'amplification ont été réalisés à une température de 51°C. Le produit de PCR a été purifié par extraction au phénol/chloroforme, fractionné en gel d'agarose à bas point de fusion puis la quantité a été mesurée par comparaison à des standards par électrophorèse en gel d'agarose 0.8% (p/v) coloré au bromure d'éthidium. Le fragment obtenu est constitué de la séquence de GP56 contenue entre les sites de restriction *HindIII* (en 5') et *EcoRI* (en 3'). Ces deux sites ont permis le reclonage de cette séquence dans le vecteur BS-GP56inc dépourvu de ce fragment (tel qu'expliqué au début de cette section). Le clone obtenu à la fin de ces étapes possède la séquence GP56 avec le codon d'initiation complet (Figure 1B).

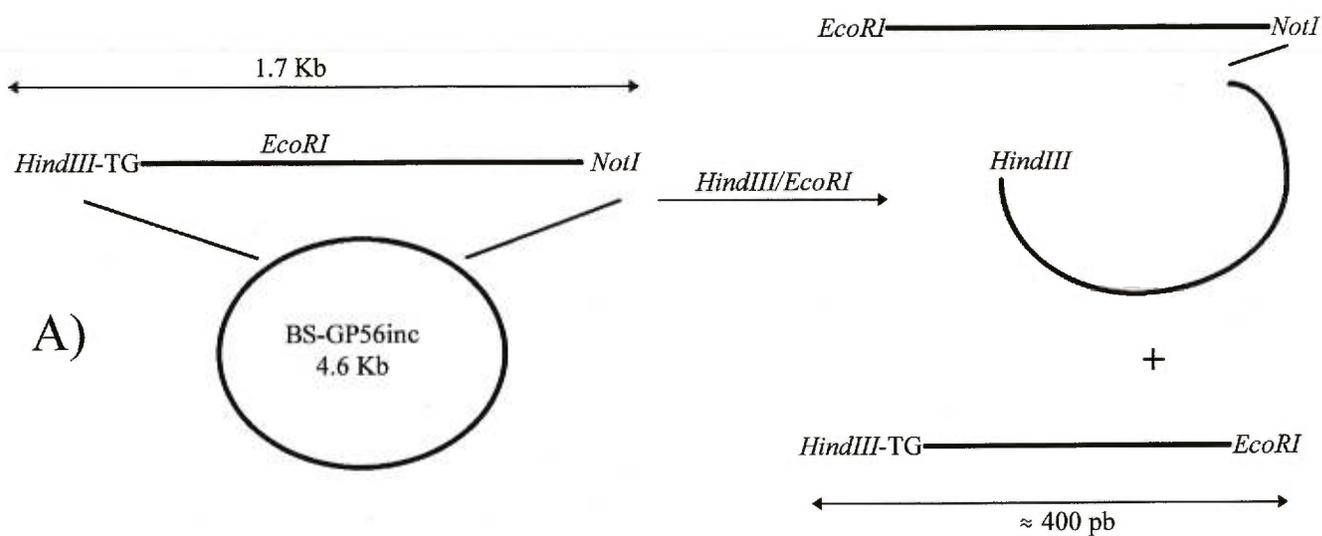
Le site de restriction *NotI* implanté au début de la séquence (en 5') a permis de faire une simple digestion afin de cloner la séquence GP56 dans le vecteur d'expression pCMV (Clontech). Le vecteur d'expression pCMV-βgal est d'une longueur de 7.2 kb. Ce vecteur contient le gène de la β-galactosidase ainsi que le promoteur/enhancer du cytomegalovirus qui est très puissant dans les cellules de mammifères. De plus, pCMV contient un signal de polyadénylation de SV40. Le gène de la β-galactosidase inclus dans ce vecteur peut être remplacé par un autre gène pour procéder à son expression eucaryotique.

Le gène en question peut être cloné dans pCMV entre les deux sites de restriction *NotI* disponibles (Figure 1B). L'orientation de la séquence de GP56 dans le vecteur pCMV a été vérifiée par digestion enzymatique avec l'enzyme *EcoRI* et analyse des fragments de digestion.

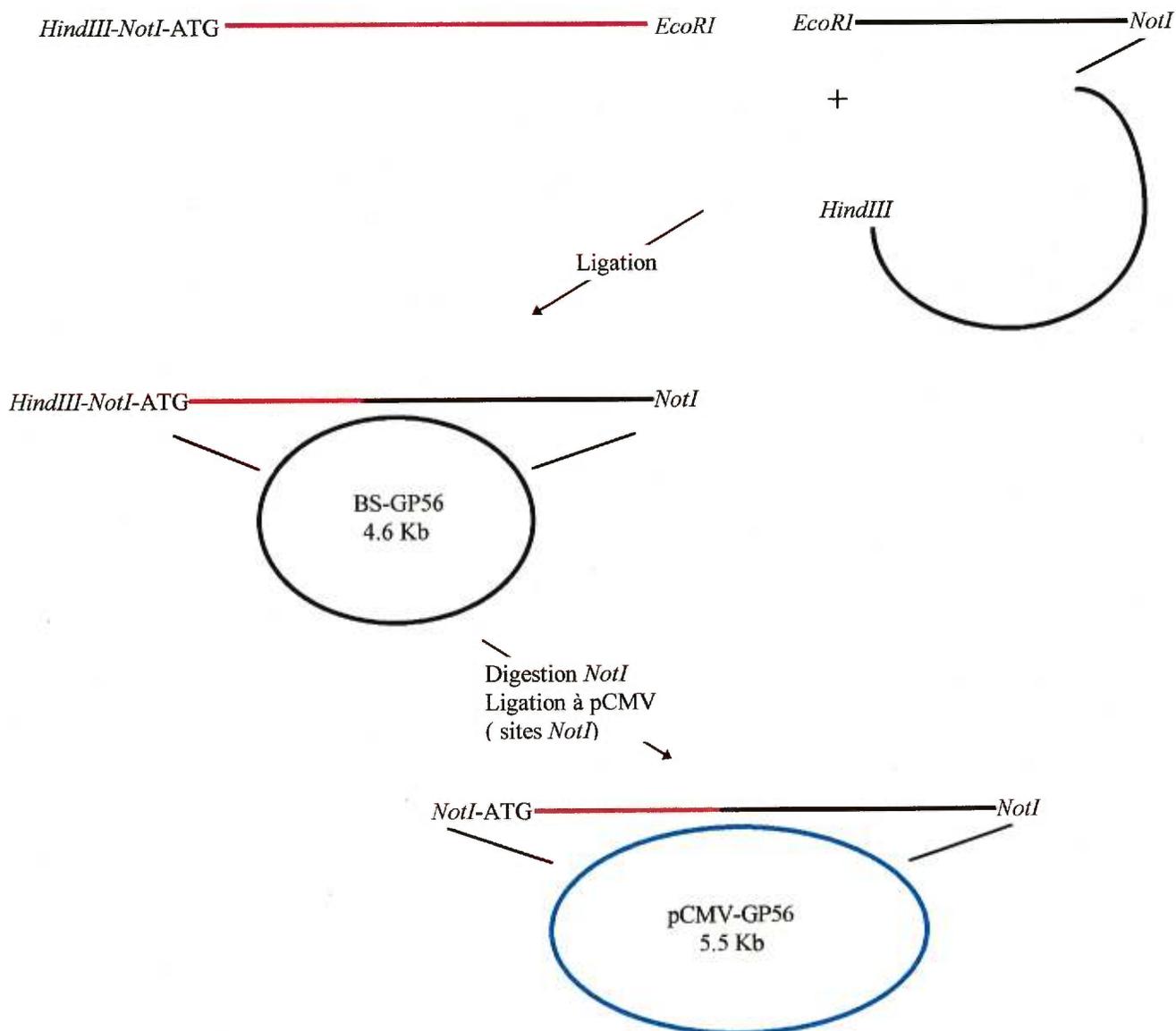
FIGURE 1

Clonage et correction de la séquence de GP56.

Schéma de la correction du cDNA de GP56. A) Excision du fragment de 400 pb à partir du vecteur BS-GP56inc contenant le codon d'initiation incomplet par digestion avec les enzymes *HindIII* et *EcoRI*. B) Le fragment de 400 pb corrigé par amplification au PCR avec l'ajout des nouveaux sites de restriction dans la région 5' (←) est cloné dans le vecteur BS-GP56 digéré. Le nouveau vecteur BS-GP56 est digéré avec *NotI* puis cloné dans le vecteur d'expression eucaryotique pCMV.



B)



2.2.13 Purification du plasmide pCMV-GP56.

Après amplification, le plasmide pCMV-GP56 a été purifié par centrifugation en gradient de CsCl selon le protocole décrit dans Current Protocols in Molecular Biology. Environ 250 ml de milieu de culture LB ont été inoculés avec 0.5 ml d'une culture de *E. coli* contenant le plasmide désiré. Les bactéries ont été incubées à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, les cellules ont été récoltées par centrifugation puis resuspendues dans une solution de lyse contenant 5 ml de glucose/Tris/EDTA, 1 ml d'une solution de lysozyme 5 mg/ml et 8 ml d'une solution de Triton 0.1% (v/v). Après centrifugation, on ajoute un demi volume de polyéthylène glycol (PEG). Suite à une incubation de 30 min sur glace, le tout a été centrifugé puis le culot a été resuspendu dans 8 ml de tampon TE (Tris/EDTA) auquel on a ajouté 8.8g de CsCl et 0.8 ml de bromure d'éthidium (10mg/ml). Cette préparation a été centrifugée à l'équilibre pendant 20 h à 186 400xg, 15°C. Après cette étape, le tube contenant le gradient de CsCl a été mis sous rayons ultraviolets afin de visualiser la bande correspondant au plasmide pCMV-GP56 et la récupérer avec une seringue. Le volume ainsi obtenu a été mis en présence d'un volume égal d'une solution d'isopropanol/TE afin d'extraire le bromure d'éthidium. Le plasmide a été précipité par l'ajout de deux volumes de tampon TE et de six volumes d'éthanol absolu. Le plasmide a été récupéré par centrifugation puis lavé avec 1 ml d'éthanol 95% (v/v), centrifugé et la concentration en ADN a été dosée par absorbance à 260 nm (1 unité de $DO_{260} \cong 50 \mu\text{g/ml}$ d'ADN).

2.2.14 Expression de pCMV-GP56 dans les cellules eucaryotes.

La méthode choisie pour transférer le gène de GP56 dans les cellules est la lipofection. Il s'agit d'une méthode de transfection où le plasmide contenant le gène d'intérêt est transféré dans les cellules avec l'aide d'un transporteur constitué de lipides cationiques. Cette technique a été mise au point dans les années 1980 par Felgner *et al.* (1987). Les lipides se lient au plasmide de façon à former un micelle qui se fusionnera avec la membrane cellulaire permettant l'entrée du plasmide dans la cellule. Le gène peut alors être transcrit, traduit et produire la protéine d'intérêt. Le lipide utilisé dans les expériences de transfection est la lipofectAMINE (Life Technologies) et les cellules cibles sont des COS. Ces cellules proviennent de reins de singes et ont été transformées par le virus SV40. Elles ont été mises en culture dans des flacons T-25 en présence de 5 ml de MEM contenant 10% (v/v) de SFV et 1% (v/v) d'antibiotiques PenStrep (penicilline-streptomycine). Les cellules ont été incubées à 37°C sous atmosphère de CO₂ 5%.

Les transfections ont été effectuées dans des flacons de cellules à environ 50% de confluence. 4 µg de plasmide pCMV-GP56 (ou pCMV-βgal pour les contrôles) ont été incubés en présence de 10 µl de lipofectAMINE dans 400 µl de MEM ne contenant pas de sérum foetal de veau ni d'antibiotiques. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 45 min à la température de la pièce. Pendant ce temps, les cellules COS utilisées pour la transfection ont été lavées deux fois avec du MEM sans sérum ni antibiotiques et le complexe plasmide-liposomes de même que 800 µl de MEM sans sérum ni antibiotiques ont été ajoutés aux cellules pour initier la transfection.

Les cellules ont été incubées dans les conditions habituelles (température et concentration de CO₂) pendant 5 h. Suite à cette incubation, 1 ml de MEM contenant les antibiotiques et 20% (v/v) de SFV ont été ajoutés aux cellules. Les flacons ont alors été incubés pour la période de temps nécessaire (entre 30 et 48 heures) pour obtenir la confluence des cellules. Les cellules ont alors été récoltées par trypsination, homogénéisées par sonication puis analysées par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide et immunobuvardage. L'efficacité de la transfection a été vérifiée par essai enzymatique pour l'enzyme β -galactosidase puisque la transfection contrôle a été réalisée avec le vecteur pCMV- β gal. Environ 5-10% des cellules utilisées pour la transfections se détachent et meurent en milieu de culture.

2.2.15 Dosage enzymatique de la β -galactosidase.

Le dosage enzymatique de la β -galactosidase a été utilisé pour mesurer le niveau de transfection des cellules COS par le vecteur d'expression pCMV- β gal qui constituait le contrôle des essais de lipofection. Les cellules étaient récoltées par trypsination, homogénéisées par sonication dans 1 ml de tampon PBS, pH 7.5, et la concentration de protéines dosée. 20 μ g (10 μ l) de protéines totales ont été diluées dans 40 μ l de tampon PBS, pH 7.5. Après 15 min à la température de la pièce, 50 μ l de substrat 4-méthylumbelliféryl- β -D-galactopyranoside (MUGAL) 2.5 mM ont été rajoutés pour débiter la réaction puis incubé à 37°C pendant 25 min. La réaction a été arrêtée avec 1.9 ml de tampon glycine 0.4 M, pH 10.5. Le changement de pH arrête la réaction et augmente la fluorescence du 4-méthylumbelliférone qui est mesurée par fluorimétrie.

2.2.16 Marquage métabolique et immunoprécipitation de GP56.

Le marquage métabolique (pulse-chase) de GP56 dans des cellules de type COS transfectées au préalable avec le vecteur pCMV-GP56 a été effectué avec de la [³⁵S]-méthionine comme précurseur (Harlow *et al.* 1988). Le milieu de culture des cellules à 75% de confluence a été aspiré puis les cellules ont été lavées une fois avec du milieu sans méthionine puis incubées à 37°C en présence de 5% CO₂ pendant deux heures dans 2 ml de milieu de culture sans méthionine, mais contenant du glutamate et du pyruvate.

Après cette incubation, 30 µCi de [³⁵S]-méthionine ont été ajoutés aux cellules pour des marquages de 40 min, 1 h, 4 h, 6 h et 22 h. À la suite de ces incubations, le milieu a été retiré puis les cellules ont été lavées une fois au PBS avant d'être incubées, sur glace pendant 30 min, avec 1 ml de tampon de lyse pour la radioimmunoprécipitation (RIPA) composé de NaCl 150 mM, NP-40 (nonidet P-40) 1% (v/v), DOC (acide désoxycholate) 0.5% (p/v), SDS 0.1% (p/v), PMSF 1 mM et Tris 50 mM, pH 8.0. Le lysat a été centrifugé à 10 000xg à 4°C pendant 10 min et le surnageant a été incubé sur glace pendant 1 h en présence de 50 µl de sérum normal de lapin. Pour enlever l'adsorption non-spécifique des immunoglobulines sériques, on y ajoute 500 µl d'une suspension de cellules Pansorbin (préalablement lavées avec du tampon PBS) que l'on incube 30 min sur glace avant de centrifuger pendant 15 min. Le surnageant (500 µl) est utilisé pour l'immunoprécipitation spécifique avec 5 µl de sérum contenant les anticorps anti-GP56 pendant 1 h sur glace.

Le complexe anticorps-GP56 a été récolté avec 100 μ l de cellules Pansorbin tel que décrit précédemment. Le culot obtenu a été lavé 3 fois avec 1 ml de tampon RIPA, resuspendu dans 100 μ l de tampon Laemmli (Laemmli, 1970) puis chauffé dans un bain à 100°C pendant 10 min. Après une centrifugation, le surnageant a été conservé et fractionné en gel de SDS-polyacrylamide par électrophorèse pour analyse. Pour l'autoradiographie, le gel a été trempé dans une solution d'isopropanol :eau :acide acétique (25 :65 :10, v :v :v) pendant 20 min puis dans une solution « Amplify » pendant 20 min. Le gel est ensuite séché à 60°C pendant 40 min puis autoradiographié avec un film de marque Kodak (modèle X-OMAT AR).

