

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université MENTOURI – Constantine –



Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies
Agro-Alimentaires
I.N.A.T.A.A.

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du
DIPLOME DE MAGISTERE
En Sciences Alimentaires
Option : Biotechnologies Alimentaires

Thème

Serpines A3 bovines : relations fonctionnelles avec leur
homologue humain, l'alpha-1-antichymotrypsine

Présenté par : M. Mohammed GAGAOUA

Devant le jury :

Président :	Pr. M. N. ZIDOUNE	INATAA – Université Mentouri de Constantine
Examineur :	Pr. D. KHELIFI	Faculté des sciences - Université Mentouri de Constantine
Encadreur :	Dr. A. BOUDJELLAL	INATAA – Université Mentouri de Constantine
Co-encadreur :	Dr. A. OUALI	Directeur de Recherches, INRA de Theix - France

Année universitaire 2010 - 2011

Remerciements

Ce mémoire n'aurait jamais été entrepris ni achevé sans la patiente assistance, les savants conseils et orientations, les méticuleux contrôles et suivis, que m'ont prodigué mes Encadreurs, Monsieur le Dr. A. OUALI et Monsieur le Dr. A. BOUDJELLAL qui ont accepté de m'encadrer. Je leur témoigne ici, de ma gratitude et ma reconnaissance.

J'exprime mes remerciements à Monsieur le Président du Jury, le Professeur M.N. ZIDOUNE, mon enseignant à l'institut de l'INATAA, pour avoir accepté de présider et juger mon travail.

Mes profonds remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur : D. KHELIFI qui, a accepté de juger ce travail en qualité d'examineur. Vos conseils et suggestions m'ont donnés l'envie de continuer dans le domaine de la recherche.

Je remercie encore une autre fois Dr. A. Ouali et l'unité de recherches QuaPA, équipe BPM, INRA de Theix-France, pour m'avoir accueilli et permis d'effectuer mes recherches et pour avoir mis à ma disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je voudrais également adresser mes sincères remerciements à Mr. Laurent AUBRY, de m'avoir incubé dans le monde des chromatographies, ta sympathie, humanité et sourire resteront en ma compagnie. Tu es toujours impliqué.... ☺.

Un grand merci, à Mme. Eliane BACHELARD, Thierry SAYD, Claude FERREIRA, Aurélie PROMEYRAT, Didier VIALA, Christophe CHAMBON, Véronique SANTE-LHOUTELLIER, Philippe GATELIER, Lamia SLIMANI, Rosa LEULMI, pour leur spontanéité, aide et assistance.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des chercheurs du laboratoire de viande à INATAA, Mme Samira BECILA et Melle Yasmine BOUDIDA pour leur présence et existence et de m'avoir aussi supporté avec mes crises serpiniques. Je suis particulièrement sensible à la confiance, qu'elles m'ont témoignée et aux excellentes conditions du travail qu'elles m'ont assuré.

J'ai à cœur de remercier particulièrement, Ryma ALLEK, pour sa contribution, sa présence et le temps qu'elle a bien voulu consacrer pour la réalisation de mes recherches.

Le soutien et l'encouragement de : Abdellah, Abderrezak (le philisophe monbirien), Anis, Azeddine, Fatiha, Fouad, Hanane, Samir, Loucif, Ami Amar, Ami Hamoudi, ont été très importants pour la réussite de mes travaux. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde affection.

Je remercie aussi, tous ceux et toutes celles qui m'ont aidé ou encouragé, à quelque titre ou degré que ce soit, à entreprendre et achever ce travail, qui est ma modeste contribution au domaine de la recherche sur les SERPINES.

DEDICACES

A la mémoire de mes grands-parents,

A mon très cher père pour tous les efforts consentis afin de nous armer du savoir,

A ma très chère mère qui s'est tant sacrifiée pour les besoins de nos études,

A mes sœurs et mes frères pour leur affectueux soutien moral,

A toutes celles et à tous ceux qui m'aiment,



Ce qui constitue une nation, ce n'est pas de parler la même langue, ou d'appartenir à un groupe ethnographique commun, c'est d'avoir fait ensemble de grandes choses dans le passé et de vouloir en faire encore dans l'avenir.

Ernest Renan

Extrait de *Qu'est-ce qu'une nation ?*

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------------	----------

Revue bibliographique

Chapitre I. Apoptose et la maturation des viandes

I.1. L'Apoptose ou Mort Cellulaire Programmée (MCP).....	3
I.1.1. Définition.....	3
I.1.2. Rôle physiologique de l'apoptose	4
I.1.3. Pathologies et dérégulations de l'apoptose	4
I.1.4. Nécrose et Apoptose.....	5
I.2. Les peptidases apoptogènes (les CASPASES).....	6
I.2.1. Structure schématique des caspases	6
I.2.2. Les trois classes des caspases	6
I.3. Schéma général de l'apoptose	7
I.4. Mise en place de l'apoptose <i>postmortem</i> et conséquences.....	8
I.4.1. Signalisation de l'apoptose au niveau du muscle	9
I.4.2. Caspases et Attendrissage des viandes	9
I.4.3. Stress et Apoptose	10
I.5. Preuves de la mise en place de l'apoptose.....	10
I.5.1. Actine et ses fonctions.....	10
I.5.2. Dégradation de l'actine et l'apoptose	11
I.5.3. Les peptidases apoptogènes et clivage de l'actine	13

Chapitre II. Les marqueurs biologiques et maîtrise de la tendreté de la viande

II.1. La tendreté de la viande	14
II.2. Les marqueurs biologiques de la tendreté	15
II.2.1. Les marqueurs génétiques	15
II.2.2. Les marqueurs protéomiques	16
II.3. Les Inhibiteurs endogènes des protéases et la science de la viande.....	18
II.4. Implication des serpins musculaires dans la tendreté de la viande	20

Chapitre III : La superfamille des serpinines : structure, fonction et évolution

III.1. Introduction aux Serpinines	22
III.2. Classification et nomenclature de la superfamille des serpinines.....	23
III.3. Fonctions biologiques des serpinines et des serpinines humaines.....	24
III.4. Structure des serpinines	26
III.4.1. Les régions critiques de la flexibilité des serpinines	27
III.4.1.1. La charnière (<i>hinge</i>).....	27
III.4.1.2. La brèche (<i>breach</i>).....	28
III.4.1.3. L'obturateur (<i>shutter</i>)	28
III.4.1.4. La porte (<i>gate</i>)	28
III.4.1.5. L'hélice F (<i>helix-F</i>).....	28
III.4.2. La boucle d'inhibition (RCL, <i>Reactive Center Loop</i>)	29
III.4.2.1. Importance de la composition du RCL	29
III.4.2.2. Importance de la longueur du RCL.....	30
III.5. Le polymorphisme conformationnel des serpinines	30
III.5.1. La forme native.....	30
III.5.2. La forme latente.....	31
III.5.3. La forme clivée	31
III.5.4. La forme δ	31
III.5.5. La forme polymérisée	32
III.6. Mécanisme d'inhibition des serpinines.....	32
III.6.1. Inhibition par les inhibiteurs canoniques	33
III.6.2. Mécanisme d'inhibition des serpinines suicide – substrat.....	33
III.6.3. Inhibition croisée ou « <i>cross-class inhibition</i> ».....	34
III.7. Enfin pourquoi les serpinines ?.....	35
III.8. La glycosylation des serpinines	35
III.9. Serpinopathies et Maladies liées aux Serpinines	36

Chapitre IV : La famille des serpinines A3

IV.1. Les serpinines du clade A	38
IV.2. La sous-famille des serpinines A3.....	38
IV.2.1. α_1 -antichymotrypsine / SERPINA3 : Généralités, structure et localisation	38
IV.2.2. α_1 -antichymotrypsine / SERPINA3 : Fonctions et rôles potentiels.....	40

IV.2.3. Polymorphisme de la famille des SERPINA3 chez les mammifères	42
IV.2.3.1. Souris (<i>Mus musculus</i>).....	42
IV.2.3.2. Bovin (<i>Bos taurus</i>).....	43
IV.2.3.3. Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	44
IV.2.3.4. Porc (<i>Sus scrofa</i>).....	45
IV.2.3.5. Autres espèces	45
IV.2.4. Polymorphisme de la SERPINA3 chez l' <i>Homo sapiens</i>	46

Partie pratique

Chapitre V : Matériel et Méthodes

V.I. Matériels	47
I.1. Matériel biologique « sérum humain ».....	47
I.2. Enzymes, substrats et inhibiteurs	47
I.3. Matériels de chromatographie	47
I.4. Matériels d'électrophorèse et du Western Blot	48
I.5. Matériels de spectrométrie	48
I.6. Matériels de spectrométrie de masse	48
V.II. Méthodes.....	48
II.1. Préparation des enzymes	48
II.2. Titration des enzymes	48
II.3. Mesure des activités enzymatiques	48
II.4. Purification de la SERPINA3.....	52
II.4.1. Préparation du sérum	53
II.4.2. Précipitation au sulfate d'ammonium	53
II.4.3. Dialyse	54
II.4.4. Purification.....	54
II.4.4.1. Purification de l'inhibiteur par chromatographie d'affinité	55
II.4.4.2. Fractionnement des protéines selon leur charge électrique.....	56
II.4.4.3. Fractionnement des protéines par chromatographie échangeuse d'anions.....	58
II.4.4.4. Purification de l'inhibiteur par la deuxième chromatographie d'affinité.....	58

II.5. Caractérisation des propriétés inhibitrices	59
II.6. Réalisation des courbes d'inhibition avec les peptidases à sérine et cystéine	60
II.7. Caractérisation physico-chimiques des inhibiteurs	61
II.7.1. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse	61
II.7.2. Détermination du poids moléculaire (PM) par méthode électrophorétique.....	61
II.7.3. Analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle (2DE)	64
II.7.3.1. Première dimension.....	65
II.7.3.2. Deuxième dimension.....	66
II.8. Caractérisation immunochimique	67
II.8.1. Préparation des anticorps polyclonaux	68
II.8.2. Caractérisation par western blot.....	68
II.8.2.1. Transfert actif sur membrane de nitrocellulose.....	68
II.8.2.2. Hybridation des anticorps et lavages.....	69
II.8.2.3. Révélation	69
II.9. Spectrométrie de masse.....	70
II.9.1. L'empreinte peptidique massique (EPM) par MALDI-TOF	70
II.9.1.1. Principe	70
II.9.1.2. Préparation des bandes	70
II.9.1.3. Préparation des protéines pour l'analyse.....	71
II.9.1.4. Identification des protéines	72
II.9.2. EPM par spectrométrie de masse MS/MS	73

Chapitre VI : Résultats et discussion

Préambule.....	75
VI.I. Purification de l' α_1 -antichymotrypsine (SERPINA3) humaine.....	76
I.1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	77
I.2. Purification par chromatographie d'affinité « HiTrap Blue HP 5 ml ».....	79
I.3. Fractionnement du « pool H1 » par chromatographie échangeuse d'anions.....	82
I.4. Fractionnement du « pool H1Q1 » par chromatographie échangeuse d'anions.....	84
I.5. La deuxième chromatographie d'affinité par la « HiTrap Blue HP 5 ml ».....	86
I.6. Protocole final à prendre en considération ultérieurement pour la purification de la SERPINA3 sauvage du sérum humain	88
VI.II. Eléments en faveur d'un polymorphisme de cette serpine chez l'humain	90

II.1. Chromatographies sur HiTrap Bleu Sépharose et Q-Sépharose 1 et 2	90
II.2. Glycoformes de la SERPINA3.....	91
II.3. Polymorphisme conformationnel de la SERPINA3.....	93
II.4. Electrophorèse bidimensionnelle (2DE) du sérum humain	95
VI.III. Identité et caractérisation des propriétés physicochimiques et inhibitrices de la SERPINA3 humaine purifiée	98
III.1. Détermination de la masse moléculaire	98
III.2. Identité de l'inhibiteur par Western blot avec l'anticorps polyclonal dirigé contre la serpine bovine présentant 75 % d'identité.....	99
III.3. Identité par spectrométrie de masse.....	100
III.4. Propriétés inhibitrices de la serpine purifiée vs certaines peptidases à sérine	102
VI.IV. Implication probable de la SERPINA3 dans la régulation de l'apoptose et Conséquences..	105
IV.1. Inhibition de la peptidase apoptogène « caspase 3 »	105
IV.2. Implication des SERPINA3 humaines dans le processus apoptotique.....	107
Conclusion	109
Références bibliographiques	112

LISTE DES FIGURES

Entre les pages

Figure 01 : Les différentes phases de transformation du muscle en viande à prendre en considération	2 – 3
Figure 02 : Aspects morphologiques de la mort cellulaire	4 – 5
Figure 03 : Structure schématique des précurseurs des caspases identifiées chez l'homme et de quelques caspases exprimées uniquement dans quelques espèces animales mais pas chez l'homme	5 – 6
Figure 04 : Schéma de maturation du précurseur de la caspase 3 en caspase 3 active	6 – 7
Figure 05 : Schéma général du processus apoptotique	7 – 8
Figure 06 : Structure des filaments fins	9 – 10
Figure 07 : Représentation schématique des fragments d'actine produits par le clivage caspasique.....	12 – 13
Figure 08 : Une connaissance approfondie du muscle pour une meilleure qualité.....	15 – 16
Figure 09 : Distribution des familles d'inhibiteurs dans tous les règnes cellulaires	22 – 23
Figure 10 : Fonctions biologiques des serpins humaines	23 – 24
Figure 11 : Structure de l' α -AT native.....	25 – 26
Figure 12 : Polymorphisme conformationnel des serpins	29 – 30
Figure 13 : Adoption d'une variété de conformations par les serpins.....	31 – 32
Figure 14 : Mécanisme standard d'inhibition d'une protéase de type serine par un inhibiteur canonique de même famille	32 – 33
Figure 15 : Mécanisme d'inhibition des serpins	33 – 34
Figure 16 : Mutations des serpins dans le domaine d'obturateur	36 – 37
Figure 17 : Cluster du gène des serpins A sur le chromosome 14q32.13	37 – 38

Figure 18 : Localisation chromosomique des 9 gènes des serpinines A3 bovines	43 – 44
Figure 19 : Exemple de titration de la caspase 3 par l'inhibiteur irréversible Z-Asp-Glu-Val-Asp-chloromethylketone	49 – 50
Figure 20 : Préparation du sérum pour la purification de la SERPINA3 à partir du sang humain.....	52 – 53
Figure 21 : Structure partielle de la HiTrap Blue Sépharose Haute Performance	54 – 55
Figure 22 : Principe de la séparation des protéines par électrophorèse (SDS PAGE).....	61 – 62
Figure 23 : Schéma du sandwich de transfert pour le Western Blot sous tension de 10 V.....	67 – 68
Figure 24 : Profils électrophorétiques des différentes étapes de préparation du sérum traité par fractionnement au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	75 – 76
Figure 25 : Profil d'élution des protéines et pourcentage d'inhibition de l'activité de la chymotrypsine et de la trypsine sur colonne d'affinité HiTrap Blue HP Sépharose.....	78 – 79
Figure 26 : Résultats de contrôle de pureté des fractions éluées par la colonne HiTrap Blue HP Sépharose.....	80 – 81
Figure 27 : Profil d'élution des protéines et pourcentage d'inhibition de l'activité de la chymotrypsine sur colonne échangeuse d'anions Q-Sépharose FF (2.5 x 10 cm).....	81 – 82
Figure 28 : Résultats du contenu protéique des fractions du pool « H1Q1 » élué par la colonne d'échange anionique	82 – 83
Figure 29 : Profil d'élution des protéines et pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique sur colonne échangeuse d'anions Q-Sépharose FF (1.0 x 7.0 cm).....	83 – 84
Figure 30 : Profil électrophorétique des fractions éluées par la colonne Q-Sépharose (1.0 x 7.0 cm) échangeuse d'anions	84 – 85
Figure 31 : Profil d'élution des protéines et pourcentage d'inhibition de l'activité de la chymotrypsine sur la colonne Q-Sépharose FF (1.0 x 7.0 cm).....	85 – 86
Figure 32 : Analyse par Western blot des fractions de concentration du pool « H1Q2 ».....	85 – 86
Figure 33 : Profil d'élution des protéines et pourcentage d'inhibition de l'activité de la chymotrypsine sur la 2 ^{ème} colonne d'affinité HiTrap Blue HP Sépharose (1.6 x 2.5 cm).....	86 – 87

Figure 34 : Profil d'élution des inhibiteurs et pourcentage d'inhibition de l'activité de la chymotrypsine sur la colonne Q-Sépharose FF (1.0 x 7.0 cm).....	87 – 88
Figure 35 : Analyse par Western blot des fractions issues du fractionnement du pool « H2 ».....	87 – 88
Figure 36 : Protocole définitif de purification des serpinés A3 du sérum humain	88 – 89
Figure 37 : Polymorphisme protéique de la SERPINA3 humaine sauvage et commerciale analysées par Western blot.....	91 – 92
Figure 38 : Conformations potentielles de la SERPINA3 révélées par Western blotting	93 – 94
Figure 39 : Analyse du gel d'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) du sérum humain par Western blotting.....	94 – 95
Figure 40 : Séparation par électrophorèse bidimensionnelle (2DE) des protéines du sérum humain brut	95 – 96
Figure 41 : Exemple de détermination de la masse moléculaire des serpinés A3 purifiées du pool « H1Q2 » après la 3 ^{ème} Q-Sépharose.....	97 – 98
Figure 42 : Séquence et carte peptidique de la SERPINA3 humaine réalisée par MALDI-TOF MS.....	99 – 100
Figure 43 : Alignement multiple des séquences protéiques de la famille des serpinés A3 bovines et humaine réalisé par ClustalW2	100 – 101
Figure 44 : Analyse phylogénétique de la famille des serpinés A3 bovines et humaine	101 – 102
Figure 45 : Alignement multiple de quelques boucles réactives des serpinés du clade A.....	101 – 102
Figure 46 : Activité inhibitrice de la SERPINA3 purifiée	102 – 103
Figure 47 : Régulation du processus apoptotique par la SERPINA3 humaine.....	106 – 107
Figure 48 : Profil d'élution des protéines et pourcentage d'inhibition de l'activité de la chymotrypsine et de la caspase 3 sur colonne échangeuse d'anions Q-Sépharose FF	110 – 111

LISTE DES TABLEAUX

	Entre les pages
Tableau 01 : Les serpinines humaines et leurs propriétés.....	21 – 22
Tableau 02 : Clades des serpinines	22 – 23
Tableau 03 : Séquences du RCL des serpinines humaines inhibitrices et non inhibitrices	28 – 29
Tableau 04 : Les différentes situations conformationnelles des serpinines	30 – 31
Tableau 05 : Exemples de protéases à cystéine inhibées par les serpinines	34 – 35

LISTE DES ABREVIATIONS

α_1 -ACT : α_1 -antichymotrypsin ou SERPINA3
 α_1 -AT ou α_1 -PI : α_1 -antitrypsin ou SERPINA1
2DE : électrophorèse bidimensionnelle
BPM : Laboratoire de Biochimie des Protéines Musculaires
BSA : Bovine Serum Albumin
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CJP : Centre Jean Perrin de la région d' Auvergne
CMK : Chlorométhylketone
CrmA : Cytokine response modifier A
Da ; kDa : Daltons; kiloDalton
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité Optique
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EPM : Empreinte Peptidique Massique
FENIB : Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
Gas2 : Growth arrest-specific gene
HEPES : N-(2-hydroxyéthyl)piperazine-N'-(2-éthanesulfonate) de sodium ; 4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-(2-éthanesulfonate) de sodium
HLE : *Human Leucocyte Elastase*
IAP : Inhibitor of Apoptosis
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique/France
IPG strips : Immobilized pH gradient strips
LD : *Longissimus dorsi*
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser desorption/ionization – Time of Flight
MCE : 2-mercapto-éthanol
MCP : Mort Cellulaire Programmée
MPT : Modifications post-traductionnelles
NHMec : 7-amido-4-méthylcoumarin
NR : Non retenu
PBS : Phosphate Buffered Saline
PM : Poids Moléculaire
p-NPGB : 4-Nitrophényl-p-guanidinobenzoate
PVDF : Polyvinylidène difluoride
QTL : Quantitative Trait Loci
QuaPA : Unité de recherche sur la qualité des produits animaux
RCL : Reactive Center Loop = Boucle reactive
SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERPIN : SERine Peptidase INhibitor
ST : Semitendinosus
Std : Sérum traité, dialysé et filtré
TEMED : N, N, N',N'-tétraméthyléthylène diamine
Tm : Température de dénaturation (fusion) moyenne
Tris : Tris(Hydroxyméthyl)-aminométhane
Tween-20 : Polyéthylène glycol sorbitane monolaurate

INTRODUCTION

L'attendrissage de la viande au cours de sa conservation à l'état réfrigéré est le résultat d'une altération des structures musculaires et de la structure myofibrillaire plus particulièrement par les peptidases endogènes. Différents systèmes protéolytiques semblent être impliqués dans ce processus de dégradation dont les plus connus sont les calpaïnes, les cathepsines et le protéasome (Sentandreu *et al.*, 2002 ; Ouali *et al.*, 2006b).

Au début de la dernière décennie, divers travaux suggéraient l'intervention d'un nouveau système protéolytique (Ishida *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2009), découvert au début des années 1990 et comprenant plusieurs enzymes connues sous le nom de caspases (Cysteiny ASPartate-specific peptidase) (Alnemri *et al.*, 1996). La régulation de ces systèmes protéolytiques est régie par plusieurs types d'inhibiteurs, de nature protéique, spécifiques d'un type de peptidases.

En 1990, Ouali et Talmant mettaient en évidence que le taux d'inhibiteurs était un meilleur prédicteur de la tendreté de la viande que le taux des enzymes cibles elles-mêmes. Cette observation a conduit ainsi à une étude plus systématique des inhibiteurs dans le tissu musculaire pour essayer d'identifier ces derniers et de préciser la nature de leurs peptidases cibles *in vivo*, protéases susceptibles de jouer un rôle primordial dans le processus d'attendrissage des viandes (Ouali et Talmant, 1990). Cette orientation s'est trouvée confortée par le travail de Zamora (1997) qui montrait que, parmi une trentaine de variables quantitatives, le taux des inhibiteurs de sérine peptidases dans le tissu musculaire était le meilleur indice de prédiction de la tendreté de la viande (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997 ; Ouali, 1999 ; Zamora *et al.*, 2005). L'intérêt porté aux inhibiteurs est lié au fait que, s'il n'y a pas de relation directe entre le taux d'enzymes musculaires et la vitesse d'attendrissage, par contre il existe une bonne corrélation entre cette même caractéristique et le rapport enzyme/inhibiteur.

Depuis, plusieurs recherches ont été menées et ont abouties à la purification de plusieurs inhibiteurs de sérine peptidases (Tassy *et al.*, 2005 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006a). Ainsi, la grande majorité des inhibiteurs révélés dans le muscle étaient des inhibiteurs de sérine peptidases parmi lesquels de nombreuses serpins, famille très particulière d'inhibiteurs des enzymes à sérine. Les serpins (acronyme pour *serine peptidases inhibitors*), représentent la plus grande classe de protéines inhibitrices des enzymes à sérine largement répandues dans les tissus et cellules de mammifères étudiés à ce jour (Silverman *et al.*, 2001). Certaines sont capables de former des polymères stables alors que d'autres ont la capacité d'inhiber à la fois des cystéine et des sérine peptidases (Gettins, 2002a). Les serpins sont impliquées dans un très grand nombre de fonctions biologiques et elles participent à réguler finement diverses voies protéolytiques impliquées, entre autres, dans la coagulation sanguine, le remodelage des tissus,

la prolifération des métastases, l'inflammation et l'apoptose (Huntington *et al.*, 2000 ; Silverman *et al.*, 2001 ; Gettins, 2002a ; Olson et Gettins, 2011).

Parallèlement plusieurs recherches des gènes codant pour les endopines bovines ont conduit à l'identification de plusieurs gènes codant pour des protéines très homologues aux endopines et toutes apparentées à l'alpha-1-antichymotrypsine humain avec lequel elles présentent une homologie de 75 % (Pelissier *et al.*, 2008). En accord avec les règles de classification proposées par Silverman *et al.* (2001), ces serpins ont été dénommées bovSERPINA3-1 à A3-8. En 2009, Herrera-Mendez *et al.*, ont montré que deux d'entre elles (bovSERPINA3-1 (endopine 1A) et A3-3 (endopine 1B)) étaient capables d'inhiber les caspases initiateuses et exécutrices qui sont les caspases 8 et 3 humaines. Cette propriété permet de penser qu'elles sont des régulateurs du processus de mort cellulaire ou apoptose qui est la première étape de transformation du muscle en viande (Ouali *et al.*, 2006a ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006b).

Le travail entrepris dans le cadre de cette étude en collaboration avec le Dr. A. Ouali, à l'INRA-Theix de Clermont-Ferrand en France, visait deux objectifs essentiels :

1. Vérifier si l'alpha-1-antichymotrypsine (SERPINA3) humaine était capable d'inhiber la caspase 3 de façon aussi efficace que les bovSERPINA3-1 et A3-3. Pour cela, nous nous devions purifier cette protéine à partir du sérum humain, fluide contenant des concentrations importantes de serpins A3 aussi bien chez l'homme (Calvin et Price, 1986 ; Whicher *et al.*, 1991) que chez le bovin (Tassy *et al.*, 2005).

2. Dans le cadre du projet inter-universitaire établi dans le cadre du programme bilatéral Tassili mis en place entre l'INRA-Theix en France et l'INATAA, l'un des objectifs est le transfert des techniques et d'outils permettant aux chercheurs de développer sur place des recherches de haut niveau. Au cours des deux premières années de ce contrat nous avons ainsi mis en place les techniques d'électrophorèse et du western blot qui sont maintenant utilisées en routine à l'INATAA. L'étape suivante était le transfert des techniques de fractionnement et de purification des protéines qui devraient intéresser plusieurs chercheurs de l'INATAA. L'étude mise en place dans le cadre de ce travail permettra l'utilisation de diverses techniques de purification nécessitant l'exploitation de divers supports chromatographiques et la mise en place d'une stratégie (protocole) de purification d'une protéine particulière, l'alpha-1-antichymotrypsine humaine.

Enfin, sur un plan purement scientifique, ce travail permettra de préciser quelques fonctions biologiques de ces serpins.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

« Apoptose et la maturation des viandes »

L'hypothèse de l'implication de l'apoptose ou la mort cellulaire programmée (MCP) dans les modifications *postmortem* du muscle en viande a été proposée pour la première fois par Ouali *et al.* (2006a). Elle a été émise à partir d'un constat simple : lors de l'abattage de l'animal, l'exsanguination de la carcasse prive les cellules de nutriments et d'oxygène. Le stress engendré va déclencher ainsi la mort cellulaire, les cellules s'engagent alors dans une voie de mort programmée. L'apoptose serait donc un processus précoce intervenant dans la mise en place de la tendreté (Ouali *et al.*, 2006a,b). Ainsi, selon cette théorie il existerait une étape supplémentaire dans l'évolution de la tendreté, avant la phase de *rigor mortis*, durant laquelle l'apoptose a un rôle prépondérant (figure 01).

Selon ces auteurs, les premières peptidases actives lors de l'abattage seraient les caspases dont la fonction première est de cliver les protéines cellulaires *in vivo*. Leurs substrats dans la cellule seraient nombreux (de l'ordre de centaines de protéines différentes dégradées), ce qui est comparable à ce qui a été rapporté pour les calpaïnes. Les caspases pourraient donc dégrader des protéines clés dans l'organisation structurale des myofibrilles conjointement avec d'autres peptidases (Nakanishi *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2003).

I.1. L'Apoptose ou Mort Cellulaire Programmée (MCP)

I.1.1. Définition

Le terme d'apoptose ou mort cellulaire programmée a été introduit en 1972 pour définir une forme de mort cellulaire morphologiquement, biochimiquement et moléculairement différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire connue jusqu'alors (Kerr *et al.*, 1972). Le mot « Apoptose » fait référence à la chute programmée des feuilles caduques en automne : « *Apo* » pour éloignement et « *ptose* » pour chute en grec ancien.

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme (Kerr *et al.*, 1972 ; Fidzianska *et al.*, 1991 ; Meier *et al.*, 2000 ; Dirks et Leeuwenburgh, 2005).

La régulation très stricte de ce programme est essentielle pour s'assurer qu'il est activé uniquement dans la cellule concernée et au bon moment. À l'inverse, la dérégulation du processus apoptotique conduit, chez l'homme, à diverses pathologies comme, par exemple, le(s) cancer(s), les maladies auto-immunes et les maladies neurodégénératives (Ouali *et al.*, 2006a), mais aussi dans certains cas, à une forte létalité (Sanmart *et al.*, 2005).