2.2.17 Isolement et détection de l'ARN de GP56.

L'ARN a été isolé par une modification de la méthode de Sambrook *et al.* (1989). Toutes les étapes ont été réalisées en prenant les précautions habituelles pour empêcher la contamination à la RNase. Pour les fibroblastes, l'ARN a été extrait directement des culots de cellules avec une solution dénaturante de thiocyanate de guanidine 4 M, Tris 0.1 M, pH 7.5, sarcosinate de lauryle 0.5% (p/v) et β -mercaptoéthanol 1% (v/v). Pour l'ARN de placenta, 1 g de tissu congelé a été homogénéisé durant 30 sec à l'aide de l'homogénéisateur Polytron (modèle PT3000 de Brinkmann) en présence de la même solution dénaturante.

Dans les deux cas, l'homogénat a été déposé sur un gradient de 4 ml de CsCl 5.7 M, EDTA 10 mM, pH 7.5. Les constituants de l'homogénat ont été séparés par ultracentrifugation à l'équilibre à 186 400xg pendant 24 h à 15°C. L'ARN a été retrouvé dans le culot et a été resuspendu dans 300 µl de tampon TE, pH 8.0. Suite à deux extractions phénol/chloroforme (1 :1) et une extraction au chloroforme/alcool isoamylique (24 :1), l'ARN est précipité avec deux volumes d'éthanol en présence de 10% (v/v) de tampon acétate de sodium 3 M, pH 5.2. Le mélange a été centrifugé puis le culot a été lavé à l'éthanol 70% (v/v), recentrifugé, séché, resuspendu dans 10 µl de TE, pH 8.0 puis la densité optique à 260 nm a été mesurée pour déterminer la concentration d'ARN (une unité de D.O.₂₆₀ ≈ 40 µg/µl).

L'ARN de GP56 a été détecté par buvardage northern. Les échantillons d'ARN ont été appliqués sur un gel d'agarose 1.5% (p/v) contenant 6.5% (v/v) de formaldéhyde et du tampon d'électrophorèse RB composé de 3-[N-morpholino]propane sulfonic acid 0.1 M (MOPS), pH 7.0, EDTA 5 mM, pH 7.2, acétate de sodium 30 mM. Les échantillons d'ARN ont été préparés de la façon suivante : à 10 µg d'ARN (1µl), on a ajouté 10 µl de formamide, 3.5 µl de formaldéhyde 37% (v/v) et 4 µl de tampon RB et les échantillons ont été chauffés à 65°C pendant 10 min pour défaire les structures secondaire de l'ARN. Après cette étape, 2 µl de tampon d'échantillonnage 10X ont été ajoutés au mélange puis le tout a été appliqué sur le gel. Les ARN ont migré pendant 6 h à 100 V et le gel a été coloré au bromure d'éthidium pendant 15 min suivi d'une décoloration pour la nuit dans du tampon RB.

L'ARN du gel a été électrotransféré à la membrane de nylon Hybond dans un tampon SSC 10X (chlorure de sodium/citrate de sodium) pendant 48 h à la température de la pièce. Après le transfert, la membrane a été séchée à l'air quelques minutes puis l'ARN a été fixé sur la membrane par exposition aux rayons ultraviolets pendant 2 min. La membrane a été pré-hybridée dans une solution composée de sodium/phosphate de sodium/EDTA 5X (SSPE), formamide 50% (v/v), Denhardt's 5X et sulfate de Dextran 10% (v/v) pendant 3 h à 42°C. Après cette incubation, 2.5 mg de ssDNA (ADN de sperme de saumon) et 10^6 cpm de la sonde dénaturée/ml de solution d'hybridation ont été ajoutés à la membrane pour une autre incubation de 24 h à 42°C. Après hybridation, la membrane a été lavée 2 fois 15 min à la température de la pièce avec une solution de SSC 0.1X, SDS 0.1 % (p/v) puis 2 fois 15 min à 50°C avec la même solution. Suite à ces opérations, la membrane a été autoradiographiée avec un film Kodak.

La sonde d'ADN utilisée pour l'hybridation a été préparée selon la méthode de la trousse « oligolabelling kit » de Pharmacia. La séquence incomplète de GP56 que l'on retrouve dans le vecteur lacmid (clone 30142) a été utilisée comme sonde. Environ 50 ng de sonde d'ADN, bouillis pendant 5 min, ont été mis en présence de 50µCi de dCTP³² et de 1 µl du fragment de Klenow. Le tout a été incubé pendant 3 h à la température de la pièce. La réaction de marquage a été arrêtée par l'ajout de 150 µl de STE (chlorure de sodium/Tris/EDTA).

La solution de marquage est appliquée sur une colonne de Sephadex G-50 qui est ensuite centrifugée à basse vitesse pour éliminer la radioactivité non incorporée à la sonde qui reste captive de la colonne. La radioactivité incorporée dans la sonde a ensuite été dosée par scintillation liquide.

2.2.18 Préparation de la colonne d'immunoaffinité.

La protéine GP56 a été purifiée à partir du plasma par affinité aux immunoglobulines anti-GP56 couplées à un gel de Sepharose. Les immunoglobulines provenant du sérum de lapin immunisé contre GP56 ont été précipitées en présence de NH_4Cl 50% de saturation par une modification de la méthode de Beeckmans et Kanarek (1981). La solution a été agitée pendant 30 min à 4°C puis centrifugée à $10\,000\times g$ pendant 30 min. Le culot a été lavé dans une solution de NH_4Cl à 33% de saturation suivi d'une autre centrifugation puis resuspendu dans du tampon PBS, à un dixième du volume initial. Le tout a été dialysé pendant 24 h contre du PBS et la concentration en protéines du dialysat a été dosée.

Le gel de Sepharose 4B (Sigma), a été préparé selon les instructions de la compagnie Sigma. Environ 1g de gel Sepharose 4B-activé avec du CNBr a été lavé dans 100 ml de HCl 0.1 mM puis repris dans 5 ml de tampon de couplage (NaHCO_3 0.1 M, pH 8.3, NaCl 0.5 M). Cette solution a été mélangée à 4 ml d'une solution d'immunoglobulines (25 mg) puis incubée pendant une nuit à 4°C sous agitation.

Le lendemain, la solution a été centrifugée, le surnageant a été retiré puis le gel a été incubé pendant 2 h dans du tampon glycine 0.2 M, pH 8.0 à la température de la pièce pour saturer les sites d'adsorption non-spécifique du gel d'immunoglobulines anti-GP56-Sepharose 4B. Une série de lavages a par la suite été effectuée avec le tampon de couplage, le tampon d'acétate (acétate de sodium 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 4.0) puis avec du PBS. La colonne d'affinité a été équilibrée dans du tampon PBS puis conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

2.2.19 Purification de GP56.

Pour purifier GP56 à partir du plasma, les protéines ont été précipitées avec 33% de saturation en sulfate d'ammonium pendant 2 h avant d'être centrifugées. Les protéines du surnageant obtenues de cette centrifugation ont été précipitées avec du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 50% de saturation pendant 2 h et centrifugées. Les protéines de ce dernier surnageant ont ensuite été précipitées par du sulfate d'ammonium à 75% de saturation pendant 2 h et centrifugé. Les culots obtenus par les deux dernières centrifugations ont été resuspendus dans du PBS, dialysés puis analysés par immunobuvardage pour détecter la fraction ayant le plus de spécificité aux anticorps anti-GP56.

La fraction précipitée avec 50% en saturation de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a été appliquée sur le gel d'immunoaffinité. Le gel a été lavé avec 10 ml de tampon PBS contenant du NaCl 0.4 M et les protéines liées à la colonne ont été éluées par un tampon glycine 0.2 M, pH 2.3. Les fractions (1 ml) récoltées ont été neutralisées avec du tampon Tris 1M, pH 8.3 avant d'être analysées par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide. Les bandes de protéines dans le gel ont été colorées au bleu de Coomassie. Les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été recueillies, concentrées puis la concentration en protéines a été dosée par la méthode de Bradford (1976).

2.2.20 Dosages enzymatiques d'aminopeptidases et d'endopeptidases.

Plusieurs substrats ont été utilisés pour doser les activités aminopeptidases et endopeptidases (Tableau II). Des solutions stocks de substrat 100 mM dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) ont été préparées. Les essais ont été réalisés dans du tampon PBS, pH 7.4. Dans 500 μl de PBS et en présence de ZnCl_2 10 mM, 5 μl de substrat (solution stock) ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 1 mM de substrat. Les échantillons ont été dosés en différentes quantités soient 5, 10 et 20 μl pour une durée d'incubation variant de 2 à 3 h et 12 à 15 h à 37°C. Les réactions ont été arrêtées avec 1.5 ml de PBS dans les cas où la fluorescence était mesurée ou avec 500 μl de PBS pour les mesures de densité optique à 400 nm.

TABLEAU II

**Substrats utilisés pour le dosage enzymatique de GP56 dans les cellules COS
transfectées avec pCMV-GP56.**

Liste des substrats et de l'activité enzymatique reliée utilisés pour le dosage de GP56 dans les homogénats et milieux de culture des cellules COS transfectées avec le vecteur pCMV-GP56.

SUBSTRATS	TYPE D'ACTIVITÉ
Butirate-pNPH	Estérase/lipase
CBZ-Arg-pNA	Trypsine
CBZ-Gly-Gly-Leu-pNA	Endopeptidase
CBZ-Phe-Leu	Carboxypeptidase A
CBZ-Phe-pNA	Élastase
H-Ala-AMC	Aminopectidase M
H-Arg-AMC	Aminopectidase B
H-Glu-AMC	Aminopectidase A
H-Gly-AMC	Aminopectidase
H-Leu-AMC	Aminopectidase M
H-Lys-AMC	Aminopectidase M
H-Phe-AMC	Aminopectidase M
Suc-Leu-Tyr-AMC	Endopeptidase de type calpaïne
Suc-Phe-Leu-Phe-pNA	Carboxypeptidase G

3.0 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Purification de GP56 par colonne d'affinité d'agarose-Phe-Leu.

La protéine GP56 a été découverte lors de la purification de la cathepsine A par affinité. La cathepsine A a été purifiée à partir d'extraits d'homogénats de placentas humains en utilisant une colonne d'affinité de Phe-Leu lié à un gel d'agarose selon la méthode de Pshezhetsky *et al.* (1994). La fraction éluée de cette colonne a été appliquée sur une colonne échangeuse d'anions (FPLC Mono-Q) qui donne trois pics majeurs de protéines (Figure 2) dont la composition a été analysée par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide (Figure 3). C'est dans les fraction du deuxième pic que la cathepsine A se retrouve avec ses deux sous-unités de 30 et 20 kDa alors que le troisième pic contient la protéine appelée I.P.30, pour « γ -interferon induced protein ». Le premier pic est le pic où la cathepsine D est retrouvée (deux sous-unités de 30 et 15 kDa) avec la protéine GP56.

Pour isoler GP56, les fractions couvrant le premier pic ont été recueillies et appliquées sur une colonne de Superose 12 en FPLC qui agit comme un tamis moléculaire. Cette chromatographie donne deux pics (Figure 4) qui ont également été analysés par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide (Figure 5).

La cathepsine D avec ses deux sous-unités a été obtenue dans le deuxième pic alors que GP56 a été éluée dans le premier pic. Les fractions contenant GP56 ont été recueillies et dosées (0.28 mg/ml) puis conservées à -20°C. Environ 50 μ g de GP56 ont été utilisées pour en déterminer la séquence en acides aminés N-terminaux.

FIGURE 2

Profil d'élution des produits des fractions appliquées sur la colonne échangeuse d'anions MonoQ.

Graphique représentant le profil d'élution de l'échantillon post-agarose-Phe-Leu appliqué sur la colonne échangeuse d'anions Mono Q en FPLC. Trois pics majeurs sont observés : I) GP56 en présence de cathepsine D, II) la cathepsine A et III) I.P.30. Le profil représente l'absorbance à 280 nm.

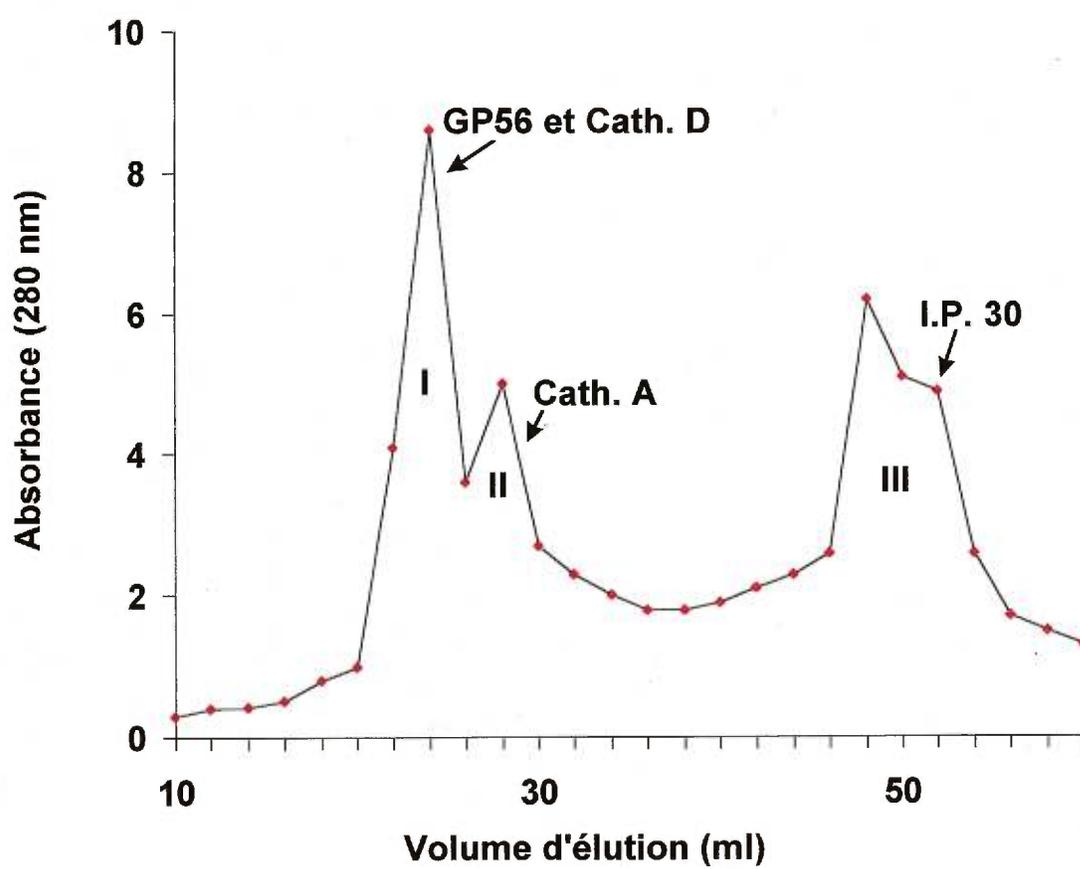
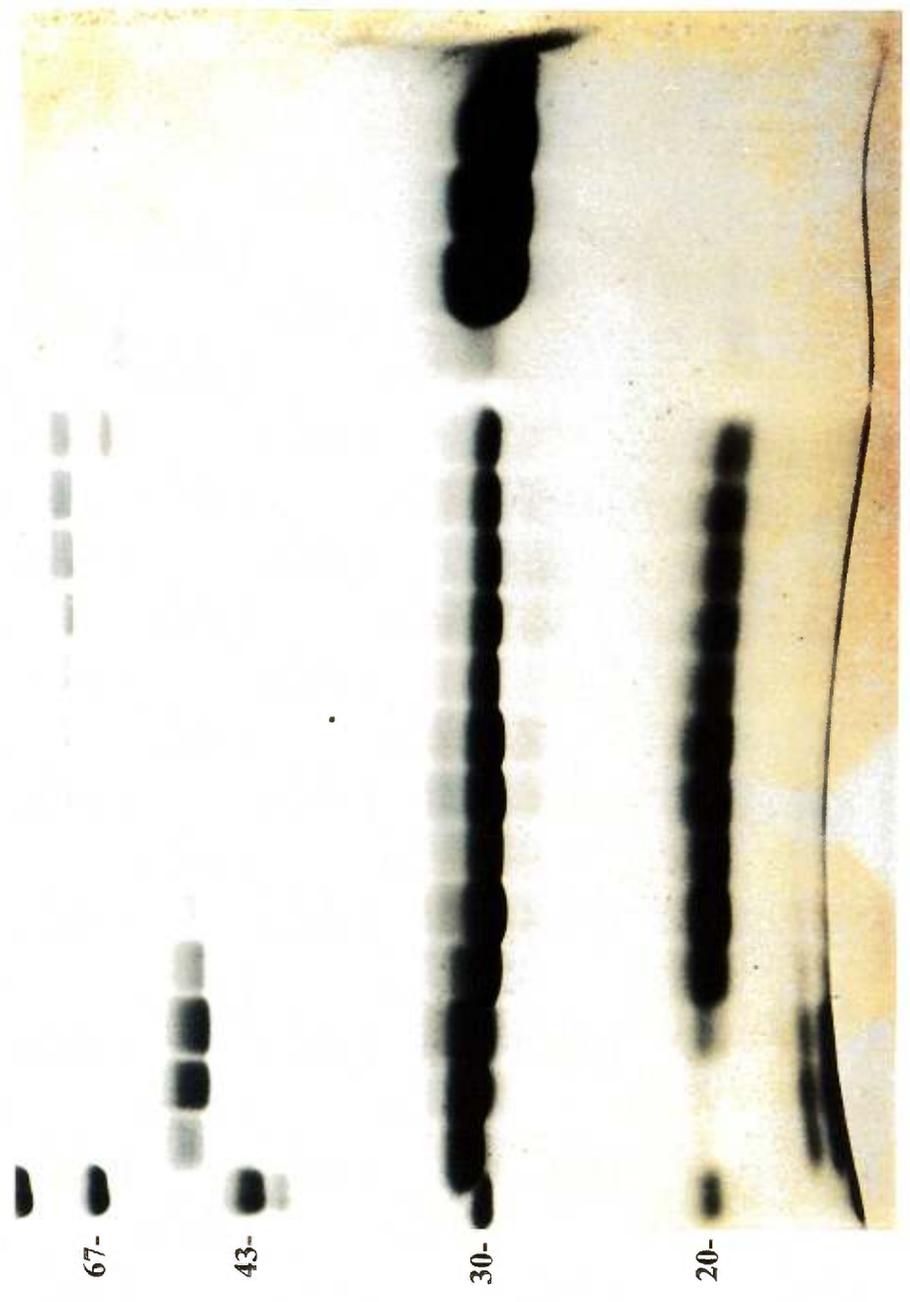


FIGURE 3

Analyse en gel de SDS-polycrylamide des produits élués de la colonne Mono Q.

Analyse des produits des fractions éluées de la colonne échangeuse d'anions Mono Q en FPLC en gel de SDS-polyacrylamide 11% selon la méthode de Laemmli (1970). Le gel a été coloré au bleu de Coomassie. Mr, marqueurs de poids moléculaire ; 1-3, les fractions contenant GP56 et la cathepsine D ; 4-13, les fractions contenant la cathepsine A ; 14-16, les fractions contenant I.P.30.



Mr 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
(kDa)

FIGURE 4**Profil d'élution des produits des fractions 2-5 appliquées sur
la colonne Superose 12 en FPLC.**

Graphique du profil d'élution des fractions 2-5 contenant GP56 et la cathepsine D sur la colonne Superose 12 en FPLC. Les protéines appliquées avaient été éluées de la colonne Mono Q avant d'être séparées par tamisage moléculaire. Le profil d'élution représente l'absorbance des protéines à 280 nm. Deux pics sont observés : I) GP56 et II) La cathepsine D.

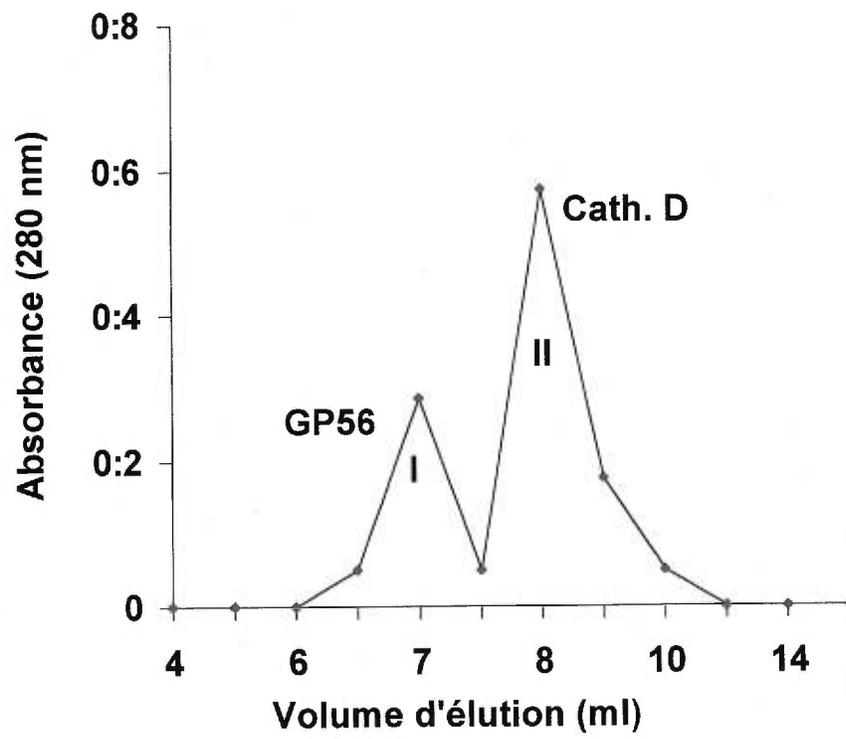
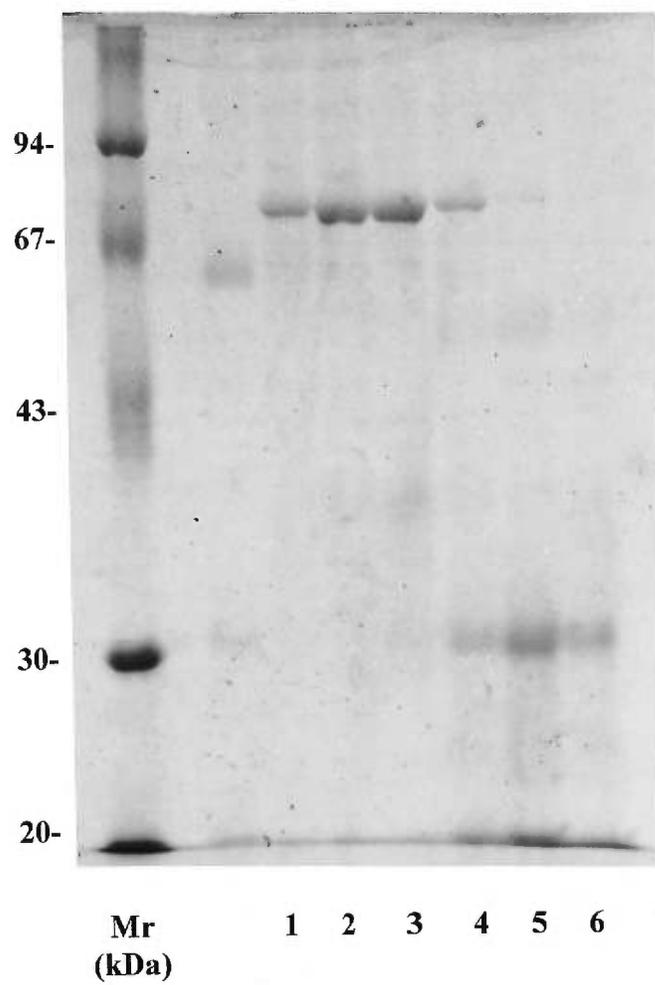


FIGURE 5

Analyse des fractions éluées de la colonne Superose 12 en FPLC.

L'analyse des fractions éluées de la colonne Superose 12 en FPLC a été réalisée par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11% selon la technique de Laemmli (1970). Le gel a été coloré au bleu de Coomassie. Lignes 1-4, fractions contenant GP56 ; 5-6, fractions contenant la cathepsine D.



3.2 Séquence de GP56.

La séquence N-terminale des 20 premiers acides aminés obtenue par la méthode de dégradation d'Edman a été utilisée pour chercher dans la banque de données GenBank une séquence en acides aminés ou ADN correspondante avec l'aide du serveur de biologie moléculaire ExPASy. Aucune ressemblance avec les séquences protéiques connues à ce moment-là n'a été décelée. Par contre, lors de la vérification dans la banque de données EST-databank, une séquence de cDNA ayant 100% d'identité a été trouvée. Le cDNA correspondant a été obtenu de l'Université de Washington School of Medicine via le consortium I.M.A.G.E.. Les séquences de 1.62 kb en nucléotides et en acides aminés sont présentées à la figure 6.

GP56 est synthétisé sous forme d'un précurseur de 61 kDa (541 acides aminés) et on détecte la présence d'un site de clivage du peptide signal au 24^{ième} acide aminé (Cys 24-Lys 25) selon l'analyse avec le programme Swiss-Prot. Le point isoélectrique théorique a été estimé à 7.4 en tenant compte de la séquence en acides aminés. La présence des sucres peut altérer sensiblement cette valeur.

L'analyse a également permis l'identification de cinq sites de N-glycosylation potentiels reliés à des résidus asparagine (Figure 6). Nous savons déjà que GP56 est glycosylée puisque elle se lie à la colonne d'affinité de concanavaline A-Sepharose.

Parmi les autres sites potentiels identifiés par l'analyse bioinformatique, il en existe un qui pourrait être impliqué dans la phosphorylation de GP56 dépendante de cAMP et cGMP en position 161-164 ainsi que quatre autres reliés à une phosphorylation par la protéine kinase C (19-21, 29-31, 327-329 et 378-380). Ces sites de phosphorylation indiquent que GP56 pourrait être un enzyme dont l'activité est contrôlée par un système de phosphorylation/déphosphorylation des résidus Ser et Thr.

La localisation chromosomique du gène de GP56 a été réalisée grâce au programme UNIGENE qui consiste en une banque de séquences qui ont déjà été localisées sur les chromosomes humains. Le gène de GP56 a été localisé sur le chromosome 8 chez l'humain. Le gène est localisé entre les marqueurs D8S270 et D8S257. GP56 correspond au marqueur étant identifié Cda01e07. Peu de gènes ont été identifiés dans cette région du chromosome, mais on retrouve deux gènes de phosphatidylsérine synthases I et un gène codant pour la protéine L30 de la sous-unité 60S du ribosome.

FIGURE 6

Séquence de GP56.

Séquences en nucléotides et en acides aminés de GP56. La séquence du cDNA a été obtenue via le consortium I.M.A.G.E. à partir du clone 30142. La traduction en acides aminés et l'analyse de cette séquence ont été réalisées grâce au programme ScanProsite du serveur ExPASy.

(—) :Peptide signal de GP56 avec site de clivage au 24^e acide aminé (C 24- K 25)

(—) :Séquence N-terminale de 20 acides aminés obtenue par séquençage de GP56

(N*) :Les résidus asparagine des potentiels sites de glycosylation

-24
1

CAA GAA AAC CAA CTG GAA AAA AAA ATG AAA TTC CTT ATC TTC GCA TTT TTC GGT GGT GTT 36
M K F L I F A F F G G V 12

CAC CTT TTA TCC CTG TGC TCT GGG AAA GCT ATA TGC AAG AAT GGC ATC TCT AAG AGG ACT 96
H L L S L C S G K A I C K N G I S K R T 32

TTT GAA GAA ATA AAA GAA GAA ATA GCC AGC TGT GGA GAT GTT GCT AAA GCA ATC ATC AAC 156
F E E I K E E I A S C G D V A K A I I N 52

CTA GCT GTT TAT GGT AAA GCC CAG AAC AGA TCC TAT GAG CGA TTG GCA CTT CTG GTT GAT 216
L A V Y G K A Q N* R S Y E R L A L L V D 72

ACT GTT GGA CCC AGA CTG AGT GGC TCC AAG AAC CTA GAA AAA GCC ATC CAA ATT ATG TAC 276
T V G P R L S G S K N L E K A I Q I M Y 92

CAA AAC CTG CAG CAA GAT GGG CTG GAG AAA GTT CAC CTG GAG CCA GTG AGA ATA CCC CAC 336
Q N L Q Q D G L E K V H L E P V R I P H 112

TGG GAG AGG GGA GAA GAA TCA GCT GTG ATG CTG GAG CCA AGA ATT CAT AAG ATA GCC ATC 396
W E R G E E S A V M L E P R I H K I A I 132

CTG GGT CTT GGC AGC AGC ATT GGG ACT CCT CCA GAA GGC ATT ACA GCA GAA GTT CTG GTG 456
L G L G S S I G T P P E G I T A E V L V 152

GTG ACC TCT TTC GAT GAA CTG CAG AGA AGG GCC TCA GAA GCA AGA GGG AAG ATT GTT GTT 516
V T S F D E L Q R R A S E A R G K I V V 172

TAT AAC CAA CCT TAC ATC AAC TAC TCA AGG ACG GTG CAA TAC CGA ACG CAG GGG GCG GTG 576
Y N Q P Y I N* Y S R T V Q Y R T Q G A V 192

GAA GCT GCC AAG GTG GGG GCT TTG GCA TCT CTC ATT CGA TCC GTG GCC TCC TTC TCC ATC 636
E A A K V G A L A S L I R S V A S F S I 212

TAC AGT CCT CAC ACA GGT ATT CAG GAA TAC CAG GAT GGC GTG CCC AAG ATT CCA ACA GCC 696
Y S P H T G I Q E Y Q D G V P K I P T A 232

TGT ATT ACG GTG GAA GAT GCA GAA ATG ATG TCA AGA ATG GCT TCT CAT GGG ATC AAA ATT 756
C I T V E D A E M M S R M A S H G I K I 252

GTC ATT CAG CTA AAG ATG GGG GCA AAG ACC TAC CCA GAT ACT GAT TCC TTC AAC ACT GTA 816
V I Q L K M G A K T Y P D T D S F N T V 272

GCA GAG ATC ACT GGG AGC AAA TAT CCA GAA CAG GTT GTA CTG GTC AGT GGA CAT CTG GAC 876
A E I T G S K Y P E Q V V L V S G H L D 292

AGC TGG GAT GTT GGG CAG GGT GCC ATG GAT GAT GGC GGT GGA GCC TTT ATA TCA TGG GAA 936
S W D V G Q G A M D D G G G A F I S W E 312

GCA CTC TCA CTT ATT AAA GAT CTT GGG CTG CGT CCA AAG AGG ACT CTG CGG CTG GTG CTC 996
A L S L I K D L G L R P K R T L R L V L 332

TGG ACT GCA GAA GAA CAA GGT GGA GTT GGT GCC TTC CAG TAT TAT CAG TTA CAC CAG GTA 1056
W T A E E Q G G V G A F Q Y Y Q L H K V 352

AAT ATT TCC AAC TAC AGT CTG GTG ATG GAG TCT GAC GCA GGA ACC TTC TTA CCC ACT GGG 1116
 N* I S N* Y S L V M E S D A G T F L P T G 372

CTG CAA TTC ACT GGC AGT GAA AAG GCC AGG GCC ATC ATG GAG GAG GTT ATG AGC CTG CTG 1176
 L Q F T G S E K A R A I M E E V M S L L 392

CAG CCC CTC AAT ATC ACT CAG GTC CTG AGC CAT GGA GAA GGG ACA GAC ATC AAC TTT TGG 1236
 Q P L N* I T Q V L S H G E G T D I N F W 412

ATC CAA GCT GGA GTG CCT GGA GCC AGT CTA CTT GAT GAC TTA TAC AAG TAT TTC TTC TTC 1296
 I Q A G V P G A S L L D D L Y K Y F F F 432

CAT CAC TCC CAC GGA GAC ACC ATG ACT GTC ATG GAT CCC AGC AGA TGG ATG TTG CTG CTG 1356
 H H S H G D T M T V M D P S R W M L L L 452

CTG TTT GGG CTG TTG TTT CTT ATG TTG TTG CAG ACA TGG AAG AAA TGC TGC CTA GGT CCT 1416
 L F G L L F L M L L Q T W K K C C L G P 472

AGA AAC AGT AAG AAA GAA ACG TTT TCA TGC TTC TGG CCA GGG ATC CTG GGT CTG CAA CTT 1476
 R N S K K E T F S C F W P G I L G L Q L 492

TGG AAA ACT CCT CTT CAC ATA ACA ATT TCA TCC AAT TCA TCT TCA AAG CAC AAC TCT ATT 1536
 W K T P L H I T I S S N S S S K H N S I 512

TCA TGC TTT CTG TTA TTA TCT TTC TTG ATA CTT TCC AAA TTC TCT GAT TCT AGA AAA AGG 1596
 S C F L L L S F L I L S K F S D S R K R 532

AAT CAT TCT CCC CTC CCT CCC ACC ACA TAG AAT CAA CAT ATG GTA GGG ATT ACA GTG GGG 1656
 N H S P L P P T T • 541

GCA TTT CTT TAT ATC ACC TCT TAA AAA CAT TGT TTC CAC TTT AAA AGT AAA CAC TTA ATA 1716
 AAT TTT TGG AAG ATC TCT GAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAN AAA TTN CCT GCG 1770

3.3 Détection de l'ARNm de GP56.

L'ARNm correspondant à GP56 dans les tissus a été détecté par buvardage northern après électrophorèse en gel d'agarose de l'ARN total de deux tissus humains: le placenta et les fibroblastes cutanés en culture. Le clone 30142 a été utilisé comme sonde et détecte un signal d'hybridation correspondant à un mRNA de 1.6 Kb pour le placenta ainsi que pour les fibroblastes (Figure 7). Puisque le signal est unique, le gène de GP56 ne semble pas être épissé de façon variable dans ces deux tissus. Il pourrait cependant exister des formes mineures qui ne seraient pas détectées dans nos conditions expérimentales.