I.1.2. Rôle physiologique de l'apoptose

Au cours de l'embryogenèse, de nombreuses structures initialement mises en place au cours du développement sont ensuite détruites par apoptose. C'est le cas du canal de Müller qui est détruit chez l'homme, du canal de Wolff qui est détruit chez la femme. Elle participe également à la morphogenèse des doigts où les cellules de l'espace interdigital des doigts d'un embryon disparaissent par apoptose (Wood *et al.*, 2000).

La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à l'apoptose qui assure qu'un nombre correct de cellules souches se différencient. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès et les cellules surnuméraires vont ensuite mourir par apoptose afin de créer un équilibre entre les neurones et les cibles qu'ils innervent (Clarke *et al.*, 1998).

L'apoptose intervient aussi chez l'adulte, elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus. C'est le cas par exemple lors du renouvellement des kératinocytes de la peau (Weil *et al.*, 1999).

I.1.3. Pathologies et dérégulations de l'apoptose

Le dérèglement des mécanismes de régulation de la mort cellulaire par apoptose est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies. Ces dérèglements peuvent conduire à un excès ou à un défaut d'apoptose et caractérisent des types différents de pathologies.

L'excès d'apoptose intervient dans le développement d'anomalies congénitales du développement et de certaines maladies neurodégénératives chroniques comme la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Thompson, 1995 ; Saikumar *et al.*, 1999).

À l'inverse, un défaut d'apoptose a été observé dans le développement de maladies auto-immunes résultant de l'apparition de lymphocytes auto-réactifs qui n'ont pas été éliminés par

apoptose au cours de la sélection clonale lymphocytaire (Saikumar *et al.*, 1999). De même, un défaut ou un blocage dans l'exécution de l'apoptose ont pu être identifiés dans les pathologies virales et dans de nombreux cas de cancers (Thompson, 1995).

I.1.4. Nécrose et Apoptose

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire « désordonnée » (figure 02). En effet au cours de la nécrose, les cellules se gorgent d'eau au point que cela entraîne la lyse de leur membrane plasmique. C'est une véritable explosion cellulaire qui conduit à la libération, dans le milieu environnant, du contenu cytoplasmique. Les organites cellulaires eux aussi gonflent et se vident de leur contenu. L'ADN nucléaire est dégradé, de manière aléatoire, par des endonucléases activées notamment par des serine peptidases. La taille des fragments d'ADN ainsi générés est très hétérogène. La nécrose d'une cellule affecte les autres cellules par l'action des enzymes intracellulaires libérées et ce sont les macrophages qui viennent en renfort pour nettoyer le site. Le résultat est que toute une région de l'organe devra être régénérée après destruction totale des cellules endommagées (Fidzianska *et al.*, 1991 ; Buja *et al.*, 1993 ; Majino et Jons, 1995 ; Ouali *et al.*, 2006a).

Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire « ordonnée », procédant en différentes étapes (figure 02) et ce, quelque soit la voie d'induction (Wyllie *et al.*, 1980 ; Gavrieli *et al.*, 1992 ; Buja *et al.*, 1993 ; Majino et Jons, 1995 ; Martin *et al.*, 1995 ; Bratton *et al.*, 1997 ; Matura *et al.*, 2005 ; Youle et Karbowski, 2005) :

- ✓ Tout d'abord, les cellules en apoptose s'isolent des autres par perte de contact entre elles ;
- ✓ On assiste ensuite à une importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire ;
- ✓ Les mitochondries de la cellule apoptotique subissent plusieurs modifications majeures : libération du cytochrome c dans le cytoplasme, diminution du potentiel membranaire (Ψ_m) et altération de la perméabilité membranaire avec ouverture de pores spécialisés ;
- ✓ Après condensation du noyau, la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases ;
- ✓ Parfois, la membrane plasmique bourgeonne et forme des corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule ;
- ✓ Afin de faciliter la reconnaissance de ces derniers par les phagocytes, la cellule signale son état apoptotique grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire.

I.2. Les peptidases apoptogènes (les CASPASES)

Les peptidases apoptogènes (figure 03) sont des peptidases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique (Asp ou D). Une nouvelle nomenclature proposée par Alnemri *et al.* en 1996, regroupe désormais les peptidases apoptogènes sous le nom de CASPASE (Cysteinyln ASPartate-specific peptidASE). Le C du mot caspase représente la cystéine du centre actif ; « ASP » définit la spécificité stricte de clivage des substrats de ces peptidases après un acide aspartique, l'ensemble étant suivi du suffixe « ASE » qui est le suffixe commun à toutes les enzymes (Alnemri *et al.*, 1996).

I.2.1. Structure schématique des caspases

Dans le monde vivant, toutes les caspases ont une structure très conservée (figure 03) comprenant :

- ✓ un prodomaine N-terminal de taille variable, ayant un rôle primordial dans les interactions protéine-protéine, en particulier avec les protéines régulatrices de l'apoptose ;
- ✓ un second domaine qui deviendra, après clivage, la grande sous-unité (L pour *Large*) et qui porte le site actif de l'enzyme avec un résidu cystéine (C) et un résidu histidine (H) ;
- ✓ un troisième domaine qui deviendra, après clivage, la petite sous-unité (S pour *Small*) et qui a un rôle conformationnel (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004).

Sous cette forme, l'enzyme est inactive. Pour qu'elle soit activée, l'enzyme doit subir une maturation au cours de laquelle le prodomaine N-terminal est éliminé. Puis, deux molécules d'enzyme s'associent pour former un dimère, possédant deux sites actifs en position tête-bêche (figure 04). L'activation des sites actifs ne peut se faire qu'au niveau du dimère après association à des complexes activateurs par l'intermédiaire d'interaction DED-DED (*Death Effector Domains*) ou CARD-CARD (*Caspase Recruitment Domain*) (Herrera-Mendez *et al.*, 2006b ; Ouali *et al.*, 2006b).

I.2.2. Les trois classes des caspases

Chez les mammifères, 14 caspases (figure 03) ont été identifiées à ce jour dont 11 sont présentes chez l'humain (Riedl et Shi, 2004). Ces enzymes jouent un rôle dans l'activation des cytokines comme l'IL-1 β et l'IL-18, l'initiation et l'exécution de l'apoptose. Selon Fuentes-Prior et Salvesen, (2004), trois classes de caspases se distinguent (figure 03) subdivisées selon leur site spécifique de reconnaissance au substrat, selon leur structure ou selon leur fonction biologique :

- ✓ les caspases impliquées dans les processus inflammatoires (caspases 1, 4, 5). La fonction précise de ces caspases est moins bien connue que celles des deux autres classes ;
- ✓ les caspases impliquées dans la phase d'initiation de l'apoptose (caspase 8 (spécifique de la voie des récepteurs de mort), 9 (spécifique de la voie mitochondriale), et 10). Ces caspases sont caractérisées par des prodomaines de grande taille contenant souvent des régions essentielles pour leurs interactions avec d'autres protéines. Par exemple, les prodomaines des caspases 8 et 10 contiennent des Domaines Effecteurs de Mort Cellulaire (*DEDs*). Ces structures vont permettre la liaison de ces caspases aux molécules régulatrices (activateurs ou inhibiteurs) porteuses de domaines similaires au travers d'interactions DED-DED. Certaines autres caspases (caspases 1, 2, 4, 5 et 9) possèdent un Domaine de Recrutement des Caspases (*CARD*). Comme les domaines DED, les domaines *CARD* sont responsables de l'interaction des caspases avec une grande variété de molécules régulatrices par le biais d'interactions *CARD-CARD* ;
- ✓ les caspases effectrices qui déstructurent la cellule lors de la phase d'exécution (caspases 3, 6 et 7). Les caspases effectrices sont activées par clivage et dimérisation comme évoqué précédemment. Par rapport aux caspases initiatrices, celles-ci ont généralement des prodomaines de petite taille (courts) vu qu'elles ne possèdent pas un domaine de recrutement (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004 ; Ouali *et al.*, 2006a,b ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006b). Lorsqu'elles sont activées les caspases effectrices sont directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose et clivent un grand nombre de protéines vitales de la cellule (Cohen, 1997).

I.3. Schéma général de l'apoptose

Plusieurs voies conduisant à l'apoptose ont été mises en évidence. Les principales sont les voies intrinsèque et extrinsèque (figure 05). Il existe également deux voies mineures qui font intervenir le réticulum endoplasmique et le granzyme B. Des revues récentes décrivent en détail ces différentes voies (Dlamini *et al.*, 2004 ; Ouali *et al.*, 2006b ; Rupinder *et al.*, 2007 ; Bao et Shi, 2007 ; O'Brien et Kirby, 2008 ; Jeong et Seol, 2008 ; Sakamaki et Satou, 2009).

Le processus apoptotique se déroule, en général, selon un programme précis, caractérisé successivement par une phase d'initiation, dépendante de la nature du stimulus et du type de cellule, suivie d'une phase d'exécution via les caspases effectrices.

Le stimulus déclenchant le processus d'apoptose peut provenir de l'extérieur (voie extrinsèque) par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs de mort ou de l'intérieur (voie intrinsèque) en réponse à des conditions très défavorables à la survie de la cellule (figure 05). Dès lors, les caspases initiatrices vont être activées au niveau des complexes oligomériques et celles-ci vont à leur tour activer les caspases exécutrices qui vont prendre en charge la déstructuration des cellules (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004 ; Ouali *et al.*, 2006b).

I.4. Mise en place de l'apoptose *postmortem* et conséquences

Comme on l'a vu, la mort dans un tissu vivant peut se produire par nécrose ou apoptose. Puisque la nécrose n'a jamais été rapportée dans le muscle *postmortem*, le déclenchement de la mort cellulaire par le processus apoptotique rapporté très récemment est l'issue la plus probable (Becila *et al.*, 2010).

Quelle que soit l'espèce animale et quelle que soit la technologie d'étourdissement utilisée, la dernière phase du processus d'abattage est la saignée. Dès lors, toutes les cellules et les tissus vont être irréversiblement privés de nutriments et d'oxygène. Face à ces conditions environnementales très néfastes, les cellules musculaires et les autres n'auront pas d'autres alternatives que de s'engager dans la voie de mort cellulaire (figure 01) avec toutes les conséquences d'apoptose déjà élucidées.

En ce qui concerne la science de la viande, rien n'est connu au sujet des mécanismes moléculaires de l'apoptose, mais cette étape préliminaire pourrait être d'importance cruciale dans le muscle *postmortem* puisque tous les changements suivants qui contribuent à la conversion du muscle en viande dépendront fortement de cet événement.

L'apoptose peut être mise en évidence par différentes caractéristiques morphologiques ou biochimiques que la cellule apoptotique subit, tels que le rétrécissement des cellules, les modifications mitochondriales par libération du cytochrome c et le changement du potentiel membranaire (Ψ_m), la dégradation de l'ADN nucléaire en fragments réguliers (due à l'activation d'une endonucléase Ca^{2+}/Mg^{2+} -dépendante), changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines (d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire), et enfin, la dégradation étendue des protéines cytosquelettiques spécifiques, tel que l'actine, présumé être un marqueur potentiel du processus d'apoptose. L'apoptose peut être aussi distinguée des autres types de morts cellulaires par les caractéristiques biochimiques, y compris l'activation de la cascade des caspases.

I.4.1. Signalisation de l'apoptose au niveau du muscle

Qu'a pu être la voie de signalisation menant à l'apoptose des cellules après la saignée ? Une possibilité serait un changement irréversible dans les myofibrilles à la jonction neuromusculaire où des activateurs de la cascade apoptotique pourraient être produits. Une telle prétention est soutenue par la diminution rapide de l'efficacité de la stimulation électrique de basse tension (Valin, 1982) qui résulte d'un changement *postmortem* rapide du système nerveux. De même, la dénervation a été montrée capable d'induire l'apoptose dans le muscle squelettique, un processus souvent lié à une fragmentation des myofibrilles (Adams *et al.*, 2001 ; Liu et Ahearn, 2001). Une autre hypothèse de l'induction de l'apoptose dans le muscle *postmortem* pourrait être le dysfonctionnement des mitochondries (détérioration de la chaîne oxydante, augmentation intracellulaire de la concentration de radicaux libres (ROS), ...etc.) se produisant peu après la mort (Renner, 1999). En effet, le changement des mitochondries pourrait être un autre initiateur de l'apoptose par la libération des facteurs proapoptotiques comme le cytochrome c (Adrian et Martin, 2001).

I.4.2. Caspases et Attendrisage des viandes

Il est bien connu que l'attendrisage des viandes résulte de l'altération de la structure contractile par les enzymes protéolytiques endogènes. Les mécanismes sont donc en majorité de nature enzymatique et impliquent des peptidases endogènes (Sentandreu *et al.*, 2002). Si on considère que la première phase intervenant lors de l'attendrisage des viandes est l'apoptose, on réalise que les peptidases les mieux placées pour altérer la structure contractile, seront bien les caspases puisqu'il s'agit de leur fonction primaire (Ouali *et al.*, 2006b). En outre, *in vitro* les caspases conservent encore 20 à 50 % de leur activité à un pH compris entre 5 et 6 (Stennicke et Salvensen, 1997). Ainsi, les caspases peuvent encore agir dans le muscle *postmortem* durant les phases de *rigor mortis* et de maturation. L'étude de Pulford *et al.* (2009) a confirmée le déclenchement de l'apoptose à la mort de l'animal. Ces auteurs ont montré, chez des animaux présentant un faible pHu, que l'activité des caspases 3 et 7 était plus élevée suggérant un taux d'apoptose plus important. Par ailleurs, le taux d'activité de la caspase 9 est deux fois plus élevé que celui de la caspase 8, indiquant que la voie intrinsèque est privilégiée quelque soit le pHu. D'autres études ont montré que l'activité des caspases n'est pas entièrement perdue pendant le stockage *postmortem* et elles sont capables de cliver plusieurs protéines du muscle *postmortem*, et elles ont aussi le pouvoir de dégrader et d'inactiver les calpastatines (Wang *et al.*, 1998 ; Kemp *et al.*, 2009, 2010).