3.4 Production d'anticorps anti-GP56.

Initialement, les anticorps anti-GP56 ont été préparés contre la protéine purifiée du placenta humain. La première injection faite au lapin a été réalisée en utilisant environ 100 µg de GP56 purifiée, mais la purification de GP56 étant longue et laborieuse, nous avons mis au point un moyen plus rapide pour assurer une bonne amplification de la réponse immunitaire. Une protéine de fusion avec la GST a donc été exprimée dans *E. coli* et purifiée. Un fragment de 25 kDa de GP56 (Arg 125 à Leu 320) a été fusionné à la GST dans le vecteur pGEX2T pour produire une protéine de 48 kDa. La protéine de fusion a été purifiée sur un gel d'affinité pour la GST (Figure 8). Environ 175 µg de la protéine de fusion purifiée ont été obtenus et utilisés pour les deux injections de rappel. Le sérum a été récupéré 40 jours après la première injection et a été titré avec de la GP56 pure à une dilution de 1 :10 000 avec une très bonne spécificité tel que déterminée par immunobuvardage de type « dot blot ».

FIGURE 7

Détection de l'ARNm de GP56

La détection de l'ARNm de GP56 a été réalisé par northern blot utilisant la séquence de GP56 provenant du clone 30142 comme sonde radioactive marquée au dCTP³². L'analyse a été réalisée sur l'ARN total de placenta humain et de fibroblastes humains (10 µg).

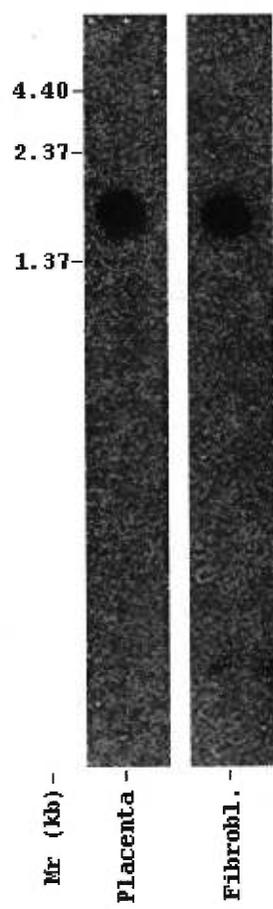
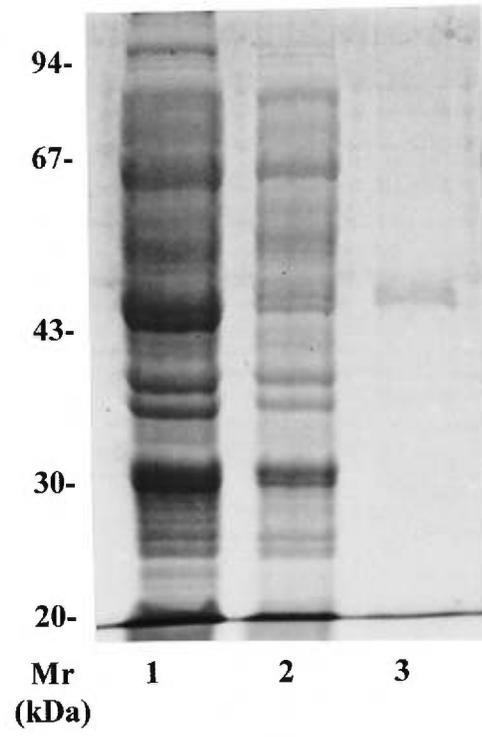


FIGURE 8

Purification de la protéine de fusion GP56-GST.

L'analyse des fractions lors de la purification de la protéine de fusion GP56-GST par chromatographie d'affinité à l'aide de Sepharose-glutathione a été réalisée par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11% selon la méthode de Laemmli (1970). Le gel a été coloré au bleu de Coomassie. Ligne 1, surnageant avant application sur le gel d'affinité ; ligne 2, surnageant après application sur le gel d'affinité ; ligne 3, fraction contenant la protéine de fusion GP56-GST éluée de la colonne d'affinité par un tampon de glutathione réduit 10 mM dans du Tris 50 mM, pH 8.0.



3.5 Expression de pCMV-GP56 dans les cellules COS.

Le vecteur d'expression pCMV-GP56 a été introduit dans des cellules de type COS-1 par la méthode de lipofection. Les cellules ont été cultivées durant 30 h pour ensuite être analysées par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide suivi d'un immunobuvardage (Figure 9).

Deux témoins ont été réalisés lors des transfections. Le premier consistait en une transfection avec le vecteur d'expression pCMV- β -gal et le deuxième à exposer les cellules à la lipofectAMINE seule (liposomes utilisés). Les cellules transformées par le vecteur pCMV- β -gal ont été employées comme indicateur de l'efficacité de transfection en dosant l'activité de la β -galactosidase dans les homogénats de cellules transfectées. On observe dans ces cellules une activité β -galactosidasique (80.41 ± 0.08 mU/mg) à pH 7.5, environ 40 fois supérieure à celle des cellules transfectées par pCMV-GP56 (2.57 ± 0.04 mU/mg) et des cellules exposées à la lipofectAMINE (2.49 ± 0.05 mU/mg). Dans tous les milieux de culture, le même taux d'activité β -galactosidasique a été mesuré permettant ainsi de démontrer que les cellules mortes ou détachées du flacon n'influencent pas les données.

Un signal unique de masse moléculaire similaire à GP56 a été détecté par immunobuvardage dans les cellules transfectées par pCMV-GP56 alors qu'aucun signal n'a été observé dans les cellules témoins (Figure 9). À en juger par la masse moléculaire apparente de GP56, il semble que la glycosylation de la protéine s'effectue de la même façon dans les cellules transfectées que dans le placenta.

On observe aussi que GP56 est excrétée en quantités importantes dans le milieu de culture des cellules transfectées. Un faible signal a été détecté par immunobuvardage (Figure 10) dans le milieu de culture des cellules témoins (MC) alors qu'un signal beaucoup plus intense est observé dans le milieu des cellules transfectées avec le vecteur pCMV-GP56 (M56).

3.6 Marquage métabolique de GP56 (pulse-chase).

La maturation de GP56 a été étudiée par immunoprécipitation d'homogénats de cellules COS transfectées au préalable avec le vecteur pCMV-GP56 et cultivées pendant 30 h. Le marquage des protéines a été fait en utilisant la méthionine marquée au ^{35}S comme précurseur radioactif. Au début, GP56 est synthétisée sous forme unique d'un précurseur d'environ 62 kDa (ligne 1, Figure 11). Environ 1 h après le marquage, apparaît une bande de faible intensité d'une masse moléculaire de 56 kDa qui s'intensifie dans le temps. Ce signal correspond à la protéine mature retrouvée à l'intérieur des cellules. Le signal du précurseur diminue après 24 h alors que le signal de 56 kDa est plus intense que précédemment.

FIGURE 9

Expression du vecteur pCMV-GP56 dans des cellules eucaryotes.

Analyse des extraits de cellules COS-1 suite à la transfection avec le vecteur pCMV-GP56. Les cellules ont été cultivées pendant 30 h. L'analyse a été faite par immunobuvardage suite à une électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11%. Les anticorps anti-GP56 ont été utilisés dans une dilution de 1 :10 000 et les anticorps anti-IgG de lapins ont été utilisés dans une dilution de 1 :5 000. La détection des signaux a été obtenue par chemiluminescence (Bronstein *et al.* 1989).

- 1) Extrait de placenta (contrôle positif)
- 2) Extrait de cellules COS transfectées avec pCMV-GP56 (20 µg)
- 3) Extrait de cellules COS transfectées avec pCMV-GP56 (10 µg)
- 4) Extrait de cellules COS transfectées avec pCMV-βgal (20 µg)
- 5) Extrait de cellules COS transfectées avec pCMV-βgal (10 µg)
- 6) Extrait de cellules COS non-transfectées (20 µg)
- 7) Extrait de cellules COS non-transfectées (10 µg)

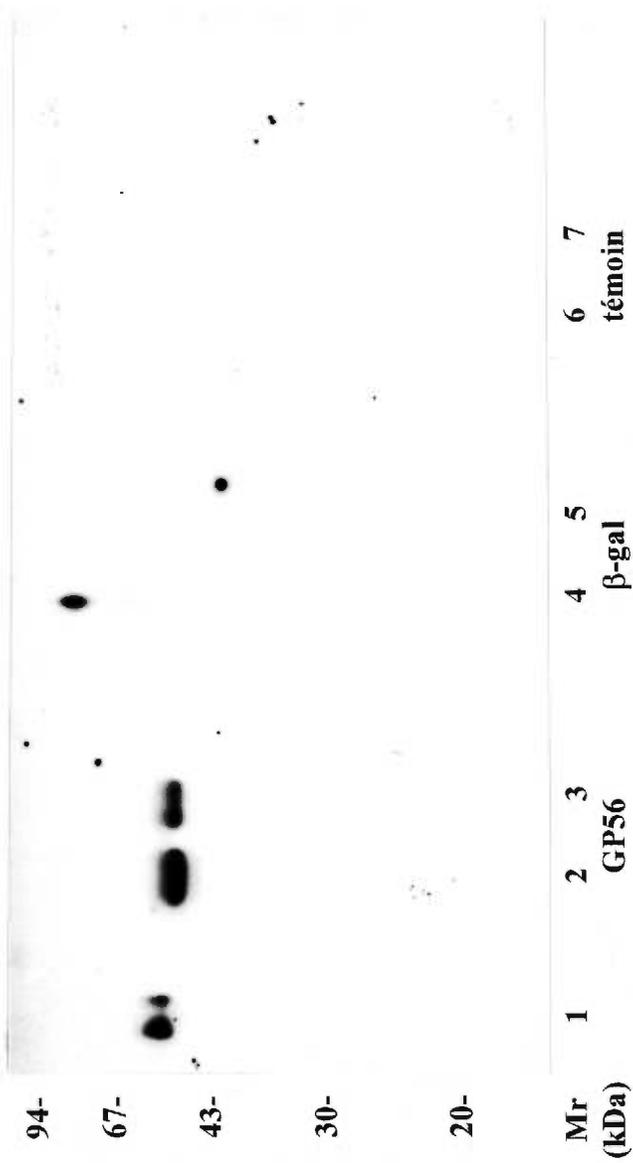


FIGURE 10

Analyse des milieux de culture des cellules COS transfectées avec pCMV-GP56.

Suite à une transfection avec pCMV-GP56, les cellules ont été cultivées pendant 30 h, les milieux de culture des cellules COS ont été analysés par immunobuvardage suite à une électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11%. Les anticorps anti-GP56 ont été utilisés dans une dilution de 1 :10 000 et les anticorps anti-IgG de lapins ont été utilisés dans une dilution de 1 :5 000. La chemiluminescence (Bronstein *et al.* 1989) a été le moyen de visualisation des résultats. Ligne MC, milieu de culture des cellules COS transfectées avec pCMV- β gal (20 μ g) ; ligne M56, milieu de culture des cellules COS transfectées avec pCMV-GP56 (20 μ g).

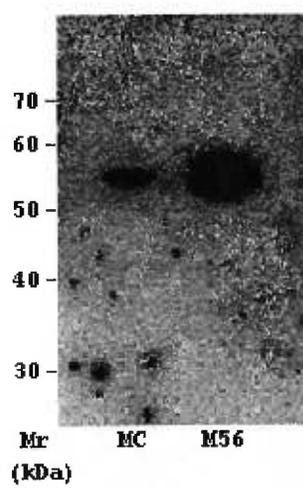
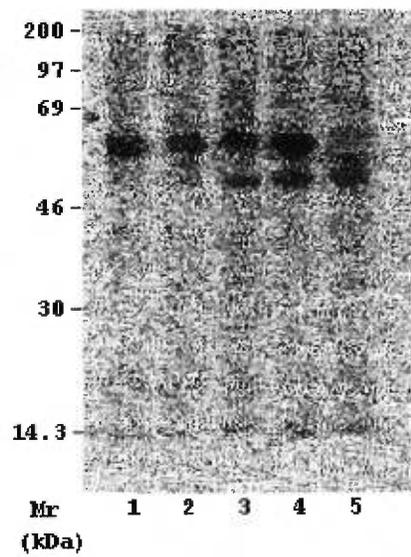


FIGURE 11

Etude de la maturation de GP56.

L'essai a été réalisé sur des cellules COS transfectées avec le vecteur pCMV-56 et cultivées pendant 30 h. Suite à la transfection, de la [³⁵S]-méthionine a été ajoutée au milieu pour marquer les protéines pendant 1 heure, 3 h, 6 h et 24 h. Celles-ci ont été récupérées par immunoprécipitation et les fractions ont été analysées par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11%. Les résultats ont été visualisés par phosphoimager.

- 1) T = 40 min (marquage)
- 2) T = 1 h (chasse)
- 3) T = 3 h (chasse)
- 4) T = 6 h (chasse)
- 5) T = 24 h (chasse)



3.7 Localisation intracellulaire de GP56.

Comme il a été mentionné plus tôt, la localisation intracellulaire d'une protéine se veut une information importante permettant de proposer la fonction biologique d'une protéine. La technique de l'immunocytofluorescence en utilisant les anticorps anti-GP56 couplés à la rhodamine a été utilisée sur des fibroblastes cutanés humains en culture. Les résultats obtenus (Figure 12) démontrent une répartition de type vésiculaire. Ces vésicules observées pourraient être des vésicules de sécrétion puisqu'elles sont distribuées de façon aléatoire à l'intérieur de la cellule contrairement aux organites cellulaires qui sont localisés de façon très spécifique.

Afin de vérifier cette hypothèse, des fibroblastes cutanés humains en culture ont été analysés par microscopie électronique en utilisant des anticorps couplés à l'or colloïdal (Figure 13). La figure 13a montre des fibroblastes marqués par les anticorps anti-GP56 à une dilution de 1 :100 où il est possible de voir un signal à l'intérieur de vésicules localisées près de la membrane cellulaire. Les cellules témoins mises en présence de sérum de lapin à une dilution de 1 :10, soit 10 fois supérieure à la dilution de l'anticorps anti-GP56 ne présentent pas ce signal (Figure 13b).

FIGURE 12

Localisation intracellulaire de GP56 par immunocytofluorescence.