I.4.3. Stress et Apoptose

Il a été montré que les animaux ayant un comportement « excité », c'est-à-dire stressé, présentent une viande plus dure que des animaux au comportement calme (Voisinet *et al.*, 1997 ; King *et al.*, 2006). Pour empêcher que ce stress n'induisse le phénomène d'apoptose, la cellule peut activer des protéines de choc thermique, les HSPs. Ce sont des acteurs négatifs dans l'établissement de l'apoptose (Beere, 2004). Leur action freinerait la mise en place de ce mécanisme, ce qui, pour certains auteurs, expliquerait pourquoi les animaux stressés présentent une viande plus dure. Les travaux de Bernard *et al.* (2007) ont montré une corrélation positive entre une meilleure tendreté et les niveaux transcriptionnels bas des gènes *DNAJ1* et *HSPB1* codant les protéines Hsp40 et Hsp27, respectivement. Il a été montré que le complexe *DNAJ1/HSP70* inhibe directement l'apoptose en empêchant la protéine proapoptotique Bax qui lorsque transférée à la membrane mitochondriale, elle subit des changements conformationnels déclenchant la libération du cytochrome c, composant essentiel à l'activation de la voie intrinsèque de la caspase 9 (Gotoh *et al.*, 2004). Le fort niveau d'activité de la caspase 9 retrouvé dans les premières heures suivant l'abattage indique que, la voie intrinsèque est privilégiée. Enfin, les changements dans l'activité des caspases 3 et 7 se sont révélés être associés positivement avec le développement d'une viande plus tendre (Kemp *et al.*, 2006 ; Kemp *et al.*, 2010).

I.5. Preuves de la mise en place de l'apoptose

Plusieurs chercheurs ont focalisé leur attention pour comprendre les mécanismes impliqués dans les changements morphologiques dus à la mort cellulaire par apoptose. Différentes constatations viennent appuyer aujourd'hui la théorie de la mise en place de l'apoptose dans le muscle *postmortem*. Parmi elles, on assiste à une dégradation caspasique de certains composants clés du cytosquelette, particulièrement les filaments d'actine.

I.5.1. Actine et ses fonctions

Les myofilaments fins sont constitués de trois protéines : l'actine (20 – 25 % des protéines myofibrillaires totales), la tropomyosine et les troponines (figure 06) (Gordon, 2000). L'actine est la seconde protéine la plus abondante des myofibrilles et elle est très abondante dans beaucoup de cellules eucaryotiques et son ubiquité est complètement justifiée. Le squelette d'actine constitué par les filaments d'actine et une myriade de protéines actine-liée est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires. Elle exécute presque n'importe quelle activité cellulaire qui exige un mouvement ou un changement de conformation cellulaire, même

partiellement (Atencia *et al.*, 2000 ; Disanza *et al.*, 2005). Elle est identifiée notamment, pour être responsable des propriétés visco-élastiques des cellules.

L'actine est une protéine globulaire dont le diamètre est de 55 Å possédant un acide aminé rare, la 3-méthyl histidine. L'actine ayant un poids moléculaire de ~ 43 kDa est constituée d'une chaîne polypeptidique hautement conservée (376 résidus) dont la séquence est connue. Elle existe sous deux formes, l'actine globulaire (actine G) sous forme de monomères dispersés et qui peuvent s'assembler pour donner une forme filamenteuse (actine F) sous forme de polymères (Dingová *et al.*, 2009 ; Chhabra *et al.*, 2009). Les molécules au nombre de 350 environ sont placées bout à bout et forment deux brins torsadés en hélice. Les myofilaments fins sont formés par l'association de cette double hélice et de deux protéines régulatrices (Poirier *et al.*, 1999). Les filaments d'actine sont des structures polaires et ont donc deux extrémités structurellement et biochimiquement distinctes.

L'actine monomérique (actine G) domine à une concentration ionique très basse, et des assemblages spontanés ont lieu juste après l'augmentation de la concentration ionique pour former l'actine filamenteuse (actine F). L'actine F, est une protéine cytosquelettique importante impliquée dans beaucoup de fonctions physiologiques, y compris la motilité, l'adhérence, la division cellulaire, l'endocytose, la phagocytose, l'établissement et le maintien de la polarité, la morphogénèse des cellules et leur entretien (Chhabra *et al.*, 2009 ; Carlier et Pantaloni, 2010).

L'actine, qui est connue pour toutes ses fonctions et en particulier d'être un composant cytosquelettique, possède également d'autres fonctions importantes au sein du noyau des cellules. D'ailleurs l'actine nucléaire est impliquée dans divers processus tels que le remodelage de la chromatine, la régulation transcriptionnelle, les transports nucléaires (Vartiainen *et al.*, 2007), et la transcription des trois classes d'ARN polymérase eucaryotiques (Ye *et al.*, 2008). La variété de fonctions cytoplasmiques du cytosquelette d'actine est basée sur sa capacité d'adaptation aux diverses structures selon les conditions ioniques et l'interaction avec certaines protéines spécifiques (Pak *et al.*, 2008).

I.5.2. Dégradation de l'actine et l'apoptose

Le processus apoptotique se compose d'un ordre d'événements cellulaires finement régulés. Sans compter la dégradation de l'ADN nucléaire et l'activation des caspases, caractéristiques apoptotiques déjà citées, d'autres événements cellulaires sont impliqués.

Parmi ces événements, consistant à dégrader des protéines cytosquelettiques au cours de l'apoptose et qui a suscité beaucoup d'attention est celui de la dégradation d'actine (Atencia *et al.*, 2000). L'actine cytosquelettique, un élément essentiel de la cellule, semble être impliqué dans le phénomène de la mort apoptotique des cellules (Atencia *et al.*, 2000). Plusieurs études ont indiqué qu'elle est clivée pendant le phénomène d'apoptose (Asumendi *et al.*, 2000 ; Bursch *et al.*, 2000). Le clivage de l'actine se produit en même temps que la dégradation d'ADN nucléaire (Suarez-Huerta *et al.*, 2000).

Il est bien connu aujourd'hui que la dégradation de l'actine est un résultat d'un clivage protéolytique par les peptidases. Parmi elles, le rôle des caspases, a suscité une attention considérable due à leurs effets dans l'initiation et l'exécution du phénomène d'apoptose. Plusieurs lignes d'évidence soutiennent ce rapport causal entre la rupture des filaments d'actine et l'apoptose :

- ✓ Premièrement, dans certaines cellules, chaque cellule ayant un noyau réduit en fragments, indicateur du changement d'ADN lors d'apoptose, montre également l'actine F complètement désorganisée (Van De Water *et al.*, 1996) ;
- ✓ Deuxièmement, la rupture cytosquelettique dans les cellules apoptotiques favorise les dommages de la membrane mitochondriale, et augmente la libération du Cyt c, activant la caspase 9, qui à son tour lance la cascade caspasique (Yamazaki *et al.*, 2000) ;
- ✓ Troisièmement, il y a une association physique entre l'actine et la DNase I (Kabsch *et al.*, 1980). L'actine intacte peut lier et séquestrer la DNase I, une endonucléase qui induit la fragmentation de l'ADN, de sorte que la rupture de l'actine active les DNases et provoque la dégradation nucléaire, une forte caractéristique de l'apoptose (Kayalar *et al.*, 1996) ;
- ✓ Quatrièmement, le clivage cytosquelettique accélère ainsi l'activation de la caspase 3 (Yamazaki *et al.*, 2000).

Le clivage de l'actine F par la caspase activée est étudié *in vitro* et *in vivo*, et les effets peuvent être empêchés par certains inhibiteurs de caspases (Mashima *et al.*, 1995, 1997, 1999). Il a été constaté que la caspase activée, n'assure pas seulement la catalyse directe de la dégradation d'actine, mais active également d'autres enzymes intracellulaires qui, à leur tour visent l'actine intracellulaire (Sabourin *et al.*, 2000). Le déclenchement des changements de l'actine F ayant lieu lors de l'apoptose varient avec le type de cellules et les inducteurs

apoptotiques (Suarez-Huerta *et al.*, 2000), cependant, on admet que le clivage de l'actine F est un événement qui s'installe à un stade très avancé de l'apoptose (Maruyama *et al.*, 2000).

Une autre étude a démontrée la formation des filaments enrobés dans des corps apoptotiques (van Engeland *et al.*, 1997). Dans les études montrant l'ordre de la cascade apoptotique, Maruyama *et al.* (2000) ont signalé que les changements cytosquelettiques sont parmi les événements les plus tôt, précédant d'autres changements apoptotiques, tels que le bourgeonnement de la membrane et l'activation des caspases.

Par ailleurs, il a été constaté que le processus du bourgeonnement ayant lieu dans les cellules apoptotiques, menant par la suite à la fragmentation des cellules, exige la neopolymérisation de l'actine (Suarez-Huerta *et al.*, 2000) et semble être dynamiquement régulé (Rao *et al.*, 1999). En outre, suivant son clivage, le fragment d'actine lui-même peut induire des changements morphologiques (Mashima *et al.*, 1999) et plusieurs études ont montré qu'il s'agit d'un changement biphasé, où une première polymérisation s'installe, puis suivie d'une dépolymérisation.

I.5.3. Les peptidases apoptogènes et clivage de l'actine

L'actine est bien connu être un substrat des caspases (Kayalar *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 1997) et des calpaïnes (Brown *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1998) dans certaines cellules modèles. Un lien direct entre la dépolymérisation d'actine et la dégradation de l'ADN a été ainsi suggéré (Kayalar *et al.*, 1996). Bien qu'elle présente une résistance au clivage *in vivo* dans certains modèles (Song *et al.*, 1997), le criblage de l'actine et d'autres filaments intermédiaires est responsable en partie de la dégradation de la morphologie cellulaire pendant la phase exécutive de l'apoptose. Cette dégradation peut perturber la tension mécanique requise et mène à des signaux qui peuvent faciliter le détachement cellulaire.

Le lien qui existe au fait, entre la caspase 3 et l'actine a été intensivement étudié et il semble que la caspase 3 clive la gélsoline et les fragments produits perturbent les filaments d'actine (Kothakota *et al.*, 1997). Le *Gas2* (*growth arrest-specific gene*), qui est un composant de la structure des microfilaments auquel l'actine se lie, est considéré comme substrat, et est clivé par la caspase 3 (Sgorbissa *et al.*, 1999). De plus, l'actine est clivée par la caspase (figure 07) principalement au niveau de deux emplacements, entre Asp¹¹ et Asn¹² et entre Asp²⁴⁴ et Gly²⁴⁵. Un site du clivage mineur entre Glu¹⁰⁷ et Ala¹⁰⁸ est également identifié (Kayalar *et al.*, 1996).

Chapitre II

« Les marqueurs biologiques et maîtrise de la tendreté de la viande »

La tendreté de la viande est le critère le plus dommageable vis-à-vis de la consommation, car c'est le principal motif de choix pour le client. Elle est très variable, car résultante d'une multitude de caractéristiques du muscle, tissu complexe. Par voie de conséquence, il est difficile pour la filière viande bovine de maîtriser la variabilité de la tendreté et le résultat est une baisse de la consommation. Il est donc nécessaire d'apporter des outils à la filière afin de maîtriser la tendreté de la viande.

II.1. La tendreté de la viande

Avant d'aborder les différents marqueurs de tendreté et le rôle que jouent les inhibiteurs de sérine peptidases, considérés comme prédicteurs majeurs de la tendreté de la viande, il est souhaitable de faire un bref aperçu sur la tendreté de la viande et sa maturation.

La maturation des viandes, période pendant laquelle s'élaborent les qualités organoleptiques du produit final, prend en compte l'évolution positive et négative de ces caractéristiques et les mécanismes qui y contribuent. Parmi ces qualités, la tendreté, et de façon plus générale la texture de la viande, reste, encore aujourd'hui, la qualité la plus recherchée par les consommateurs. La relation entre protéolyse *postmortem* des protéines musculaires et texture finale de la viande est largement documentée (Ouali, 1990a,b ; Koohmaraie, 1992).

La tendreté est considérée comme une propriété organoleptique qui traduit la facilité avec laquelle la structure de la viande peut être désorganisée au cours de la mastication (Ouali *et al.*, 2006a). A l'opposé, la dureté de la viande exprime la résistance qu'elle offre au tranchage ou à la mastication.

L'attendrissage de la viande au cours de sa conservation à l'état réfrigéré est le résultat d'une altération des structures musculaires et de la structure myofibrillaire plus particulièrement par les peptidases endogènes, le tissu conjonctif n'évoluant que très peu durant cette phase. Différents systèmes protéolytiques semblent être impliqués dans ce processus de dégradation de la structure contractile dont les plus connus sont les calpaïnes, les

cathepsines, le protéasome, les serine peptidases et, plus récemment les caspases, famille de cystéine peptidases responsables de la dégradation des structures cellulaires dans le cadre de la mort des cellules par apoptose (Sentandreu *et al.*, 2002 ; Ouali *et al.*, 2006b).

II.2. Les marqueurs biologiques de la tendreté

La tendreté de la viande présente une variabilité forte et non contrôlée. C'est un ensemble de plusieurs phénotypes correspondant à une appréciation humaine (Guillemin *et al.*, 2009). Le défi principal de la science de la viande en absence de tests de prédiction est d'identifier des marqueurs biologiques de la tendreté qui permettront :

- ✓ la classification des carcasses dans des groupes de qualité ;
- ✓ l'ajustement des prix à la qualité prédite ;
- ✓ et de maîtriser principalement le critère de cette qualité sensorielle, exigence majeure par les consommateurs.

Un marqueur biologique peut être défini de façon générale comme étant une molécule biologique associée à un phénotype particulier, et qui peut être aisément utilisée afin de visualiser ce dernier (Guillemin, 2010). Deux types de marqueurs biologiques peuvent être distingués : les marqueurs génétiques et protéiques.

Afin de répondre à une demande de la filière viande, divers programmes de génomique fonctionnelle (transcriptomique et protéomique) ont identifié des marqueurs potentiels de la tendreté (Hocquette *et al.*, 2007b) qui seront développés en détails dans ce qui suit.

II.2.1. Les marqueurs génétiques

Un marqueur génétique est un segment d'ADN aisément repérable, soit par la nature même de sa séquence, soit par le produit de son expression. Un marqueur génétique est donc un *locus* de l'ADN existant sous plusieurs formes ou allèles au sein d'une espèce, ce qui aboutit à un polymorphisme (Schibler *et al.*, 2000).

Il existe deux catégories de marqueurs :

- ✓ Les motifs répétés, qui consistent en des variations du nombre de répétitions (exemple des minisatellites et des microsatellites).
- ✓ Les mutations ponctuelles ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, un tous les kb chez les mammifères) qui consistent en des changements de quelques bases dans la séquence de l'ADN (Guillemin, 2010).

De multiples techniques de génomique sont disponibles afin d'analyser ces marqueurs. L'utilisation des techniques récentes de génomique fonctionnelle devrait faciliter l'identification de nouvelles caractéristiques musculaires (Hocquette *et al.*, 2005). Cette approche a pour objectif de détecter les gènes dont les différences d'expression au niveau protéique (étude du protéome) ou ARNm (étude du transcriptome) sont associées à la variabilité des caractéristiques qualitatives des muscles et des viandes (Figure 08).

Par ces approches de génomique fonctionnelle, sont étudiés des gènes connus codant des protéines myofibrillaires ou collagéniques ou encore des enzymes des métabolismes énergétique et protéique. Des gènes aux fonctions biologiques encore inconnues sont également étudiés (qui peuvent être considérés comme de nouveaux prédicteurs moléculaires).

Dans les recherches portant sur les caractères phénotypiques, l'identification de gènes impliqués dans l'expression des caractères d'intérêt est d'un atout important. De tels gènes sont qualifiés de QTL (*Quantitative Trait Loci*) lorsque leur variation allélique est associée à un caractère phénotypique quantitatif. Différentes études ont mis en évidence des polymorphismes dans certains gènes dont l'expression agit sur la tendreté. Ces gènes ont été proposés comme étant des marqueurs et certains sont ainsi exploités commercialement (Guillemin, 2010).

II.2.2. Les marqueurs protéomiques

Les différents travaux menés sur la tendreté de la viande ont permis aussi d'identifier des marqueurs protéomiques. La protéomique est l'analyse du contenu protéique exprimé par un génome (Bendixen, 2005). L'analyse protéomique peut être appliquée à la recherche de prédicteurs ou biomarqueurs de la qualité sensorielle de la viande.

Un marqueur protéique ou protéomique peut être défini comme une protéine dont la présence et/ou l'activité sont responsables d'un phénotype recherché, et qui est facilement visualisable (Guillemin *et al.*, 2009 ; Guillemin, 2010).

Il est intéressant de noter que les niveaux d'abondance des protéines Hsp27 et $\alpha\beta$ -crystalline ont été trouvés corrélés à la tendreté dans plusieurs études indépendantes de protéomique (Bouley, 2004, Herrera-Mendez *et al.*, 2006b, Morzel *et al.*, 2008). Chez l'animal vivant, l'importante quantité de Hsp27 protège l'actine de la dégradation. Toutefois, après l'abattage la protéolyse de l'actine augmente. En effet, la Hsp27 empêche l'agrégation protéique et favorise ainsi l'accès des peptidases à leurs cibles. Ainsi, c'est est une bonne candidate pour constituer un marqueur pertinent de la tendreté, une haute concentration de cette

protéine chez l'animal vivant étant liée à une meilleure tendreté après maturation. Le rôle de l' $\alpha\beta$ -crystalline est similaire à celui de la Hsp27. Les données de Morzel *et al.* (2008) montrent que la quantité de protéines dégradées au cours de la maturation augmente pour l'actine, la créatine kinase, l' $\alpha\beta$ -crystalline et la Hsp27.

D'autre part, l'étude réalisée sur le LT de taurillons de race Blonde d'Aquitaine a montré que la quantité de succinate deshydrogénase (SDH, enzyme mitochondriale du métabolisme oxydatif) est corrélée positivement à la tendreté. Cette enzyme du cycle de Krebs pourrait être un marqueur biologique de la tendreté, ce qui est en accord avec les résultats d'une étude protéomique conduite sur une race Charolaise (Hocquette *et al.*, 2007b).

Des études faites par des analyses protéomiques (gels 2DE, spectrométrie de masse) portant sur le muscle bovin *Longissimus dorsi* 36 heures *postmortem*, ont permis la visualisation de 7 bandes sur gel 2DE qui sont corrélées positivement avec la tendreté à 7 jours après abattage. Parmi celles-ci, deux ont été identifiées comme étant des fragments de chaîne lourde de myosine bovine. Ces résultats montrent que la dégradation des protéines myofibrillaires, est un acteur important de la tendreté de la viande (Sawdy *et al.*, 2004).

Une comparaison de profils protéomiques a été effectuée sur deux muscles bovins, le *Longissimus dorsi* (LD, le plus tendre), et le *Semitendinosus* (ST, le plus dur). Il en ressort que 13 (LD) et 18 (ST) spots protéiques sont différenciellement exprimés entre le moment de l'abattage (T = 0) et 24 heures après (T = 24). Au sein des deux muscles, il y a une diminution de cofiline (connue pour contrôler la polymérisation de l'actine), du substrat de la protéine mitochondriale ATP-dépendante SP-22, des Hsp27 et Hsp20 (Jia *et al.*, 2006).

Ces différents travaux de protéomique accomplis ont montré l'importance et la fiabilité de l'approche en « omique » dans l'étude et l'analyse de la tendreté. Ainsi, les programmes d'analyses transcriptomiques et protéomiques, mis en place depuis plusieurs années, ont permis l'analyse de nombreux profils de muscles bovins et de relier le phénotype tendreté (données physiologiques et biochimiques) avec l'expression des gènes (données transcriptomiques et protéomiques). Cette approche intégrative a permis de constituer une liste alarmante de marqueurs biologiques de la tendreté.

Récemment des investigations biochimiques visant à identifier des marqueurs biologiques de la tendreté de la viande ont démontré qu'à 6 jours *postmortem*, et parmi une trentaine de variables biologiques et physico-chimiques susceptibles d'expliquer la variabilité de l'attendrissage de la viande, parmi ces paramètres mesurés et apparaissant comme le plus

discriminant pour la prédiction de tendreté finale de la viande, le taux d'inhibiteurs de sérine peptidases (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997 ; Ouali, 1999 ; Zamora *et al.*, 2005).

A la lumière de ces données disponibles dans la littérature, aujourd'hui on doit considérer non seulement les enzymes protéolytiques mais également leurs inhibiteurs endogènes, qui sont souvent de meilleurs marqueurs prédictifs de la tendreté de la viande. La recherche actuelle doit se focaliser alors sur d'autres systèmes protéolytiques que ceux seulement des calpaïnes et cathepsines ; et une série de nouveaux systèmes protéolytiques et de leurs inhibiteurs doit être prise en considération et c'est le cas :

- ✓ des serpins (inhibiteurs de sérine peptidases), que nous avons présenté en détails dans un chapitre à part et dans le reste de ce chapitre comme marqueurs de tendreté ;
- ✓ et les caspases qui sont des enzymes jamais considérées dans la science de la viande et qui sont spécialisées dans la dégradation des structures cellulaires et ayant un rôle important dans les processus d'apoptose.

II.3. Les Inhibiteurs endogènes des protéases et la science de la viande

L'action des peptidases est soumise à une régulation très fine qui module leur activité. Il existe différents types d'inhibiteurs, de nature protéique, spécifiques d'un type de peptidases, responsables de cette fine régulation. La majorité des inhibiteurs de peptidases connus et caractérisés jusqu'à ce jour, est constituée d'inhibiteurs de sérine peptidases (Bode et Huber, 1992). Les inhibiteurs de peptidases à sérine ont été d'abord étudiés dans le plasma sanguin (Travis et Salvesen, 1983) avant de l'être dans d'autres tissus ou organismes.

Les inhibiteurs peuvent être divisés en deux groupes d'après le type d'interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur : les inhibiteurs non-covalents et les inhibiteurs covalents. Les premiers réagissent de façon réversible avec l'enzyme pour réduire sa vitesse de réaction alors que les seconds sont souvent référés aux inhibiteurs irréversibles et réagissent de façon covalente avec l'enzyme pour diminuer son efficacité. Ces derniers sont souvent dénommés inhibiteurs suicides, puisqu'ils sont hydrolysés au cours de ce processus et ne pourront donc pas resservir (Smith et Simons, 2005).

Les inhibiteurs de peptidases à sérine sont répartis en 10 familles issues du nom du découvreur ou du nom du premier inhibiteur décrit. Ils peuvent être regroupés en fonction :

- ✓ de leur homologie de séquence ;
- ✓ de la nature, le nombre et la localisation du ou des site(s) actif (s) ;
- ✓ de leur homologie dans le mécanisme d'interaction avec les enzymes cibles ;
- ✓ et de leur nombre de ponts disulfures (Laskowski et Kato, 1980).

Dans un homogénat musculaire, ces inhibiteurs peuvent être mis en évidence en utilisant la trypsine, enzyme modèle sécrétée dans le pancréas des mammifères (Ouali *et al.*, 1986).

Les évolutions *postmortem* des variables biologiques et de la dureté myofibrillaire de la viande varient énormément en fonction des animaux, bien qu'ils soient zootechniquement similaires. Une cause possible de cette variabilité peut être la différence dans le contenu d'enzymes et plus probablement dans le rapport enzyme/inhibiteur, un paramètre reflétant l'efficacité des systèmes protéolytiques (Ouali, 1991 ; Valin, 1995 ; Zamora, 1997).

En 1990, Ouali et Talmant mettaient en évidence que le taux d'inhibiteurs des peptidases endogènes était un meilleur prédicteur de la tendreté de la viande que le taux des enzymes cibles elles-mêmes. Cette observation a conduit à une étude plus systématique des inhibiteurs dans le tissu musculaire pour essayer d'identifier ces derniers et de préciser la nature de leurs peptidases cibles *in vivo*, protéases susceptibles de jouer un rôle primordial dans le processus d'attendrissage des viandes (Ouali et Talmant, 1990). Cela a été démontré pour la calpastatine (Ouali et Talmant, 1990), inhibiteur spécifique des calpaïnes ubiquitaires (μ - et m-calpaïnes) et, plus récemment, pour les inhibiteurs de sérine peptidases (Zamora *et al.*, 1996 ; 2005). L'intérêt porté aux inhibiteurs est lié au fait que, s'il n'y a pas de relation directe entre le taux d'enzymes musculaires et la vitesse d'attendrissage, par contre il existe une bonne corrélation entre cette même caractéristique et le rapport enzyme/inhibiteur.

Cette hypothèse a été soutenue par des résultats montrant que parmi 29 variables biologiques et physico-chimiques susceptibles d'expliquer la variabilité de l'attendrissage de la viande (la teneur en inhibiteurs des sérine peptidases, la vitesse de chute de l'activité μ -calpaïne, l'amplitude et la vitesse de chute du pH, l'amplitude d'augmentation de l'osmolarité, le métabolisme glycolytique des muscles,...), la teneur en inhibiteurs de sérine peptidases occupe la première place et leur taux dans le tissu musculaire était le meilleur indice de prédiction de la tendreté de la viande (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997 ; Ouali, 1999 ; Zamora *et al.*, 2005).

Au plan quantitatif, la grande majorité de ces inhibiteurs étaient des serpins. Les serpins (acronyme pour *serine peptidases inhibitors*), représentent une classe de protéines

inhibitrices capables d'inactiver à la fois les serine et les cystéine peptidases, développées en détails dans le chapitre III. Elles sont largement répandues dans les tissus et cellules de mammifères étudiés à ce jour (Silverman *et al.*, 2001), mais concernant le muscle squelettique, peu de données sont actuellement disponibles. Ces inhibiteurs ont été intégrés dans des modèles de prédiction de la tendreté de la viande (Zamora *et al.*, 2005).

II.4. Implication des serpinines musculaires dans la tendreté de la viande

Bien que les serpinines sont abordées dans un chapitre à part, toutefois, on a jugé intéressant et plus commode de présenter cette partie concernant leur implication dans la tendreté de la viande dans ce présent chapitre.

L'hypothèse de l'existence d'inhibiteurs de sérine peptidases dans le muscle est contestable dans la mesure où l'existence des serine peptidases dans la cellule musculaire n'est pas encore bien établie. La présence de ces inhibiteurs pourrait s'expliquer soit par la présence de cellules provenant du plasma et qui contamineraient l'extrait au cours de l'extraction, soit parce qu'ils sont des inhibiteurs du protéasome, qui possèdent une activité sérine protéinase d'où leur présence dans le muscle.

Bien que l'existence de ces inhibiteurs dans le muscle ait été révélée dans les années 1970 (Nogushi et Kandatsu, 1969), peu de travaux ont été réalisés sur le tissu musculaire. Dès 1981, Dalhmann et ses collaborateurs ont isolé du muscle squelettique de rat, des inhibiteurs de sérine protéinase qui pourraient avoir un rôle dans le contrôle de l'activité protéolytique intracellulaire (Dalhmann *et al.*, 1981). Juste après, quatre activités inhibitrices dans la fraction cytosolique du muscle squelettique de rat ont été mises en évidence (Kuehn *et al.*, 1984). Trois de ces activités correspondent à des protéines de 50, 65 et 65 kDa et sont des homologues de la famille des serpinines purifiées à partir du sérum de rat. La quatrième fraction, qui n'a été caractérisée que très partiellement, présente un poids moléculaire voisin de 15 kDa. D'autres ont été aussi isolés dans le muscle de plusieurs espèces, chez les poissons (Toyohara *et al.*, 1983 ; Hara et Ishihara, 1986) et chez le poulet (Kim *et al.*, 1992).

Dans le tissu musculaire, différentes serpinines ont été identifiées. Parmi elles, un certain nombre a été localisé au niveau de la jonction neuromusculaire. C'est le cas de la Protéase Nexin-1, un inhibiteur de la thrombine synthétisé uniquement après la fusion des myoblastes en myotubes (Festoff *et al.*, 1991 ; Verdière-Sahuqué *et al.*, 1996 ; Akaaboune *et al.*, 1998), l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) (Fibbi *et al.*, 2001), la kallistatine qui se lie à la kallikréine (Richards *et al.*, 1997), l' α_1 -ACT (SERPINA3), la kunine et la Protease Nexin

II, connue sous le nom de précurseur de la protéine β -amyloïde (Akaaboune *et al.*, 1995). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, la serpine SRP-3 inhibe des peptidases à sérine de type chymotrypsine (Pak *et al.*, 2006). Un inhibiteur de protéase I a été retrouvé dans le muscle de 6 espèces piscicoles phylogénétiquement différentes (Pérez-Borla *et al.*, 1998).

Parmi les séries des inhibiteurs à sérine fractionnés du muscle squelettique de bovin (Ouali *et al.*, 1995 ; Rouchon, 1995 ; Tassy, 1998), deux serpinines ont été purifiées et identifiées par leurs séquences N-terminal comme l'antithrombine III et l'Endopine (Tassy, 1998). Deux autres serpinines de la famille des SERPINA3 ont été extraites du muscle squelettique bovin et caractérisées biochimiquement (Tassy *et al.*, 2005 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006a). Ces deux serpinines initialement nommées mEndopine 1A et 1B sont aujourd'hui répertoriées dans les banques de données protéiques sous le nom de bovSERPINA3-1 et bovSERPINA3-3, respectivement. L'origine du terme Endopine vient au fait de la découverte initiale de ces serpinines dans les cellules chromaffines endocrines (Hwang *et al.*, 1999a).