La localisation intracellulaire a été réalisée par immunocytofluorescence sur des cellules de type fibroblastes humains. Les anticorps anti-GP56 ont été utilisés dans une dilution de 1 :100. L'anticorps couplé à la rhodamine a été utilisé dans une dilution de 1 :100 (Baker *et al.* 1981). Les résultats ont été visualisés à l'aide d'un microscope Zeiss Axioskop.

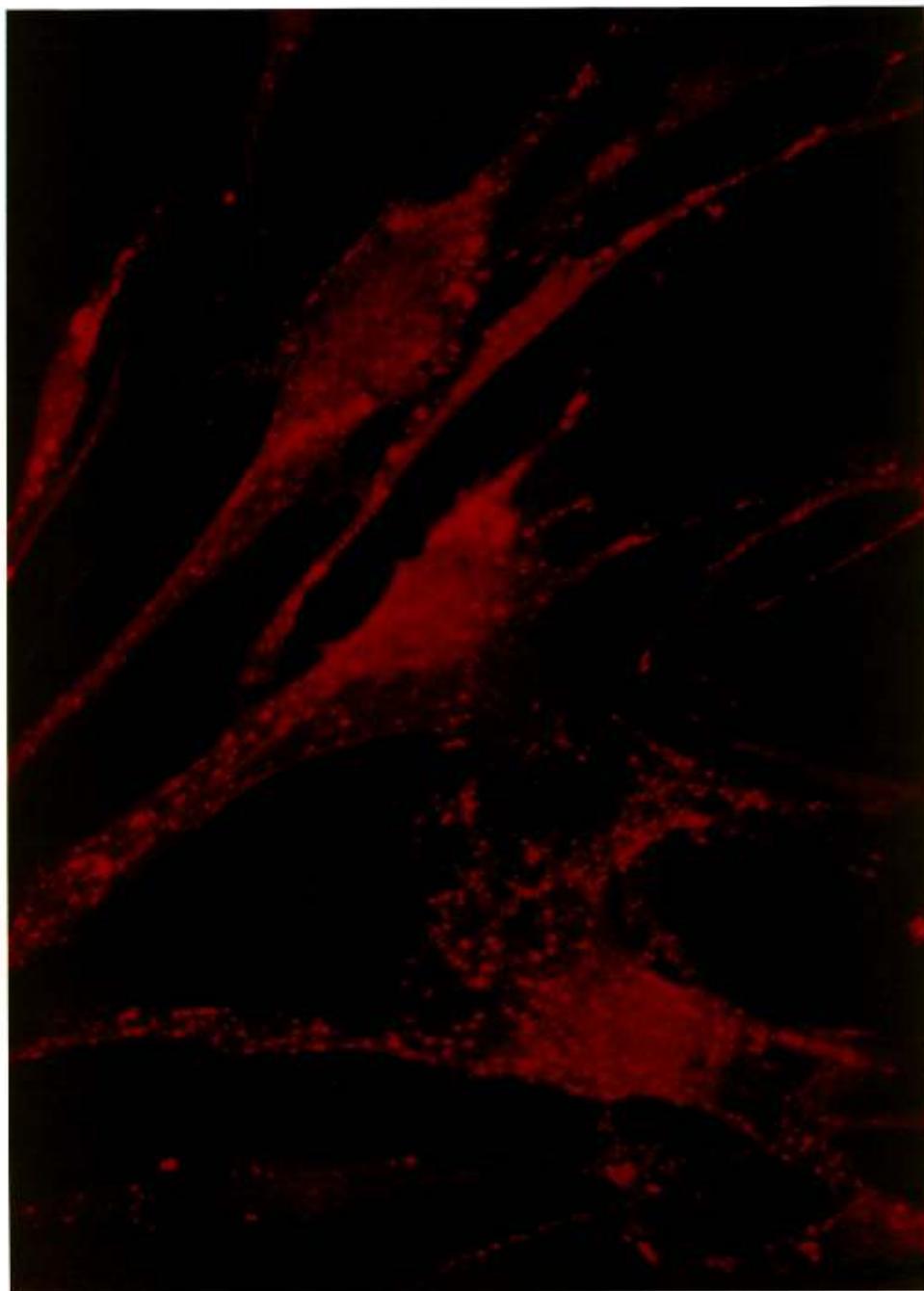
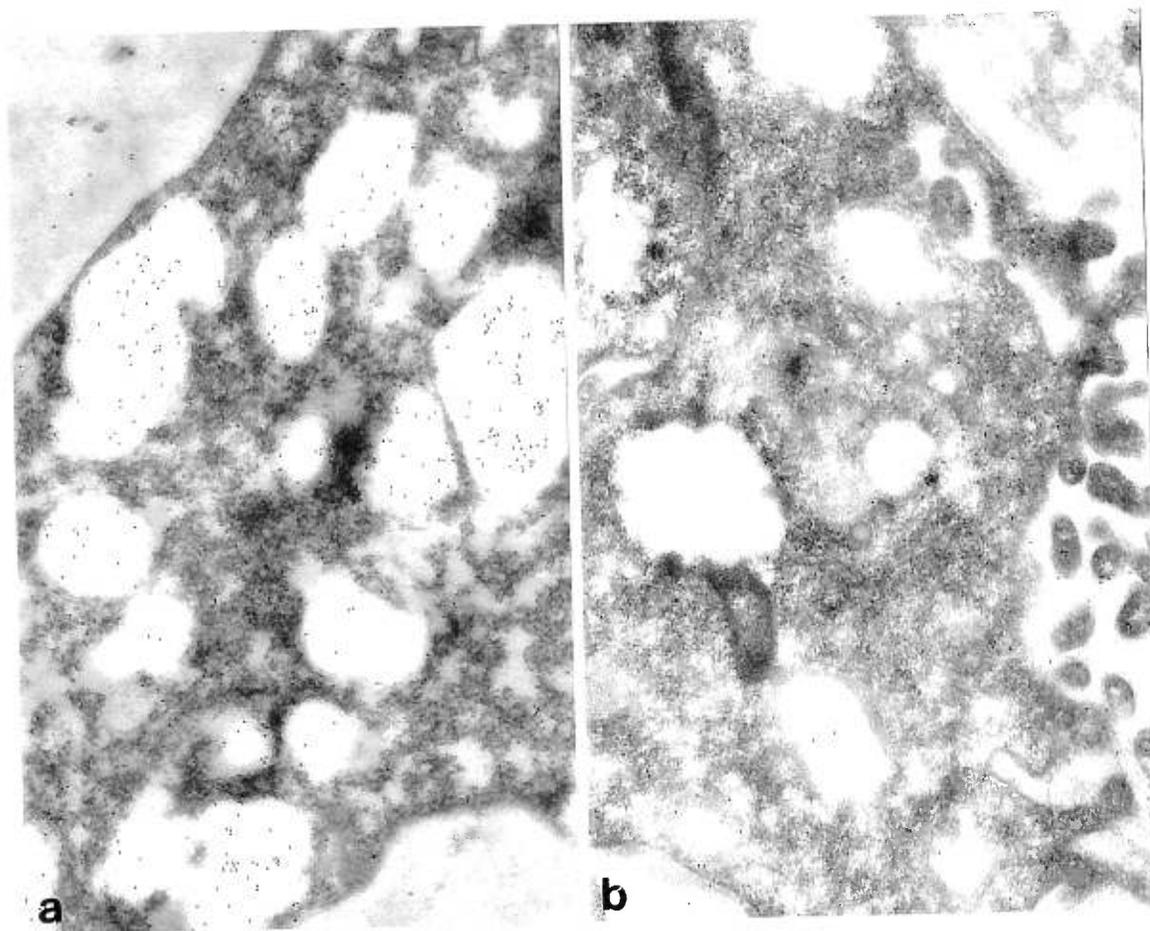


FIGURE 13

Localisation intracellulaire de GP56 par microscopie électronique.

La localisation intracellulaire de GP56 a été faite par le Dr Carlos Morales de l'Université McGill selon la méthode de Hermo *et al.* 1991. Ceci a été réalisé sur des cellules humaines de type fibroblastes. L'anticorps anti-GP56 a été utilisé dans une dilution de 1 :100. Les anticorps anti-IgG de lapins couplés à l'or colloïdal ont été utilisés pour identifier la localisation de GP56. Les résultats ont été visualisés sur un microscope électronique Philips 400. a) Fibroblastes mis en présence des anticorps anti-GP56. b) Fibroblastes mis en présence de sérum de lapin (témoin).



3.8 Distribution tissulaire de GP56.

GP56 a été purifiée à partir du placenta humain, mais elle est aussi distribuée dans d'autres tissus humains. Cette étude a été réalisée par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide d'homogénats de divers tissus suivi d'un immunobuvardage avec l'anticorps anti-GP56.

Le signal le plus intense a été obtenu dans l'extrait d'homogénat de placenta (Figure 14), mais il a également été observé dans les fractions d'homogénats de reins, de muscle, de fibroblastes ainsi que du foie (Figure 14). Cependant, le signal n'est pas détectable dans le cerveau et les globules blancs.

La présence de GP56 a aussi été déterminée dans le sang foetal recueilli du placenta ainsi que dans du sang d'adulte (Figure 15). Au niveau du sang adulte, le signal le plus intense provient du plasma. Un faible signal est observé dans la fraction des globules blancs, mais ce signal semble plutôt relié à une contamination par du plasma. Nous concluons que GP56 est localisé dans le plasma sanguin. Nous proposons donc que GP56 est une protéine sécrétée dans le plasma.

FIGURE 14

Distribution tissulaire de GP56.

L'analyse d'extraits de tissus humains a été réalisée par immunobuvardage après une électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11%. Les anticorps anti-GP56 ont été utilisés dans une dilution de 1 :10 000 alors que les anticorps anti-IgG de lapins ont été utilisés dans une dilution de 1 :5 000. Les résultats ont été visualisés par chemiluminescence.

- 1) Extrait de placenta (20 µg)
- 2) Extrait de cerveau (20 µg)
- 3) Extrait de reins (20 µg)
- 4) Extrait de muscle (20 µg)
- 5) Extrait de globules blancs (20 µg)
- 6) Extrait de fibroblastes (20 µg)
- 7) Extrait de foie (20 µg)

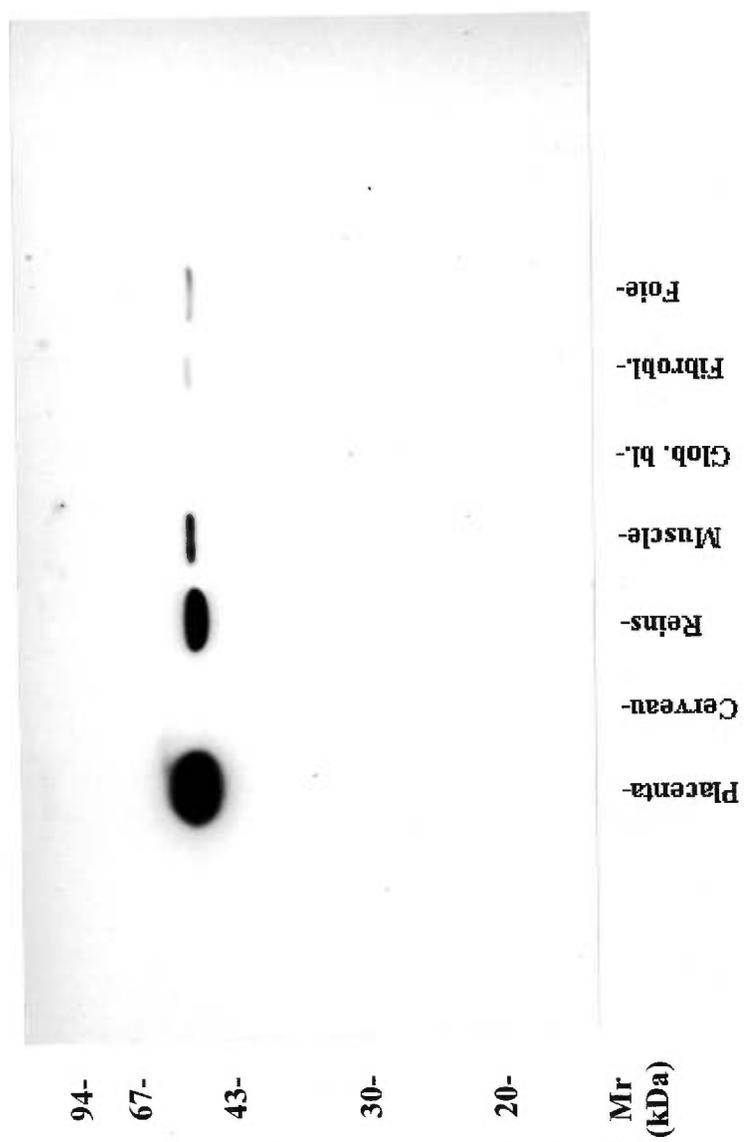
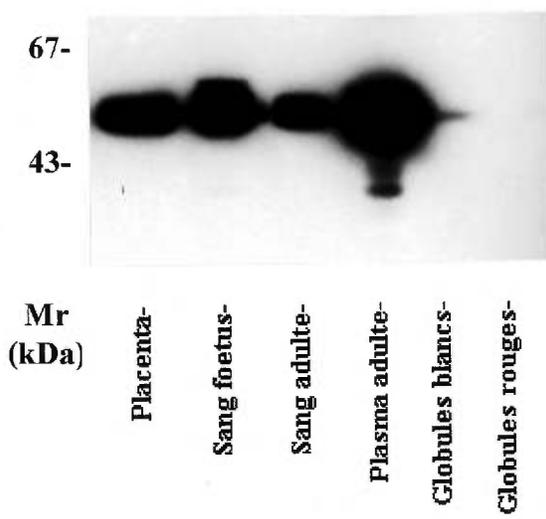


FIGURE 15

Distribution de GP56 dans le sang.

L'analyse des composantes du sang humain a été réalisée par immunobuvardage après une électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11%. Les anticorps anti-GP56 ont été utilisés dans une dilution de 1 :10 000 alors que les anticorps anti-IgG de lapins ont été utilisés dans une dilution de 1 :5 000. Les résultats ont été visualisés par chemiluminescence.

- 1) Extrait de placenta (20 μ g)
- 2) Sang total de foetus (20 μ g)
- 3) Sang total d'adulte (20 μ g)
- 4) Plasma adulte (20 μ g)
- 5) Extrait de globules blancs (20 μ g)
- 6) Extrait de globules rouges (20 μ g)



3.9 Déglycosylation de GP56.

L'affinité de GP56 pour le gel de con A suggère qu'il s'agit d'une glycoprotéine. De plus, elle possède cinq sites potentiels de glycosylation. Pour estimer la quantité de sucres liés, la déglycosylation de GP56 a été effectuée par traitement à la N-glycosidase F qui a la capacité de couper les oligosaccharides liés à des résidus d'Asn.

Trois échantillons ont été traités avec cette enzyme : un extrait de placenta, une fraction pure de GP56 et une petite quantité de plasma (Figure 16). Dans les trois cas, la protéine a une masse moléculaire d'environ 56 kDa avant le traitement alors qu'après le traitement à la N-glycosidase F, la masse diminue à environ 52 kDa (estimée en gel de SDS-polyacrylamide).