A ce jour, peu d'études ont été menées sur les relations existantes entre les inhibiteurs de peptidases à sérine et le phénomène de tendreté de la viande. Signalons cependant l'étude de Zamora *et al.* (1996) qui montre l'existence d'une corrélation négative entre l'activité des inhibiteurs de peptidases à cystéine et à sérine et la tendreté de la viande dans les muscles *Longissimus lumborum* et *thoracis*. De plus, parmi les 29 variables testées, le taux des serpinines constitue le meilleur facteur de prédiction de la dureté de la viande (Zamora *et al.*, 2005). Ainsi, à 6 jours *postmortem*, 70 % de la variabilité de la dureté de la viande peut être expliquée par seulement 6 variables biologiques dont la concentration en peptidases à sérine mesurée à la mort de l'animal, et qui représente le facteur le plus significatif.

En conclusion, la filière viande bovine se montre intéressée par l'exploitation des propriétés de ces différents marqueurs biologiques cités sous la forme d'un test commercial de prédiction de la tendreté du vivant de l'animal. Cependant, le profil d'expression de ces marqueurs, au niveau protéique, est fortement dépendant des conditions de production : muscle choisi, type d'animal, et conditions d'élevage. Il est donc important de connaître quelles conditions peuvent être favorables ou défavorables à l'expression des marqueurs protéiques potentiels de la tendreté. Cette qualité sensorielle pourrait ainsi être mieux gérée tout au long de la vie de l'animal.

Chapitre III

« La superfamille des serpinines : structure, fonction et évolution »

III.1. Introduction aux Serpinines

L'activité inhibitrice des peptidases du plasma est étudiée depuis 1894 par Fermi et Pernossi (Engh *et al.*, 1993). Les inhibiteurs de peptidases constituent, après l'albumine et les immunoglobulines, le troisième groupe fonctionnel du plasma humain. Ils représentent près de 10 % de l'ensemble des protéines circulantes (Travis et Salvesen, 1983). La majorité des inhibiteurs de peptidases connus et caractérisés jusqu'à ce jour est constituée d'inhibiteurs de peptidases à sérine (Bode et Hubert, 1992).

L'identification et la découverte de la superfamille des SERPINES acronyme pour SERine Peptidases INHibitorS (inhibiteurs des peptidases à sérine) remontent aux années 80, lorsque Hunt et Dayhoff ont noté des homologies de séquences de 30 – 50% entre deux protéines sériques : l'antithrombine et l' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT ou α_1 -PI), et l'ovalbumine une protéine du blanc d'œuf (Hunt et Dayhoff, 1980).

Depuis, la caractérisation génétique a révélée un large groupe de gènes appartenant à cette superfamille qui dérivent probablement d'une duplication génétique d'un gène ancestral commun il y'a environ 500 millions d'années (Carrell *et al.*, 1987), ce qui a amené Carrell et Travis à introduire pour la première fois le terme SERPIN pour désigner au départ la famille des inhibiteurs de peptidases à serine du plasma (Carrell et Travis, 1985).

Cette dénomination est basée sur les résultats obtenus prouvant que les membres de cette famille étaient des inhibiteurs de sérine peptidases. Ne mentionner, par contre, que leur rôle d'inhibiteurs de peptidases de type serine serait restreindre les serpinines à une seule de leurs diverses fonctions. Plusieurs serpinines ont aussi la capacité d'inhiber des peptidases de type cystéine comme les caspases ou des peptidases de type papaine (Ray *et al.*, 1992 ; Schick *et al.*, 1998a; Irving *et al.*, 2002). D'autres sont des serpinines non-inhibitrices aux rôles diversifiés comme le transport hormonal (Zhou *et al.*, 2006), l'inhibition de tumeurs (Khalkhali-Ellis, 2006) ou le repliement des protéines (chaperonnes) (Clarke *et al.*, 1991 ; Hirayoshi *et al.*,

1991). Cependant, la nomenclature a été maintenue, vu que son utilisation était devenue si bien établie.

La superfamille des serpinines constitue la plus grande classe des inhibiteurs de peptidases à sérine/cystéine connue (Silverman *et al.*, 2010). Actuellement, elle englobe plus de 3000 membres distribués dans les trois règnes du monde du vivant, les archaebactéries (Archées), les eubactéries et les eucaryotes, ainsi que dans quelques virus (Irving *et al.*, 2000 ; Silverman *et al.*, 2001 ; Law *et al.*, 2006 ; Whisstock *et al.*, 2010 ; Olson et Gettins, 2011).

Les serpinines sont des glycoprotéines globulaires, composées de chaînes de polypeptide et d'un nombre variable d'oligosaccharides (Potempa *et al.*, 1994), d'une masse moléculaire comprise entre 40 et 60 kDa et ayant des séquences variant de 350 – 400 acides aminés (Irving *et al.*, 2000 ; Stein et Carrell, 1995 ; Gettins, 2002a).

Chez l'homme, il y a 36 serpinines codées par le génome, beaucoup d'entre-elles leur rôle est déjà connu (Olson et Gettins, 2011) (Tableau 01), et qui possèdent une panoplie de fonctions intervenant dans divers processus physiologiques impliqués, entre autres, dans la coagulation sanguine, l'activation du complément, la fibrinolyse, la mort cellulaire programmée (apoptose), le développement et l'inflammation (Gettins, 2000 ; Huntington *et al.*, 2000 ; Silverman *et al.*, 2001 ; Gettins, 2002a), et certaines serpinines peuvent jouer un rôle suppresseur de tumeurs (Zou *et al.*, 1994).

III.2. Classification et nomenclature de la superfamille des serpinines

Selon la base MEROPS, les serpinines font partie de la famille d'inhibiteur I4 (figure 09) (Rawlings *et al.*, 2004a,b). Le Comité international de la nomenclature des serpinines a adopté un système d'appellation se référant au clade dont une serpinine donnée diverge, cette classification systématique est basée sur leur parenté évolutionnaire déterminée par une analyse phylogénétique effectuée par Irving *et al.* qui ont subdivisé les serpinines en 16 clades (de A à P), et 10 serpinines orphelines (tableau 02) (Irving *et al.*, 2000 ; Silverman *et al.*, 2001).

Le symbole du gène utilisé est « *SERPIN* », suivi d'une lettre indiquant la sous-famille (ou clade) dont la protéine particulière résulte (Silverman *et al.*, 2001 ; Mangan *et al.*, 2008). Ceci a permis de définir la nomenclature aujourd'hui usitée et s'écrivant sous la forme SERPINXy, où X correspond au clade et y indique le nombre au sein de ce clade.

Chez l'Homme, 36 serpinines ont été identifiées dont la majorité appartient aux clades A et B et ces derniers englobent 13 serpinines chacun, et les 10 autres restantes sont membres de sept

autres clades (de C à I) (Olson et Gettins, 2011). Les gènes de ces serpinines ont été répertoriés dans 10 chromosomes différents, et 22 gènes sont localisés dans trois clusters : 6p25, 14q32.1 et 18q21.3, le plus petit cluster situé à 3q26 rassemble deux serpinines (SERPINI1 et SERPINI2) (Tableau 01) (Irving *et al.*, 2007 ; Olson et Gettins, 2011).

La plupart des serpinines du clade A sont situées dans le cluster du chromosome 14 (tableau 01) et ces serpinines semblent réguler les peptidases qui contrôlent les réponses inflammatoires et les invasions dues aux microbes pathogènes. Celles du clade B sont représentées par les clusters des chromosomes 6 et 18, (tableau 01), également connu sous le nom d'ov-serpinines, incluant toutes les serpinines qui ne possèdent pas de peptide signal et qui sont à localisation intracellulaire (Irving *et al.*, 2007 ; Olson et Gettins, 2011). La plupart des serpinines des autres clades sont à localisation extracellulaire, sécrétées par les tissus spécifiques qui les expriment.

Chez les vertébrés, une analyse phylogénétique, réalisée à partir de 110 séquences de serpinines, et s'appuyant sur les séquences protéiques et l'organisation structurale de leur gène, a confirmée la répartition en 6 groupes : ovalbumine, α_1 -antitrypsine, neuroserpine, α_2 -antiplasmine, antithrombine III et HSP47 (Ragg *et al.*, 2001). Seul le groupe de l'ovalbumine a été scindé en deux sous-groupes, les exons 3 et 4 n'en formant plus qu'un seul dans le deuxième sous-groupe (Atchley *et al.*, 2001). Enfin, aucune preuve n'existe concernant un transfert horizontal des gènes de serpinines. Il s'agirait de protéines anciennes dont la plupart des procaryotes auraient perdu l'usage (Roberts *et al.*, 2004).

III.3. Fonctions biologiques des serpinines et des serpinines humaines

Comme déjà cité ci-dessus, les serpinines sont impliquées dans un très grand nombre de fonctions biologiques et elles participent à réguler finement diverses voies protéolytiques impliquées, entre autres, dans la coagulation sanguine, la fibrinolyse, l'activation du complément, le remodelage des tissus, la prolifération des métastases, l'inflammation et l'apoptose (figure 10). Chez l'Homme, la plupart d'entre elles inhibent leur peptidases cibles (Van Gent *et al.*, 2003), bien que c'est les serpinines extracellulaires qui sont impliqués dans ces différentes fonctions que les intracellulaires (Silverman *et al.*, 2010).

Parmi ces différentes serpinines extracellulaires, on trouve les SERPINC1, SERPIND1, SERPINA10, SERPINA5, SERPINE1 et la SERPINF2 qui régulent les peptidases impliquées dans la formation et la dissolution des caillots sanguins. L'activité de l'élastase, et la cathepsine G qui régulent la réponse inflammatoire est contrôlée par les deux serpinines majoritaires du

plasma humain SERPINA1 (α_1 -AT) et SERPINA3 (α_1 -ACT) respectivement (Beatty *et al.*, 1980 ; Lomas *et al.*, 1995a ; Olson et Gettins, 2011).

Les fonctions des serpinines intracellulaires du clade B sont les moins caractérisées. Beaucoup d'entre elles semblent avoir des fonctions cytoprotectives qui protègent la cellule des peptidases se trouvant dans les lysosomes ou stockées dans les compartiments sécréteurs (Silverman *et al.*, 2004).

Cependant, certaines serpinines ne possèdent pas d'activités inhibitrices. La SERPINA8 par exemple, est une globuline fixant le cortisol qui intervient dans le transport hormonal (Stein *et al.*, 1989), la SERPINB5 (Maspin) joue un rôle de suppresseur de tumeurs chez l'humain (Zou *et al.*, 1994 ; Gao *et al.*, 2004). Chez les virus, elles semblent impliquées dans l'inhibition de l'apoptose, c'est le cas de la serpinine virale crmA (*Cytokine response modifier A*) qui est capable d'inhiber les caspases 1, 3 et 8 et de former un complexe avec la caspase 1 et le granzyme B (Zhou *et al.*, 1997 ; Renatus *et al.*, 2000 ; Swanson *et al.*, 2007).

Les cathepsines K, L et S sont inhibées par la SERPINB3 (Schick *et al.*, 1998a,b) ; la caspase 1 (peptidase interleukin-1- β -converting (ICE)) caractérisée comme une peptidase à cystéine (Cerreti *et al.*, 1992) est inhibée par les serpinines proxvirus (Ray *et al.*, 1992) ; la SERPINA3 (α_1 -ACT) est capable d'inhiber la Prohormone Thiol Protéase (PTP) (Hook *et al.*, 1993) ; les caspases 1, 4 et 8 sont inhibées par la SERPINB9 (Annand *et al.*, 1999). Une serpinine purifiée dans les cellules de chromaffine de la médulle adrénale appelée Endopine, possède la capacité d'inhiber la PTP (Hwang *et al.*, 1999a). L'équipe de Ouali à l'INRA de Theix – France, a purifiée deux serpinines à partir du muscle du bovin appelée bovSERPINA3-1 et bovSERPINA3-3 (Tassy *et al.*, 2005 ; Herrera-Mendez, 2009) qui sont en fait deux membres d'une famille complexe de serpinines comprenant au moins 8 gènes (Pélissier *et al.*, 2008) ont la capacité d'inhiber la chymotrypsine, la trypsine, l'élastase et la plasmine, ainsi que les caspases 3 et 8 considérées comme peptidases de type cystéine.

Chez les plantes, plusieurs serpinines ont été identifiées. Chez les céréales (blé, orge, avoine et seigle), les serpinines forment un groupe de protéines nommées « protéines Z » abondantes dans les graines (Hejgaard, 2001 ; Hejgaard et Hauge, 2002 ; Roberts *et al.*, 2003 ; Ostergaard *et al.*, 2004) et représentent jusqu'à 5% des protéines de l'endosperme (Hejgaard, 1982). Une serpinine, CmPS-1, a aussi été rapportée dans le phloème d'une cucurbitacée *Cucurbita maxima* (Yoo *et al.*, 2000). Toutefois, la fonction des serpinines chez les plantes demeure encore méconnue et aucune protéase cible n'avait été identifiée. Les premières

serpinines végétales étaient donc associées à un rôle de défense via l'inhibition de peptidases des insectes herbivores et des agents pathogènes (Ostergaard *et al.*, 2000). Toutefois, une serpinine d'*Arapidopsis thaliana*, la protéine AtSerp1, a été reconnue récemment comme un inhibiteur de la métacaspase 9 de cette plante (Vercammen *et al.*, 2006 ; Roberts et Hejgaard, 2008). Il est suggéré que les métacaspases, des peptidases de type cystéine, sont impliquées dans l'apoptose et dans les réactions d'hypersensibilité, élargissant ainsi les fonctions potentielles des serpinines végétales à la régulation de la mort cellulaire.

III.4. Structure des serpinines

Les serpinines sont des protéines *N*- et/ou *O*-glycosylées et/ou phosphorylées, qui forment une classe protéique très diversifiée mais conservée sur le plan structurel. Elles comportent un domaine de ~350 acides aminés, commun pour tous les membres de la superfamille, avec de légères modifications dues aux petites insertions ou délétions (InDel) qui peuvent aboutir à des boucles ou allonger et raccourcir des hélices (Gettins, 2002a ; Olson et Gettins, 2011). Malgré des séquences en acides aminés parfois très divergentes (350 à 500 résidus), les serpinines, conservent toutes, et de façon remarquable, une même structure tridimensionnelle (figure 11) (Huber et Carrell, 1989 ; Silverman *et al.*, 2001).

Ainsi, une serpinine est constituée de 3 feuillets β (A (cinq), B (six) et C (cinq)), constituant le corps de la molécule, alors que les hélices et les boucles entourant ces structures, consolident la structure tertiaire (Pearce *et al.*, 2007). On distingue 8 à 9 hélices α (hA à hI) et une boucle d'inhibition mobile d'environ 20 résidus exposée à la surface, située à l'extrémité C-terminale, (figure 11) reconnue par la protéase cible et appelée RCL (*Reactive Center Loop*). La longueur du RCL varie entre les différentes serpinines et dicte principalement la spécificité inhibitrice (Lawrence *et al.*, 1994 ; Whisstock *et al.*, 1998 ; Gettins, 2002a).

La plus petite serpinine identifiée est celle du proxvirus (crmA), où l'hélice D est absente et l'hélice A est considérablement raccourci (Simonovic *et al.*, 2000 ; Renatus *et al.*, 2000). De plus, les serpinines de certains archae, ne possèdent pas l'hélice G (Irving *et al.*, 2003).

Les serpinines présentent une conformation changeante, ou flexible, qui assure un mécanisme d'inhibition des peptidases unique mais qui leur confère aussi une instabilité structurale forçant leur transition vers des formes latentes ou polymériques non actives (Huntington, 2006 ; Whisstock et Bottomley, 2006).

Contrairement au dogme du repliement des protéines qui veut que la chaîne peptidique se replie en divers intermédiaires jusqu'à l'obtention de la structure thermodynamique la plus stable (Anfinsen, 1973), les serpins, dans leur repliement natif, restent piégées par une barrière cinétique dans un état de plus haute énergie, un état nommé « métastable » (Whisstock et Bottomley, 2006). Cette barrière cinétique est franchie lors de l'interaction de la serpine avec une protéase, conduisant à l'inhibition de cette dernière. Cette conformation native ou « stressée, S » est très instable sur le plan thermodynamique. Lorsque la protéase se fixe sur le RCL, celui-ci s'insère dans le feuillet β A, formant ainsi le quatrième brin (s4A). La serpine adopte alors une conformation « relaxée, R » beaucoup plus stable (Im *et al.*, 2000 ; Boudier et Bieth, 2001).

En raison de son état métastable, la structure des serpins peut être facilement perturbée par des températures élevées ou par des mutations au niveau de la séquence primaire. Il s'ensuit un changement de conformation, qui mène à une transition vers des formes inactives mais plus stables (Stein et Carrell, 1995 ; Benning *et al.*, 2004).

III.4.1. Les régions critiques de la flexibilité des serpins

Pour que le RCL s'insère lors de l'inhibition, différentes régions conservées sont appelées à assurer un haut niveau de flexibilité. Ces régions ont été identifiées par l'observation que plusieurs mutations dans la structure des serpins, sont situées dans des domaines structuraux spécifiques de la molécule (Stein et Carrell, 1995 ; Whisstock *et al.*, 2000). Ces régions incluent la charnière (proximale et distale) (*hinge*), la brèche (*breach*), l'obturateur (*Shutter*), la porte (*gate*) et l'hélice F dernièrement (figure 11).

III.4.1.1. La charnière (*hinge*)

Aux deux extrémités du RCL, on trouve les régions de la « charnière » (figure 11). La *charnière proximale*, localisée à la partie N-terminal au-dessus du feuillet β A. Elle se compose des résidus P15 – P9 et est la partie du RCL qui subit le plus grand changement conformationnel pendant l'inhibition de la protéinase, qui doivent fléchir afin de permettre l'incorporation du RCL dans le feuillet β A (Hopkins *et al.*, 1993). Les résidus (P14) de cette région possèdent des petites chaînes latérales, qui permettent la flexibilité exigée (Stein *et al.*, 1991).

La *charnière distale* est localisée à l'extrémité N-terminal du site du clivage, comportant la boucle liant le RCL avec le feuillet β C. Plusieurs études ont montrées l'importance de sa

mobilité par rapport à l'insertion efficace de la boucle réactive lors de l'inhibition (Bottemley *et al.*, 2001 ; Wang et Shattiel, 2003 ; Bijmens *et al.*, 2001).

III.4.1.2. La brèche (*breach*)

La brèche (figure 11) est située au-dessus du feuillet β A, elle entoure le point initial d'insertion du RCL ; elle comprend le sommet des brins s3A et s5A en croisement avec les sommets des brins s2B aux s5B (Whisstock *et al.*, 2000). Il existe beaucoup de résidus fortement conservés dans cette région, la plupart d'entre eux étant enfouis dans le noyau hydrophobe et qui interagissent avec d'autres résidus stabilisateurs (Irving *et al.*, 2000).

III.4.1.3. L'obturateur (*shutter*)

L'obturateur (figure 11) incorpore le centre des régions du feuillet β A, y compris les brins s3A et s5A qui sont en interactions hydrophobes importantes avec le brin s6B et le sommet de l'hélice B (Carrell et Stein, 1996 ; Whisstock *et al.*, 2000). Cette région est impliquée lors de l'insertion du RCL, qui doit être flexible pour permettre au feuillet β A de s'ouvrir, à l'hélice F de tordre, et à la boucle de s'insérer (Stein et Carrell, 1995 ; Whisstock *et al.*, 2000 ; Irving *et al.*, 2000).

III.4.1.4. La porte (*gate*)

La porte (figure 11) possède une loupe enroulée dans le feuillet β C, associant les brins s1C et s2C. La mobilité du brin s1C est essentielle aux mouvements structuraux impliquant le RCL, soudé à cette porte (Bottomley *et al.*, 2001). Un changement conformationnel se produit lors de la transition à la forme latente, comme observé chez la SERPINE1 (PAI-1) (Mottonen *et al.*, 1992) et la SERPINC1 (ATIII) (Carrell *et al.*, 1994).

III.4.1.5. L'hélice F (*helix-F*)

L'hélice F (hF) (figure 11) se trouve au fond du feuillet β A et crée un certain nombre d'interactions fortement conservées avec le squelette de la serpine. Sa présence intervient au moment de l'incorporation de la boucle, vu qu'elle subit lors de l'insertion un changement conformationnel énergétiquement favorable (Gettins, 2002a).

En outre, une étude dans laquelle l'hélice F a été supprimée, c'est le cas de la SERPINE1, a démontré que sa présence est indispensable à l'activité inhibitrice (Vleugels *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que le mouvement de l'hélice F au moment de l'inhibition

n'enlève pas simplement une entrave physique sur l'insertion du RCL, mais plutôt qu'elle est couplée au processus d'une façon productive.

La structure cristalline d'un variant de la SERPINA3 renferme le sommet de cette hélice insérée comme un petit feuillet supplémentaire au fond du feuillet β A entre les deux brin s3A et s5A (Gooptu *et al.*, 2000). Basant sur ces données cristallographiques, Gooptu *et al.* ont proposé que, l'hélice F intervient comme « chausse-pied » pour ouvrir le feuillet β A lors du repliement et l'inhibition de la protéinase cible.

III.4.2. La boucle d'inhibition (RCL, *Reactive Center Loop*)

La boucle d'inhibition (RCL) joue un rôle central dans les interactions serpine-peptidases. Le site réactif, désigné par les résidus P1 – P1', comporte le site actif qui interagit avec la protéase cible. Les résidus à la partie N-terminale du site du clivage sont indiqués par les résidus P_x (P17 – P1) et les résidus à partie C-terminale sont indiqués par les résidus P' (Schechter et Berger, 1967).

III.4.2.1. Importance de la composition du RCL

La composition du RCL en acides aminés ne détermine pas seulement la spécificité inhibiteur-protéinase, mais elle est également critique au mécanisme d'inhibition. Les résidus P15 – P9, composant la région de la charnière proximale, déterminent la capacité de la boucle à s'insérer lors du repliement (Hopkins *et al.*, 1993 ; Potempa *et al.*, 1994).

Une comparaison de séquences entre des serpinines inhibitrices et non-inhibitrices (tableau 03), a indiquée une forte conservation des résidus d'une courte chaîne, essentiellement l'Alanine, entre les résidus P12 – P9 (Hopkins *et al.*, 1993). Le mode de conservation dans la charnière proximale est appelé à faciliter l'insertion rapide du RCL une fois que la chaîne P14 latérale (la première appelée à s'insérer dans le feuillet A, stabilisant ainsi la structure de la boucle) est incorporée au feuillet A (Hopkins *et al.*, 1993 ; Irving *et al.*, 2000 ; Gettins, 2002a).

Les résidus de la chaîne P8 – P4' modulent la spécificité à la protéase, comme démontrée par l'absence de résidus conservés de cette séquence entre serpinines (SERPINA1, SERPINA3 et SERPINC1) et la capacité des mutations à changer leur activité inhibitrice (Djie *et al.*, 1996, 1997; Chaillan-Huntington *et al.*, 1997). Malgré que plusieurs études sur des inhibiteurs sauvages et ceux obtenus par mutagenèse dirigée ont montré que c'est bien le résidu P1 qui détermine la spécificité à la protéase (Travis *et al.*, 1985 ; Jallat *et al.*, 1986 ; Derechin *et al.*, 1990 ; Stein et Carrell, 1995 ; Gettins, 2002a).

III.4.2.2. Importance de la longueur du RCL

La longueur du RCL peut déterminer l'efficacité de l'inhibition de la protéase cible. La longueur du RCL montre de légères variations entre serpinines inhibitrices. Habituellement, il se compose de 17 résidus (P17 – P1), et on distingue que 16 résidus dans les boucles de la SERPINF2, SERPING1 (tableau 03) et du crmA (Simonovic *et al.*, 2000 ; Gettins 2002).

La longueur du RCL est critique pour produire la tension correcte pour enlever le résidu serine-195 actif dans la triade catalytique de la peptidase. La longueur accrue du RCL diminue la force exercée sur le résidu actif de la protéase et une perte de déstabilisation et d'inhibition de cette dernière (Zhou *et al.*, 2001 ; Gettins, 2002a).

III.5. Le polymorphisme conformationnel des serpinines

La flexibilité du RCL et sa propension à adopter une conformation étendue de type β , ainsi que les défauts structuraux présents dans la forme active de la plupart des serpinines, rendent ces protéines, et particulièrement celles affublées de mutations, très vulnérables à des modifications conformationnelles anormales. Elles adoptent différentes conformations à partir de leur structure archétype native, investiguées par des études cristallographiques au rayon X, et qui sont : la forme latente, clivée, delta (δ) et polymérisée. La première structure cristalline élucidée, était celle de la SERPINA1 (α_1 -AT), considérée comme étant la structure archétypale contre laquelle toutes les autres structures sont comparées (Loebermann *et al.*, 1984 ; Dafforn *et al.*, 2004 ; Marszal et Shrake, 2006).

III.5.1. La forme native

La première structure native déterminée remonte à 1994, il s'agit de la serpinine SERPINC1 (ATIII) inhibitrice (Carrell *et al.*, 1994 ; Schreuder *et al.*, 1994). Toutes les serpinines actives (figure 12 A) ont 5 brins sA β et un RCL exposé possédant le site du clivage (P1 – P1') situé dans sa partie centrale. La boucle est liée à l'extrémité C-terminale du brin s5A et au brin s1C de l'autre côté (Gettins, 2002a). La conformation de la serpinine active diffère d'une serpinine à une autre, par exemple, la SERPINC1 (ATIII) possède un RCL partiellement inséré dans le feuillet β -A (Carrell *et al.*, 1994), alors que pour la SERPINA3 (Wei *et al.*, 1994) le RCL est étiré et l'hélice α montre une conformation tordue.

La forme active des serpinines possède une très haute métastabilité, résultant des interactions peu communes entre acides aminés qui aboutissent à la formation de poches hydrophobes appelées cavités (Elliott *et al.*, 2000). Dans cet état, la serpinine est intacte, active,

et monomérique (tableau 04). C'est la conformation la plus instable, plusieurs études biochimiques et biophysiques, ont démontré que la température de dénaturation moyenne d'une serpine humaine est $T_m = 58^\circ\text{C}$ (Dafforn *et al.*, 1999 ; Pearce *et al.*, 2004 ; 2007).

III.5.2. La forme latente

Certaines serpinines existent sous une forme latente inactive formée par l'insertion prématurée du RCL non clivé dans le feuillet β A, devenant ainsi un brin antiparallèle (figure 12 C). Cette conformation est constatée pour la première fois dans, la serpine circulante SERPINE1 (PAI-1) (Hekman et Loskutoff, 1985), qui l'adopte de façon spontanée, ce qui prolonge ainsi sa demi-vie (Mushunje *et al.*, 2004). Elle est aussi observée chez d'autres serpinines, tel que la SERPINA1 (Im *et al.*, 2002) et la SERPINA3 (Chang et Lomas, 1998). En outre, la SERPINA3 latente est déterminée comme composant mineur dans le plasma humain et un composant major dans le liquide de lavage des poumons chez des patients présentant la bronchite obstructive chronique et l'emphysème (Berman *et al.*, 1986 ; Pearce *et al.*, 2010).

Similaire à la serpine native, la forme latente est monomérique et intacte, mais non inhibitrice (tableau 04), ceci est dû à l'insertion complète du RCL dans le feuillet β A. Elle révèle une stabilité élevée comparée à l'état natif, mais elle peut être convertie de nouveau à la forme active par dénaturation (Lomas *et al.*, 1995a ; Wardell *et al.*, 1997).

III.5.3. La forme clivée

La forme la plus stable des serpinines est l'état clivé (figure 12 B), où seule la partie clivée du RCL qui s'insère dans le feuillet β A pour former le 4^{ème} brin au centre des brins s3A et s5A, à l'inverse de la forme latente où le RCL entraîne avec lui le brin du feuillet s1C. L'observation la plus saisissante est la séparation des résidus P1 et P1' à une distance de 70 Å au côté opposé de la molécule (Loebermann *et al.*, 1984; Mottonen *et al.*, 1992).

La serpine clivée est monomérique et très stable (tableau 04), représentant la conformation la plus stable existante de cette superfamille, ayant une température de dénaturation $> 110^\circ\text{C}$ (Bruch *et al.*, 1988 ; Herve et Ghelis, 1990). Comme le RCL est inséré, la forme clivée n'est pas un inhibiteur de peptidases.

III.5.4. La forme δ

La seule protéine caractérisée dans cette conformation δ (figure 12 D) a été retrouvée dans un variant de la SERPINA3 (α_1 -ACT). Dans la conformation δ , un fragment du RCL

s'insère partiellement à une extrémité du feuillet β A jusqu'au résidu P12 et un fragment de l'hélice F s'insère à l'autre extrémité. Le conformère δ peut ainsi être considéré comme un intermédiaire entre les formes native et latente (Gooptu *et al.*, 2000).