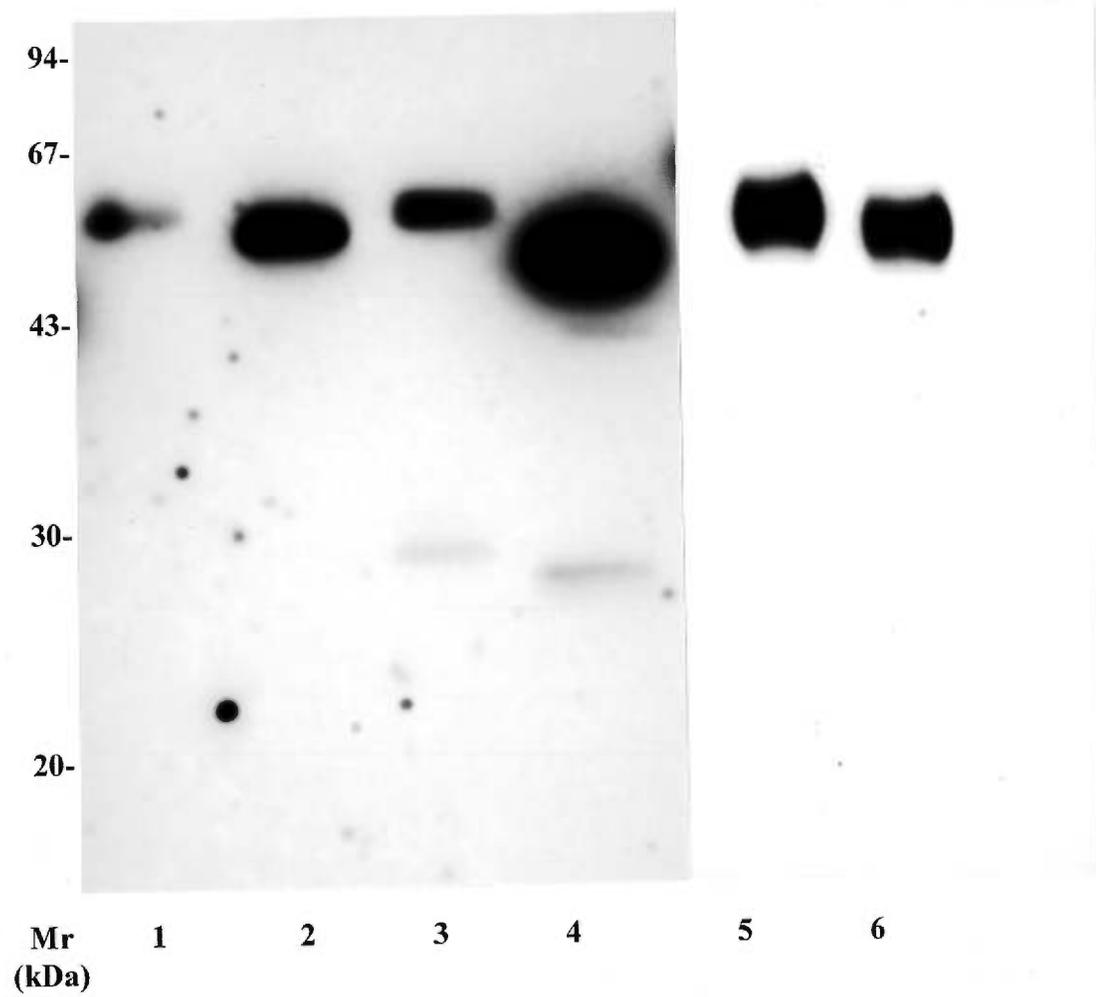
La différence entre la forme glycosylée et déglycosylée est donc d'environ 4 kDa. Cette différence de masse représente l'équivalent d'environ 2 chaînes oligosaccharidiques. Le signal détecté dans la fraction de plasma semble définitivement être dû à GP56 puisque la différence de masse moléculaire est la même que dans le cas des fractions provenant de placenta (purifiées ou extraits crus).

FIGURE 16

Déglycosylation de GP56.

Les échantillons ont été déglycosylés par la N-glycosidase F selon la méthode de Haselbeck et Hösel (1988) et analysés par immunobuvardage après une électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11%. Les anticorps anti-GP56 ont été utilisés dans une dilution de 1 :10 000 alors que les anticorps anti-IgG de lapins ont été utilisés dans une dilution de 1 :5 000. Les résultats ont été visualisés par chemiluminescence.

- 1) Extrait de placenta non traité (40 µg)
- 2) Extrait de placenta traité à la N-glycosidase F (40 µg)
- 3) GP56 pure non traitée (40 µg)
- 4) GP56 pure traitée à la N-glycosidase F (40 µg)
- 5) Plasma non traité (40 µg)
- 6) Plasma traité à la N-glycosidase F (40 µg)

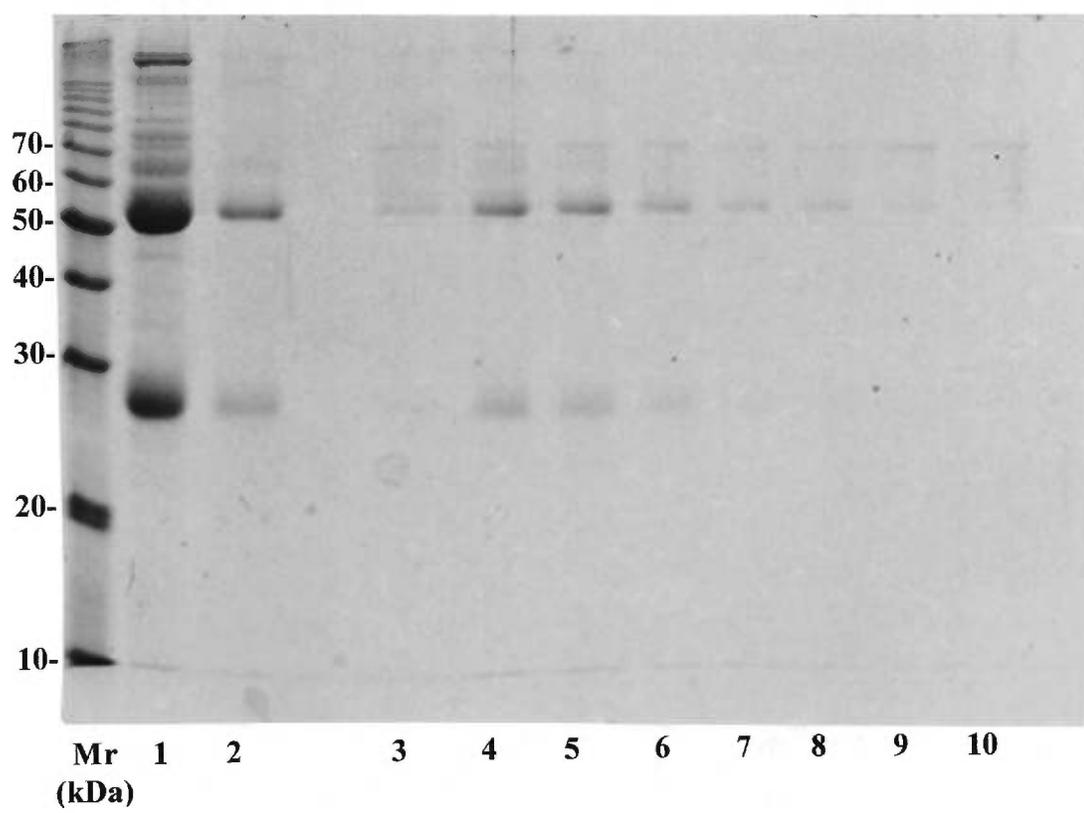


3.10 Purification de GP56 par immunoaffinité à partir du plasma.

Suite à l'observation d'un signal intense dans la fraction de plasma lors des analyses de distribution tissulaire de GP56, un gel d'affinité a été créé à partir d'immunoglobulines anti-GP56 et de Sepharose 4B-activé au CNBr afin de purifier GP56. Les fractions obtenues lors de cette purification ont été analysées en gel de SDS-polyacrylamide (Figure 17). Il est possible de voir que trois protéines seulement sont éluées selon cette méthode. La bande supérieure d'environ 72 kDa correspond au complément C3 (déterminé par séquençage de l'extrémité N-terminale) qui est impliqué dans la réponse immunitaire. En plus de GP56, on observe la présence d'une troisième protéine qui a une masse moléculaire de 27 kDa (évalué sur gel). Lors de l'analyse par immunobuvardage avec les anticorps anti-GP56, seul le signal de GP56 peut être observé. Les fractions contenant GP56 ont été recueillies puis la concentration en protéines a été dosée selon la méthode de Bradford (1976). Il est possible d'obtenir environ 50-60 µg de protéines purifiées à partir de 5 ml de plasma. Lors de la purification par affinité utilisant le gel agarose-Phe-Leu, il est possible de purifier la même quantité sauf que GP56 était pure alors qu'ici, GP56 est en présence de deux autres protéines. Il est important de souligner que la purification selon la méthode utilisant le gel d'affinité d'agarose-Phe-Leu est un long processus difficile alors qu'en utilisant la colonne d'immunoaffinité, le processus est plus rapide. Cette dernière méthode n'est limitée que par la capacité du gel à lier la protéine. De par cette méthode, il est plus facile de purifier une plus grande quantité de GP56 dans les mêmes délais que lors de la méthode impliquant le gel d'agarose-Phe-Leu qui est conçu principalement pour la purification de la cathepsine A.

FIGURE 17**Purification de GP56 à partir de plasma.**

Présentation du profil de purification de GP56 à partir du plasma par immunoaffinité. L'élution des protéines a été effectuée par un tampon glycine 0.2 M, pH 2.3. Les fractions ont été analysées par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide 11% (p/v). Le gel a été coloré au bleu de Coomassie selon la méthode de Laemmli (1970). Ligne 1, surnageant pré-colonne d'immunoaffinité ; 2, surnageant post-colonne d'immunoaffinité ; 3-10, fractions éluées contenant GP56.



3.11 Alignement de séquences entre GP56 et différents enzymes.

La séquence en acides aminés de GP56 a été comparée aux séquences connues dans la banque de données GenBank et la séquence de GP56 a été alignée avec les séquences homologues (Figure 18).

Une des séquences homologues à GP56 fait partie de la famille des protéines ayant une activité aminopeptidasique. Parmi les acides aminés conservés, certains constituent une partie du site actif de l'aminopeptidase (Chevrier *et al.* 1995). Pour cette leucine aminopeptidase d'*aeromonas proteolytica*, neuf acides aminés font partie de son site actif (Figure 19). Parmi ces derniers, His 97, Asp 117, Glu 151, Glu 152 et Asp 179 sont retrouvés chez GP56, ce qui représente un peu plus que 55 % des acides aminés composants le site catalytique. His 97, Asp 117, Asp 179 Glu 152 lient les atomes de zinc du site catalytique. L'autre acide aminé similaire, Glu 151, est impliqué dans l'hydrolyse du substrat de la même façon que le Glu 143 de la thermolysine (Matthews, 1988) ou le Glu 270 de la carboxypeptidase A (Christianson et Lipscomb 1989). Seulement quatre acides aminés du site actif n'ont pas été identifiés chez GP56 : Tyr 225, Phe 244, Phe 248 et His 256 qui est impliqué dans la liaison du zinc (Chevrier *et al.* 1995).

L'alignement avec une histidine-dipeptidase (*Lactobacillus delbrueckii lactis*) et une glutamate-carboxypeptidase (*Pseudomonas sp.*) révèle la similarité avec les mêmes acides aminés qui sont impliqués dans la liaison des atomes de zinc à l'intérieur du site actif.

Pour la carboxypeptidase, deux atomes de zinc sont liés par His 112, Asp 141, Glu 176, Glu 200 et His 385 (Figure 20). Il semble que l'activité carboxypeptidasique de cet enzyme implique l'acide aminé Glu 175 (Roswell *et al.* 1997). Chez GP56, on retrouve les résidus Asp 141, Glu 176 et Glu 175 parmi les acides aminés homologues. La comparaison de la séquence de la dipeptidase avec GP56 et les deux autres enzymes nous indique une homologie avec les acides aminés impliqués dans la liaison des atomes de zinc avec le résidu Asp 120, Asp 121, Glu 154 et Glu 155. La région de séquence (His 290 à Gly 342) correspond aux sites de liaison des atomes de zinc et aux sites catalytiques de la Leu-aminopeptidase, de la Glu-carboxypeptidase et de la His-dipeptidase.

3.12 Dosages enzymatiques de GP56.

Afin de voir si GP56 possède une activité protéolytique, nous avons dosé l'activité enzymatique de fractions de GP56 purifiée à partir du placenta humain ainsi que de GP56 purifiée à partir du plasma humain. Plusieurs type d'activités ont été dosées telles que : aminopeptidase, dipeptidase, endopeptidase, carboxypeptidase et estérase. Le tableau II représente la liste des substrats utilisés.

Nous avons observé une faible activité de type chymotrypsine avec les substrats pour endopeptidases et estérases contenant des acides aminés hydrophobes (Figure 21). Nous avons choisi les deux meilleurs substrats (Succinyl-Leu-Tyr-AMC et Phe-pNPH) pour doser l'activité dans les homogénats et milieux de culture des cellules COS transfectées avec le vecteur pCMV-GP56.

Les résultats (Figure 22) montrent une hausse de l'activité estérasique en présence de Phe-pNPH dans les cellules transfectées avec pCMV-GP56 lorsque comparé avec les cellules témoins ou les cellules transfectées avec le vecteur pCMV- β gal. Nous observons le même résultat à propos des milieux de culture des cellules. Pour le substrat Suc-Leu-Tyr-AMC (activité de type calpaine), les mêmes résultats sont observés. La calpaine est une protéase neutre activée par le calcium et est impliquée dans le développement de la mort cellulaire lors d'ischémies (Atsma *et al.* 1995). Étant donné que les homogénats et les milieux de culture des cellules COS témoins montrent une très faible activité avec le Suc-Phe-Tyr-AMC, l'activité observée dans les cellules transfectées avec pCMV-GP56 ne peut être attribuée qu'à la présence de GP56. Nous ne pouvons spéculer sur les substrats physiologiques de cette nouvelle endopeptidase de type calpaine, mais le niveau de GP56 observé dans le sang humain suggère que cette protéine joue un rôle important.

FIGURE 18

Alignement de séquences entre GP56 et autres protéines.

L'alignement de séquences a été effectué avec l'aide du programme BLAST du NIH. La séquence en acides aminés de GP56 est surligné en jaune. Trois autres séquences sont représentées : l'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica*, la carboxypeptidase de *Pseudomonas sp.*, et la dipeptidase de *Lactobacillus delbrueckii lactis*. (-) correspond aux espaces qui permettent l'alignement maximal entre les séquences. On identifie l'homologie de 2 acides aminés par un surlignage vert, celle de 3 acides aminés par le rouge et celle de 4 acides aminés par le bleu.

ALIGNEMENT GP56 ET AMINOPEPTIDASE *AEROMONAS PROTEOLYTICA*

```

184  VQYRTQGA-VEAAK--VGALASLIRSVASFSIYSPHTGIQEYQD--GVPK  228
      ||| ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      MPPITQQATVTAWLPQVD--ASQITGTIS-SLESF-TNRF-YTTTSGAQA

229  IP-TACITVEDAEMMSRM-ASHGIKIVIQLKMGAKTYPDTSFNTVAEIT  276
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      SDWTASEWQ--ALSASLPNASV--KQVSHS--G---YNQK-SV--VMTIT

277  GSKYP-EQ-VVLVSGHLDSWDVG-----QG----AM-D-D--GGG-AFIS  310
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      GSEAPDEWI-VIG-GHLDSTI-GSHTNEQSVAPGA-D-DDAS--GIAAVT

311  WEALS-LIKDLGLRPKRTLRLVLWT-AEEQGGVG-----AFQYYQLHK-VN  353
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      -EVIRVLSENNFO-PKRSIAFMAY-AAEEVGLRGSQDLANQYKSEGKNV

354  ISNYSLVME-----S--DAG--TFLPTGLQFTGSEKARAIMEEVMSLLQP-  394
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      -SALQLDMTNYKGSAQDVVFITDY-TDSNFTQYLTQLMD--EY---L-PS

395  LNITQVLSHGEGT-DINFWIQAGVPG-A-----SLL-DDLYKYFFFHSHG  436
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      LTYGFDTC-GYACSDHASWHNAGYP-AAMPFESKFN-D-YNPRI--HTTQ

437  DTMTVMDP--SRWM-----LLLLFGLLEFL--MLLQTW  465
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      DTLANSDPTGSHAKKFTQ---L-GLAYAIEMGSATG

```

ALIGNEMENT GP56 ET CARBOXYPEPTIDASE G2

```

1  MKFLIFAFFGGVHLLSLCSGKAICK--NGISKRTF--EEIKEEIASCGDV 46
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   QKRDNVLFQAATDEQPAVI-KTLEKLVN-IETGTGDA----EGIAAAGNF

47  AKAII-NLAVYGKAQNRSYER-LALLV--DT-VGPRLS--GSKNLEKAIY 89
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   LEAELKNL---GFTVTRSKSAG---LVVGDNIVGKIK-GRGGKNLLLSH

90  IN--YSRTVQYRTQGAVEAAKV-GAL-ASLIRSVASFSIYSPHTGIQ--E 221
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   MDTVYLKGILAKAPFRVEGDKAYGPGIADDKGNAV--IL--HTLKLLE

222 YQDGVPKIPTACITVE---DA-EMMSRMASHG-IKIVIQLKMGAKTYPDT 266
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   Y--GVRDYGT--ITVLFNTD-EEKGSFG-SRDL--IGEEAKL-AD-YVL-

267 DSFNTVAEITGSKYPEQVVLV-SGHLDSWDVGQ-G-AMDDGGGAFISWE- 312
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   -SF----EPT-SAGDEKLSLGTSGIAYVQ-VNITGKASDDGA-APELGVN

313 ALSLIKDLGLRP-----KRT-LRLVLWT-AEEQGGVGAFOYYQLHKVNIS 355
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   ALVEASDLVLRMTNIDDKAKNLRFN-WTIAEE-GNVSNIIPASATL-NAD

356 N-YSLVMES--DAG--TFLPTGLQFTGS-E---KA-----RAIM--EEVM 389
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   VRYARN-E-DFDAAMKT-LEERAQOKKLPEADVQVIVTRGRAFNAG-EGG

390 S-LLQPLNITQVLSHGE-----GTDINFWIQAGVPGA-SL-LDD 425
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   KK-LVDKAVAYYKEAG-GTLGVEERTGGGTDAAYAALSGKPVIESLG---

426 LYKYFFFHSHGDTMTVMDPS---RWMLLLLFG--LLFLM-LLQTKW 466
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   LPG-FGYH-SDKAAY-V-DISAIARR---LYMAAR-LI-MD-LGAGK

```


1 GP56 1 FF-G VHLISLCSG IC S--G FEE K P SC VA G-I AVY KAQN S E L L L T R S S K I 88
 DIDPET T L S AKRD-FDTENFANY-GRV-FAGGD LGI-GHMDVV-PFME-DEE---I GGS D--K-S TAYGM L L K G
 CARBOX --DNVLFQAATDEQPAVI--TILE--ETG--GDA--GAA--NFLE EK Y--FTVT KSAG--V--KIK--N--L LMS

 89 GP56 89 QIMYQNLQQDGLGVHLEPVRI PHWERCESAVMLEPRIHKIAI LGLGSSIGTPEGITAEVLVVT S FDELQRRASEARGKIVVYNQPYIN SRTVQYR G 190
 DIDPET -----FKPKKKIDFVL-----
 CARBOX -----H-V LKGI LAKAPF-----
 AERO. PROT MPPI T Q

 191 GP56 191 A--GAL--S RSVAS F Y--S P E G I Q--QD S P K P--V A C I V E D A M M R M--F H E I K S I Q L--M E--K E P D D E N V A L S K Y-- 282
 DIDPET T--N E T N W--I D--Y I K H E P T P D--V F P D A E Y P I--I N--E Q C F--L A F S F K K N D D--T K--D Y--L D--K F A I A--I N V--P Q V--R A T S P D L--
 CARBOX R--G D A Y P G I D D K G N A V--L--L K L--R D Y G--I--K G F G--R D L--G--E E A L L--D--V L--V--S P--A G D--
 AERO. PROT --T W L--D--S Q T G T I--L E--F--E N R--S S A Q A S D--S E W Q--A L S A L P--A V--Q V S H S--E--I N P Q--V--V M T S S E A--

 283 GP56 283 Q V V--S G--S W V V G--G--M V Y G--G--S W--S--K V S G--K--K A V V--A A Q G V--A A Q Y Q H--I N--S V-- 363
 DIDPET E A K L A Y E F--A--K E--L--D B--S E E N D--S D I V--G Q--F A H A S A Q N S A F A F D Q Y A E E--E R D K--N L H F--A E--E H E D F G K K L G--I
 CARBOX E K L S G T--S--I A Y V Q--N--S A S I G A--P E L G V N--E--V E A S G A V R--M I D D K A K N--R F N--I A B E--S N S--N I I P A S A--T--L A D V R--A R N--
 AERO. PROT F W--I G--G--D S T I--G--S--A--A--V T--V I R--S E N N F Q--K--S--I A F W A Y--A A E F V G L R S--E N Q K S E G--V--S A--L Q--D T--S

 364 GP56 364 A G--F P G--P G S--A--A I M E--V S S I Q--N I T V L S H E--L N F--V--S--S D D P--K Y F F--F--H--G--M-- 447
 DIDPET --F H H--D D M--D A S S P M--E D--Y E H A G--K A--S L I N N--V R Y P--S--P D T M K G V L D K F S I--D V T N G--E E P--Y V P S--P V Q L L K V Y--E
 CARBOX --E A--E E R--A Q K--P--V--P F N A--G G K--L V D--K A V A Y Y K E A--K--A A Y A A L S--K--V I--G--P G--C Y--D--K--A B Y--I--I--
 AERO. PROT --V V--D Y--D--S N--Q Y L--T Q--L M D--Y--Y--T Y G F D T C--Y A C--H A S--H N--Y--K F--N P R I--T T Q--L--A N S--H

541

448 GP56 448 WMLL F F L L Q W K C C I G P N S K K E T F S C F W G I L G L Q L W K T P H I T S S N S S K H I N S C F L L S F--I L S K F S D S R K R N H S P L P P T T
 DIDPET K Q T G K P--S H E V V--I G G G Y G R--F E G V A F G A Q P E N G V W H A A N E F M M D D I L--I A I Y A E A--Y E--T K D E E
 CARBOX R--Y M A--I--G A G
 AERO. PROT A K--S A Y A--G S A G

FIGURE 19

Site catalytique de l'aminopeptidase *Aeromonas proteolytica*.

Représentation graphique du site catalytique de l'aminopeptidase de type leucine provenant d'*Aeromonas proteolytica* (Chevrier *et al.* 1996).

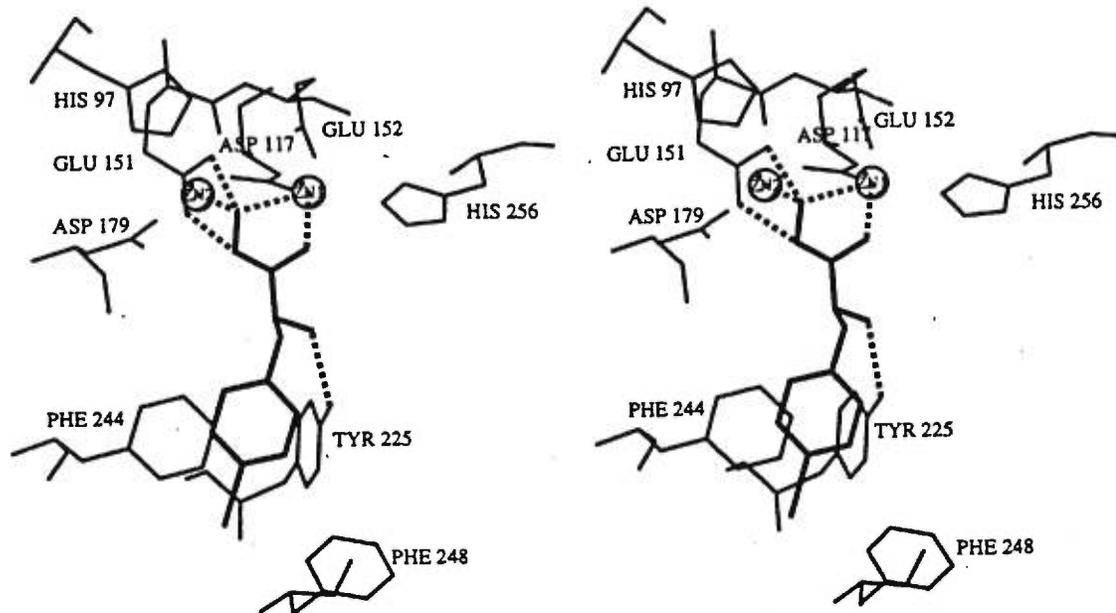


FIGURE 20**Site catalytique de la carboxypeptidase G2 de *Pseudomonas sp.***

Représentation graphique du site catalytique de la glutamate-carboxypeptidase provenant de *Pseudomonas sp.* (Rowsell *et al.* 1997).

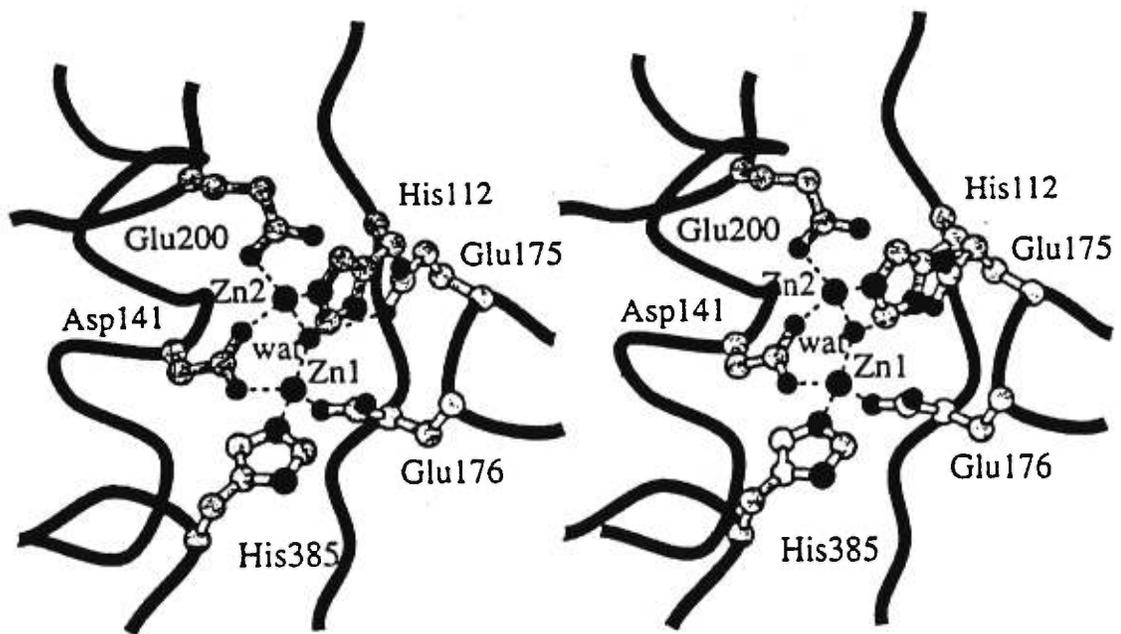


FIGURE 21

**Dosages enzymatiques d'extraits de placenta de souris,
de placenta humain et de plasma humain.**

Représentation graphique des cinq dosages enzymatiques significatifs d'extraits de placenta de souris, de placenta humain et de plasma humain avec différents substrats.

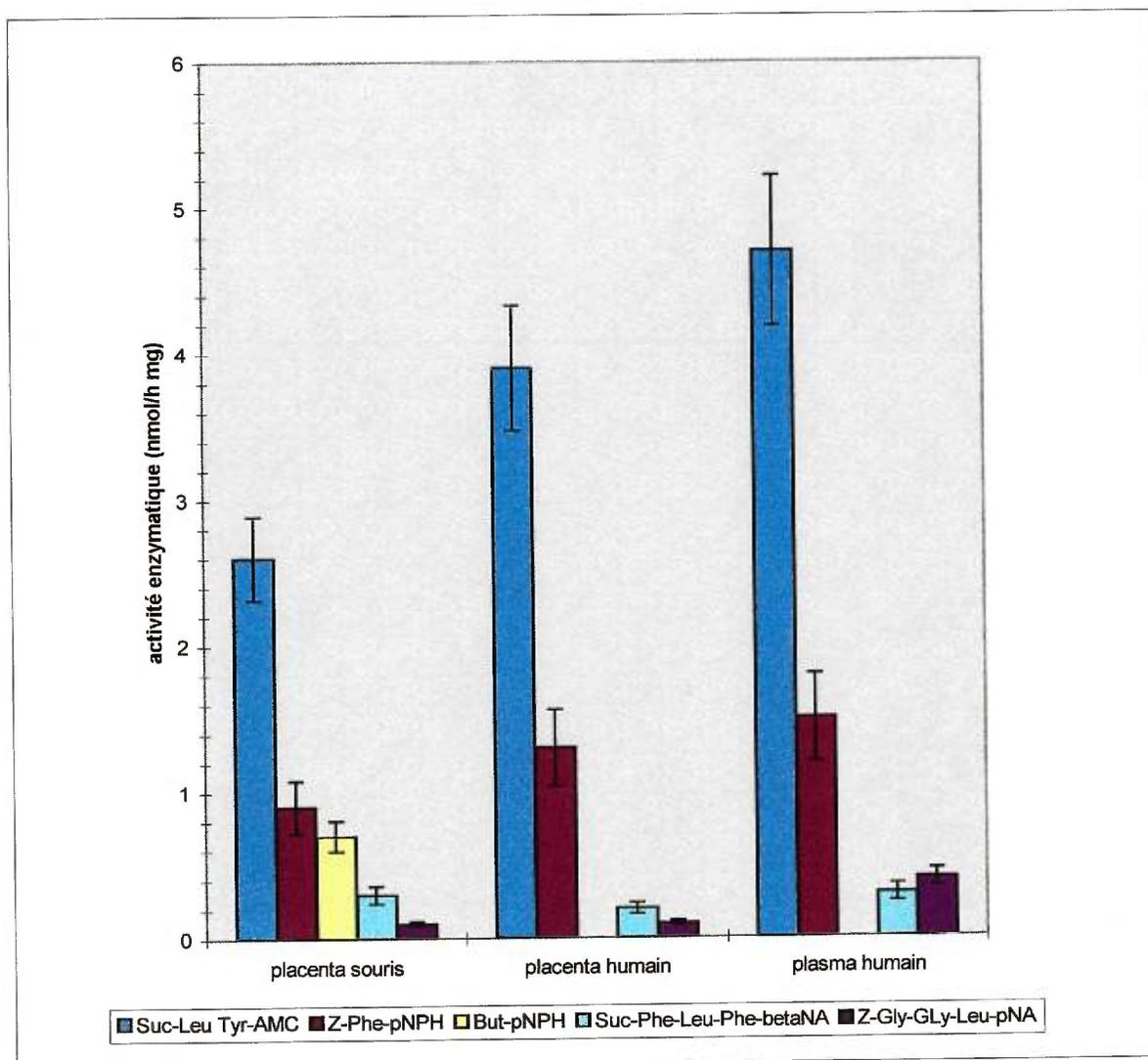
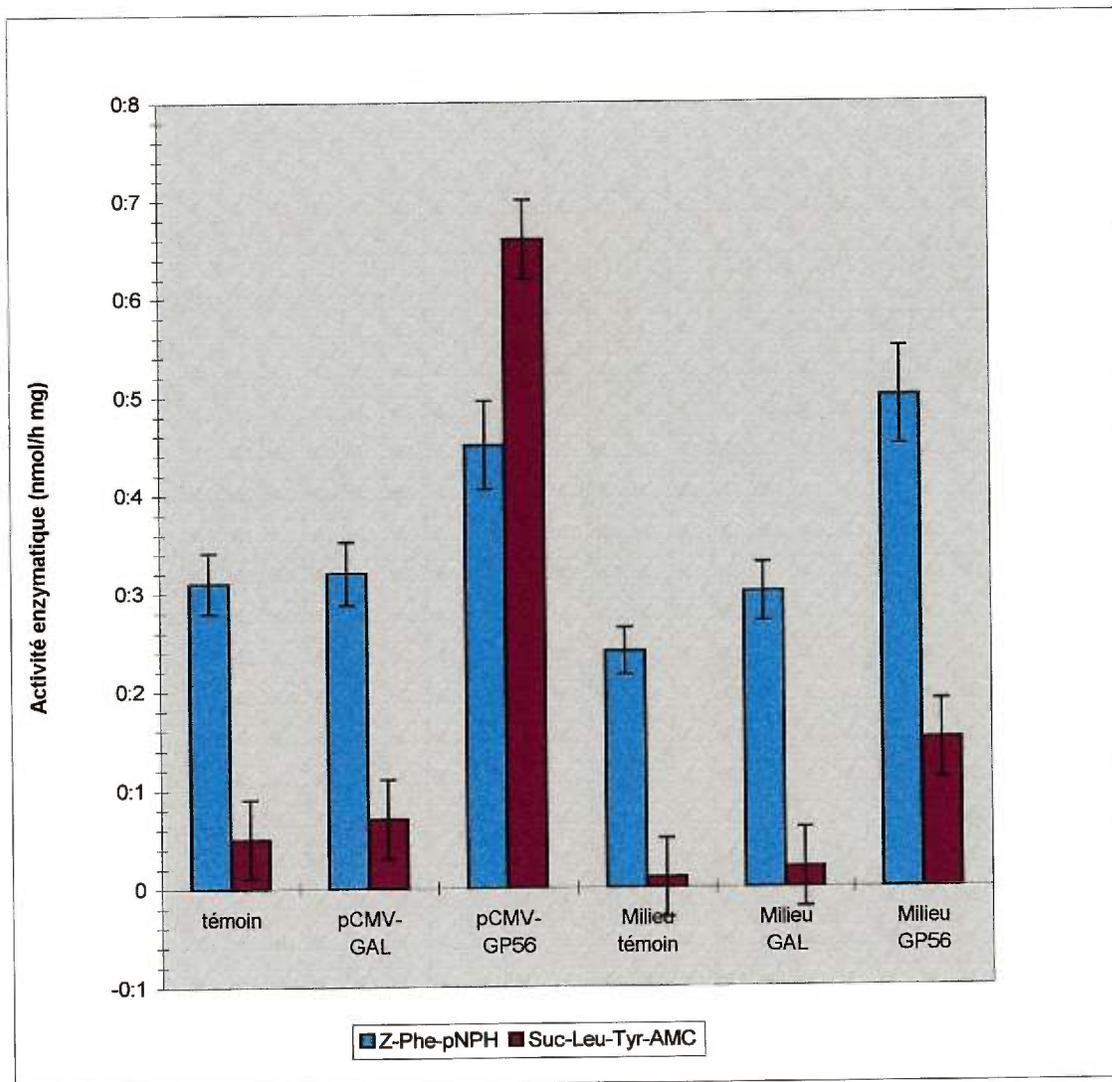


FIGURE 22

**Dosages enzymatiques d'homogénats et de milieux de culture des cellules COS
transfectées avec pCMV-GP56.**

Représentation graphique des dosages enzymatiques des homogénats et des milieux de culture des cellules COS transfectées avec le vecteur pCMV-GP56. Les résultats des deux substrats les plus significatifs sont montrés.



4.0 CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous avons caractérisé et exprimé une nouvelle glycoprotéine humaine nommée GP56. GP56 est une protéine qui a été co-purifiée avec la cathepsine A à partir de placenta humain en utilisant un gel d'affinité composé d'agarose couplé au dipeptide Phe-Leu. Ce dipeptide hydrophobe est le substrat de la cathepsine A. Puisque la cathepsine A forme un complexe lysosomal avec d'autres enzymes dont la sialidase et la β -galactosidase, il était possible que GP56 soit une composante de ce complexe. Cette possibilité a été éliminée rapidement puisqu'il est impossible de purifier GP56 à partir de placenta humain en utilisant le gel d'affinité PATGAL.

La protéine GP56 a été séquencée en N-terminale et cette séquence a été comparée aux séquences connues dans les banques de données. Aucune séquence de protéine ne correspondait à GP56 ce qui nous a indiqué qu'il s'agissait d'une nouvelle protéine. La séquence N-terminale de 20 acides aminés a été utilisée afin de rechercher le cDNA correspondant dans la banques de données ESTs. Une séquence ayant une homologie de 100% a été obtenue de l'Université de Washington School of Medicine via le consortium I.M.A.G.E.. La séquence de 1.62 kb a été analysée avec l'aide du programme informatique SWISS-PROT. GP56 est une protéine de 56 kDa ayant un point isoélectrique théorique de 7.4. Cette analyse a aussi révélée la présence de 5 sites de glycosylation possible en plus de plusieurs autres sites de phosphorylation. Le gène codant pour GP56 a été localisé sur le chromosome 8 chez l'humain à la position cda01e07 entre les marqueurs D8S270 et D8S257 à l'aide du programme UNIGENE de la banque de données NCBI.

Un buvardage de type northern a été réalisé sur de l'ARN total provenant de placenta humain et de fibroblastes cutanés humains en culture en utilisant la séquence de GP56 comme sonde marquée au ^{32}P . Dans les deux cas, un signal unique a été identifié à une longueur de 1.62 kb.

Des anticorps anti-GP56 ont été préparés contre GP56 purifiée à partir de placenta humain. Les injections de rappel ont été réalisées avec une protéine de fusion GP56-GST.

Un vecteur d'expression eucaryotique de type pCMV a été utilisé pour cloner GP56 et l'exprimer dans des cellules de type COS après transfection avec la lipofectAMINE. Les homogénats de cellules ainsi que les milieux de culture ont été analysés par électrophorèse en un gel de SDS-polyacrylamide suivi d'un immunobuvardage avec les anticorps anti-GP56. GP56 a été détectée au niveau des homogénats cellulaires ainsi que dans les milieux de culture des cellules transfectées avec pCMV-GP56 suggérant qu'elle serait une protéine sécrétée. Ces cellules transfectées ont été utilisées pour analyser la maturation métabolique de GP56 par un marquage à la $[^{35}\text{S}]\text{-Met}$ suivi d'une immunoprécipitation. GP56 est une protéine synthétisée sous forme d'un précurseur d'environ 62 kDa qui devient une protéine de 56 kDa.

La localisation intracellulaire de GP56 a été réalisée sur des fibroblastes cutanés en culture de deux façons : l'immunocytofluorescence utilisant des anticorps couplés à la rhodamine et la microscopie électronique utilisant des anticorps couplés à l'or colloïdal. Les résultats montrent que GP56 est localisée de façon aléatoire à l'intérieur de la cellule dans des vésicules qui sont localisées près de la membrane plasmatique. Ces résultats suggèrent que GP56 est localisée dans des vésicules de sécrétion.

La distribution tissulaire de GP56 a été réalisée sur des extraits d'homogénats de différents tissus humains par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide suivi d'un immunobuvardage fait avec les anticorps anti-GP56. En plus d'observer un signal dans les fractions de placenta, rein, foie et muscle, le signal de GP56 a été observé dans le plasma humain. Ce dernier résultat jumelé à ceux de l'analyse des milieux de culture des cellules transfectées avec le vecteur pCMV-GP56 et aux résultats de la localisation intracellulaire nous confirment que GP56 est une glycoprotéine humaine sécrétée dans le sang à partir du placenta, des fibroblastes cutanés et autres tissus.

Étant donné que GP56 est une glycoprotéine, une déglycosylation à la N-glycosidase F a été effectuée sur des fractions de GP56. Ceci a démontré qu'environ 4 kDa de la masse moléculaire de GP56 sont dus aux chaînes oligosaccharidiques.

La séquence de GP56 a été comparée aux séquences disponibles dans la banque de données GenBank. Une similarité a été obtenue avec une Leu-aminopeptidase provenant de *Aeromonas proteolytica* ainsi qu'avec deux autres enzymes soit la Glu-carboxypeptidase G2 provenant de *Pseudomonas sp.* et une His-dipeptidase provenant de *Lactobacillus delbrueckii lactis*. L'alignement de ces séquences révèle que la séquence entre His 290 à Gly 342 de GP56 constitue la région où l'alignement avec les trois autres protéines est le meilleur. Cette région correspond aux acides aminés impliqués dans la liaison des atomes de zinc à l'intérieur du site catalytique : His 97, Asp 117, Glu 152 et Asp 179 pour l'aminopeptidase, Asp 141 et Glu 176 pour la carboxypeptidase et Asp 120, Asp 121, Glu 154 et Glu 155 pour la dipeptidase. De plus, on retrouve les acides aminés Glu 151 (chez l'aminopeptidase) et Glu 175 (chez la carboxypeptidase) qui sont directement impliqués dans l'hydrolyse de leur substrat respectif.

Malgré ces particularités intéressantes, aucune activité enzymatique de type aminopeptidasique ou carboxypeptidasique n'a été trouvée. Une activité endopeptidasique de type calpaïne a été identifiée avec le substrat Suc-Phe-Tyr-AMC lors de dosage de milieu de culture et d'homogénats de cellules COS transfectées avec le vecteur pCMV-GP56.

Nous pouvons donc conclure que GP56 est une nouvelle endopeptidase de 56 kDa synthétisée dans le placenta, les fibroblastes cutanés humains et possiblement d'autres tissus pour être sécrétée dans le plasma sanguin en très grande quantité. Bien qu'il soit trop tôt pour suggérer un rôle spécifique chez l'humain, nous pouvons penser que sa présence est importante.

5.0 BIBLIOGRAPHIE

Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merrill, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F. (1991) *Science* 252, 1651-1656.

Adams, M. D., Kerlavage, A. P., Fleischmann, R. D., Fuldner, R. A., Bulf C. J., Lee, N. H., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Gocayne, J. D., White, O. (1995) *Nature* suppl. 3, 3-174.

Atsma, D.E., Bastiaanse, E.M., Jerzewski, A., Van der Valk, L.J., Van der Laarse, A. (1995) *Circulation Research* 76, 1071-1078.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. A., Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Éditions John Wiley and Sons. Inc, É.-U., p. 1.7.6-1.7.8, 1.7.13, 9.1.5, chap. 11 et 16.

Baker, R. E., Jefferson, L. S., Shiman, R. (1981) *J. Cell. Biol.* 90, 145-152.

Barret, A. J. (1970) *Biochem J.* 117, 601-607.

Beeckmans, S., Kanarek, L. (1981) *Eur. J. Biochem* 117, 527-535.

Bradford, M. M., (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Bronstein, I. (1989) *J. Biolum. Chemilumin.* 4, 99.

Chevrier B., D'Orchymont, H., Schalk, C., Tarnus, C., Moras, D. (1996) *Eur. J. Biochem.* 237, 393-398.

Christianson, D. W., Lipscomb, W. (1989) *Acc. Chem. Res.* 22, 62-69.

D'agrosa, R. M., Hubbes, M., Zhang, S., Shankanan, R., Callahan, J. W. (1992) *Biochem J.* 285, 833-838.

D'Azzo, A., Hoogeveen, A., Reuser, J. J., Robinson, D., Galjaard, H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4535-4539.

Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132, 6-10.

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413.

Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, Éditions W.H. Freeman and company, New York, p. 416-422.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, C., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver S. G. (1996) *Science* 274, 546-567.

Grynbaum, A., Marks, N. (1976) *J. Neurochem.* 26, 313-318.

Harlow, E. D., Lane, D. (1988) *Antibodies, a laboratory manual*, Cold spring Harbor Laboratory, É.-U., p. 430-470.

Haselback, A., Hösel, W. (1988) *Topics in Biochemistry* 4.

Haselback, A., Roos, A., Hösel, W. (1992) *Topics in biochemistry* 10.

Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Gebeyehu, G., Jessee, J., Felgner, P. (1993) *Focus* 15, 73.

Hermo, L., Wright, J., Oko, R., Morales, C. R. (1991) *Biol. Reprod.* 44, 112-113.

Hieter, P., Boguski, M. (1997) *Science* 278, 601-602.

Jackman, H. L., Tan, F., Tamei, H., Beurling-Harbury, C., Li, X. Y., Skidgel, R. A., Erdos, E. G. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 11265-11272.

Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.

Luster, A. D., Weinshank, R. L., Feinman, R., Ravetch, J. V. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 12036-12043.

Matsudaira, PT. (1989) *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*, Éditions Academic Press inc., New York, p. 10-45.

Matthews, B. W. (1988) *Acc. Chem. Res.* 61, 333-340.

Miller J. J., Ghangaris G. D., Levy R. S. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 1122-1129.

Minton, N. P., Atkinson, T., Bruton, C. J., Sherwood, R. F. (1984) *Gene* 31, 31-38.

Morreau, H., Galjart, N. J., Gillemans, N., Zhou, X. Y., d'Azzo, A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17949-17956.

Potier, M., Michaud, L., Tranchemontagne, J., Thauvette, L. (1990) *Biochem. J.* 267, 197-202.

Pshezhetsky, A.V., Eisliger, M.-A., Vinogradova, M., Potier, M. (1995) *Biochemistry*. 34, 2431-2440.

Pshezhetsky, A. V., Potier, M. (1994) *Archives of Biochem. and Biophys.* 313, 64-70.

Pshezhetsky, A.V., Potier, M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 28359-28365.

Pshezhetsky, A. V., Richard, C., Michaud, L., Igdoura, S., Wang, S., Eisliger, M.-A., Qu, J., Leclerc, D., Gravel, R., Dallaire, L., Potier, M. (1997) *Nature genetics* 15, 316-320.

Roswell, S., Pauptit, R. A., Tucker, A. D., Melton, R. G., Blow, D. M., Brick, P. (1997) *Structure* 5, 337-347.

Rowen, L., Mahairas, G., Hood, L. (1997) *Science* 278, 605-607.

Sambrook, J., Fritch, EF., Maniatis, T. éd. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2^e édition, Cold spring Harbor Laboratory Press, É.-U., p. 6.15, 6.44, 7.18-7.22, 9.16-9.19.

Shimmoto, M., Fikuda, Y., Oshima, A., Sakubara, H., Suzuki, Y. (1993) *J. Clin. Invest.* 91, 2393-2399.

Smith, D. B., Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67, 31-40.

Stevens, T. M., Rothman, J. H., Payne, G. S., Schekman, R. (1986) *J. Cell. Biol.* 102, 1551-1557.

Sträter, N., Lipscomb, W. N. (1995) *Biochemistry* 34, 14792-14800.

Stryer, L. (1988) *Biochemistry*, 3^e édition, W.H. Freeman and company, New York, p. 15-39.

Sylvester, S. R., Morales, C. R., Oko, R., Griswold, M. D. (1989) *Biol. Reprod.* 41, 941-948.

Thompson, D., Larson, G. (1992) *Biotechniques* 12, 656-658.

Tranchemontagne, J., Michaud, L., Lamontagne, S., Potier, M. (1991) *Brain Dysfunction* 4, 257-270.

van der Horst, G. J., Galjart, N. J., d'Azzo, A., Galjaard, H., Verheijen, F. W. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 1317-1322.

Verheijen, F., Brossmer, R., Galjaard, H. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 868-875.

Verheijen, F., Palmeri, S., Hoogeveen, A. T., Galjaard, H. (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 315-321.

Vongerichten, K. F., Klein, J. R., Matern, H., Plapp, R. (1994) *Microbiology* 140, 2591-2600.

Walsh, C. (1979) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Éditions W.H. Freeman and company, New York, p. 104-107.

Wenger, D. A., Tarby, T.J., Warton, C. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 589-595.

Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaev, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M. (1996) *Nature* 379, 466-469.

Yates, J., Eng, J., McCormack, D., Scheiltz, D. (1995) *Anal. Chem.* 67, 1426.

Zhou, X. Z., Galjart, N. J., Willemsen, R., Gillemans, N., Galjaard, H., d'Azzo, A. (1991) *Embo J.* 10, 4041-4048.

REMERCIEMENTS

Je désire remercier Dr Alexei Pshezhetsky et le Dr Michel Potier pour leur supervision, leur aide technique, leur support moral et leur confiance à mon égard permettant de mener à terme ce projet scientifique.

Je remercie également les membres de l'équipe de laboratoire : Catherine Richard, Eriq Kiven Lukong, Maia Vinogradova, Alexander Mezentsev, Lorraine Michaud et Maryline Audette pour leur aide et leur encouragement.

Des remerciements au Dr Carlos Morales du Département d'Anatomie de l'Université McGill pour son expertise en microscopie électronique et au Dr Rhoda Kenigsberg du Département d'Endocrinologie de l'Hôpital Ste-Justine pour son aide en immunocytofluorescence.

Je voudrais exprimer ma gratitude envers tous les membres du service de Génétique Médicale de l'Hôpital Ste-Justine qui m'ont aidé et encouragé pendant le projet.

Un merci tout spécial à tous ceux et celles qui m'ont entouré à l'extérieur du laboratoire pendant ce projet et qui ont su m'encourager et me supporter aux moments opportuns.