La conformation δ est monomérique et intacte, et non active comme inhibiteur de protéinase (tableau 04). Les serpinines δ sont plus stables que la conformation native, mais pas aussi stable que les conformations clivée et latente.

III.5.5. La forme polymérisée

Une des conséquences de la flexibilité conformationnelle des serpinines est la formation de polymères (figure 13 ; tableau 04). Les serpinines natives forment aisément des polymères une fois chauffées à 50 – 60°C et on peut observer leur présence sur des gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes par la formation de dimères (figure 13), trimères et voir même des formes multimériques (Schulze *et al.*, 1990 ; Patston *et al.*, 1995). En outre, des polymères de serpinines se forment également entre le RCL clivée d'une serpinine et le feuillet β A d'une autre molécule (Huntington *et al.*, 1999 ; Dunstone *et al.*, 2000).

La polymérisation des serpinines, correspond à un enchaînement de plusieurs molécules dans lequel le RCL d'un monomère est complètement inséré dans le feuillet β A du monomère suivant (figure 13). Cette structure est rencontrée pour un mutant de la SERPINA1 (α_1 AT) (Seyama *et al.*, 1991 ; Stein et Carrell, 1995 ; Benning *et al.*, 2004).

In vivo la polymérisation se produit lorsqu'une mutation affecte la stabilité de la serpinine native. Ceci aboutit à la formation d'agrégats polymériques dans la cellule en question et par conséquent une insuffisance d'activité de la serpinine dans le plasma (Sivasothy *et al.*, 2000). Plusieurs structures de polymères ont été proposées d'après les interactions observées dans les formes cristallines des serpinines (Nar *et al.*, 2000 ; Carrell *et al.*, 1994).

Dans cette situation, les polymères s'agrègent et précipitent dans la cellule, causant un ensemble de maladies nommées serpinopathies (développé dans les parties qui suivent) (Gooptu *et al.*, 2000 ; Lomas et Carrell, 2002), associés à la perte d'activité inhibitrice et au dépôt excessif dans les tissus (Stein et Carrell, 1995).

III.6. Mécanisme d'inhibition des serpinines

In vivo, les cellules synthétisent un grand nombre d'inhibiteurs de peptidases qui varient en termes de spécificité et d'activité, pouvant ainsi réguler avec précision une multitude de

peptidases toutes aussi variées. Sur le plan fonctionnel, les inhibiteurs de peptidases se distinguent de plus par leur mode d'inhibition (Otlewski *et al.*, 2005). Contrairement au mécanisme d'inhibition des autres inhibiteurs de peptidases à sérine, type Kunitz ou Kazal, qui forment des complexes réversibles avec leur protéase cible, une interaction « clé et serrure », les serpines participent à un complexe covalent. Ce sont des « inhibiteurs suicides » (Patston *et al.*, 1991).

III.6.1. Inhibition par les inhibiteurs canoniques

Ainsi retrouve-t-on, entre autres, pour inhiber les peptidases de type sérine, les serpines et les inhibiteurs canoniques. Les inhibiteurs canoniques emploient le « mécanisme standard » des inhibiteurs de peptidases, par lequel la boucle d'inhibition de l'inhibiteur est reconnue par la peptidase cible au niveau de son site actif, par l'intermédiaire d'une interaction réversible à l'image d'une clé et d'une serrure (Kelly *et al.*, 2005). La très grande complémentarité entre les deux protéines permet de former un complexe très stable par des liaisons faibles non covalentes. Ces inhibiteurs sont en général rigides et stables et leur boucle d'inhibition n'est pas clivée par les peptidases-cibles (figure 14). Alors que les serpines participent à un complexe covalent, et comme étant des inhibiteurs suicides (Patston *et al.*, 1991).

III.6.2. Mécanisme d'inhibition des serpines suicide – substrat

Le mécanisme qui permet aux serpines d'assurer leurs fonctions d'inhibiteurs est assez particulier car il implique certaines modifications structurales majeures. Elles inhibent leurs peptidases cibles par un mécanisme spécifique suicide – substrat (une analogie amusante qui est parfois utilisée consiste à comparer ce mécanisme à celui d'un piège à souris) conduisant à la formation d'un complexe irréversible ($E + S \rightarrow ES$) illustré sur la figure 15. Leur interaction avec les peptidases cibles est nettement plus complexe, puisque elles impliquent certaines modifications structurales très importantes (Gettins, 2002a ; Olson et Gettins, 2011).

Des résidus situés dans la boucle d'inhibition (RCL) de la serpine (**I**) sont reconnus comme substrat par la protéase (**E**), qui clive le RCL et s'associe à la serpine via un intermédiaire acyl-covalent (Lawrence *et al.*, 1995 ; Silverman *et al.*, 2001), avec une constante d'association de second ordre k_1 , pour initier la formation du complexe Michaelis non-covalent (**EI**) en interagissant avec les résidus P1 et P1' (où P1 est le résidu après lequel la protéase clive l'inhibiteur et libère le fragment C-terminal P1' à Px') de la boucle, sans avoir recours à un changement conformationnel majeur. Ce complexe peut se dissocier avec une constante d'association notée k_{-1} , mais il possède plus de chance d'aller plus loin (vu que $k_2 \gg k_{-1}$).

Puis, la serine 195 de la triade catalytique de la protéase attaque la liaison peptidique entre P1 et P1' comme s'il s'agissait d'un substrat (*pseudosubstrat*), formant ainsi une liaison acyle-ester covalente entre la serine et la fonction carbonyle du résidu P1, puis la coupure de la liaison peptidique entre P1 et P1' et aboutit à la formation d'un intermédiaire acyle-enzyme (**EI**[§]) stable thermodynamiquement. Le clivage de la boucle déclenche une modification dramatique de la conformation de la serpine ; elle passe de la conformation stressée (S) à la conformation relaxée (R) plus stable thermodynamiquement (Gettins, 2002a ; Gettins, 2007). La transition S→R est dépendante de la région charnière du RCL (P9 – P15) développée en partie IV de ce chapitre. Deux résultats sont possibles et sont en concurrence l'un avec l'autre.

Le premier est l'insertion complète et immédiate du RCL clivé dans le feuillet β A pour former un brin β additionnel. Ce mouvement permet d'entraîner avec lui la protéinase (**E**) au pôle opposé de la serpine, sur une distance qui correspond à un déplacement relatif d'environ 70 Å (Stratikos et Gettins, 1999 ; Lee *et al.*, 2000), formant le complexe covalent enzyme/inhibiteur (**E-I***) avec libération d'énergie. Ce piégeage se produit avec une constante d'association, k_4 . En parallèle, l'hélice hF se déplace pour permettre l'insertion du RCL (Gettins, 2002b). Ce déplacement inhibe la protéase en engendrant des distorsions de son site actif (Huntington *et al.*, 2000 ; Dementiev *et al.*, 2006). La serpine, quant à elle, subit un changement de conformation irréversible et un gain de stabilité thermodynamique.

Cependant, si l'insertion du RCL dans la molécule n'est pas suffisamment rapide, une déacylation du complexe survient et la réaction emprunte la voie du substrat, c'est-à-dire que la protéase peut accomplir la réaction d'hydrolyse avant que son activité ne soit entièrement compromise, ou il y'a formation de la serpine clivée (**I***) (inactive) et de la protéase libre (active) (Lawrence *et al.*, 2000), avec une constante d'association k_3 . Le rapport (k_3/k_4), aboutit à la « stœchiométrie d'inhibition » (SI), représentant le nombre de moles de serpine exigés pour former 1 mole du complexe covalent. Enfin, puisque le complexe covalent est seulement un intermédiaire cinétiquement emprisonné, il peut encore former les mêmes produits d'**I*** (inactif et stable) et d'**E** par une hydrolyse non catalytique, avec une constante d'association de k_5 (Gettins, 2002a ; Huntington, 2006 ; Gettins, 2007 ; Olson et Gettins, 2011).

III.6.3. Inhibition croisée ou « *cross-class inhibition* »

Les serpines ont été les premiers inhibiteurs qui ont montré une activité inhibitrice croisée. Salvesen (1993) a remarqué que la géométrie de la liaison avec le substrat et non le mécanisme catalytique des peptidases est le responsable de la sélectivité des inhibiteurs.

Bien que les serpinines soient, en premier lieu, des inhibiteurs de peptidases à sérine, certaines sont également capables d'inhiber des peptidases à cystéine. Ce phénomène est décrit sous le terme d'inhibition croisée ou « cross-class inhibition ». Différents exemples ont été décrits dans la littérature et sont répertoriés dans le tableau 05.

Certaines serpinines inhiberaient les peptidases à cystéine selon un mécanisme irréversible similaire à celui mis en place pour les peptidases à sérine. Elles formeraient un intermédiaire réactionnel thioacycle, permettant l'insertion du RCL lié à l'enzyme, la compression de la protéase et la modification de son site catalytique. Une liaison covalente entre la serpinine crmA et les caspases 1, 6 et 8 a été confirmée (Dobó *et al.*, 2006).

III.7. Enfin pourquoi les serpinines ?

Les serpinines possèdent un mécanisme d'intervention, de régulation et d'inhibition si compliqué, mais une cellule favorise une serpinine plutôt qu'un inhibiteur à mécanisme standard, c'est une question qui se pose et à laquelle il faut administrer quelques arguments et qui sont :

- ✓ L'inhibition irréversible et le changement de conformation des protéines associées dans le complexe permet une régulation très fine des peptidases et de ce fait pourrait offrir un avantage sélectif aux serpinines (Huntington, 2006) ;
- ✓ La distorsion de la protéase due à l'interaction avec la serpinine lui donne une structure dite de « globule fondu ou *molten globule* », (Peterson et Gettins, 2001). La protéase devient alors extrêmement sensible à une dégradation protéolytique, ce qui permet son élimination rapide et localisée ;
- ✓ De plus, le complexe serpinine-protéase peut être reconnu spécifiquement par des récepteurs lipidiques qui induisent la clairance du complexe. Il est suggéré que le changement de conformation de la serpinine et/ou de la protéase découvre des sites reconnus par ces récepteurs, qui dans les formes natives sont cachés (Gettins, 2002a ; Huntington, 2006). Une voie rapide de clairance par internalisation régulée par les récepteurs hépatiques menant vers une dégradation lysosomale a été aussi décrite (Potter *et al.*, 1995 ; Lillis *et al.*, 2008).

III.8. La glycosylation des serpinines

Au niveau structural, la majorité des serpinines sont des glycoprotéines contenant un ou plusieurs oligosaccharides. Il s'agit essentiellement de N-glycannes mais des O-glycannes ont été aussi détectés, par exemple sur la SERPING1. Les sites de glycosylation ne sont toutefois

pas forcément conservés d'une protéine à l'autre (Gettins *et al.*, 1996). De plus, toutes les serpinines ne sont pas glycosylées, en particulier les serpinines intracellulaires, cytoplasmiques ou nucléaires, comme la SERPINB6 (PI-6) cytoplasmique (Scott *et al.*, 1996), la forme cytoplasmique de la serpine SERPINB2 (PAI-2) (Grigoryev *et al.*, 1999).

La N-glycosylation, est un processus enzymatique conditionné par l'accessibilité de la protéine et du glycanne lui-même aux enzymes de maturation de la N-glycosylation. En général, la glycoprotéine et la structure des glycannes sont typiquement hétérogènes, le nombre de glycannes portés par une glycoprotéine et la structure des glycannes sur un même site de glycosylation ou à des sites différents étant variables (Lerouge *et al.*, 1998).

Chaque serpine montre un patron de glycosylation particulier tant dans le nombre, la position et la structure des glycannes. Si, dans certains cas, les N-glycannes peuvent être supprimés sans affecter de façon notable la fonction inhibitrice de la protéine (Rubin *et al.*, 1990 ; Kwon *et al.*, 1995 ; Lamark *et al.*, 2001), l'absence de N-glycannes peut dans d'autres cas nuire à l'insertion du RCL dans le noyau de la protéine et affecter l'activité inhibitrice ou l'état de latence des serpinines à conformation modifiée (Gils *et al.*, 2003). Il est connu, par ailleurs, que les N-glycannes peuvent modifier certaines propriétés des serpinines *in vivo*. Par exemple, l'élimination de la SERPINA1 (α_1 -AT) de la circulation plasmatique est favorisée lorsque la protéine est désialylée (c'est-à-dire pauvre en acide sialique) ou lorsqu'un site de N-glycosylation est éliminé (Ni *et al.*, 2000). La N-glycosylation préviendrait également l'agrégation de la SERPINA1 en améliorant sa stabilité (Kwon et Yu, 1997).

Une étude réalisée sur la SERPINA3 sauvage et recombinante a montrée que la glycosylation de la protéine (compte environ 30 % de son poids total) n'est pas essentielle pour l'interaction de la SERPINA3 aux sérine peptidases et à leur inhibition (Rubin *et al.*, 1990). En somme, ces expériences démontrent que la présence, l'absence ou l'altération de la structure d'un N-glycanne peuvent modifier l'activité inhibitrice et les propriétés des serpinines.

III.9. Serpinopathies et Maladies liées aux Serpinines

L'importance des serpinines est également caractérisée par la perte de fonction, d'insuffisance et de maladies. Leur conception en tant que protéines métastables, les exposent à une perte de fonctions conformationnelles, vu que leur mécanisme d'action implique leur boucle qui rend ces dernières sensibles à des transitions conformationnelles aberrantes qui peuvent résulter de mutations ponctuelles. De telles mutations ont comme conséquence une classe de maladies conformationnelles connues sous le nom de *serpinopathies* dans lesquelles

la serpine mutée se polymérise et, dans certains cas, elle forme des corps d'inclusion cytotoxiques (Gooptu et Lomas, 2009).

La polymérisation des serpins a été démontrée comme cause principale dans une gamme de serpinopathies et maladies humaines (telles que la cirrhose, la démence ou bien l'emphysème) (Stein et Carrell, 1995) qui dépendent de l'état de la serpine impliquée. Leur polymérisation résulte du processus même de la maladie, qui est dû soit à :

- ✓ un gain d'une fonction toxique par la protéine polymérique que la forme monomérique ne possédait pas ;
- ✓ et/ou à une perte de la fonction inhibitrice de la serpine dû à son incorporation dans une chaîne polymérique (Parmar et Lomas, 2000).

Ces mutations sont localisées dans la région de l'obturateur (*shutter*) (figure 16) à l'extrémité du feuillet A la plus distale de la boucle (dans le domaine des résidus 49 – 58) qui contrôle son ouverture (Lomas et Carrell, 2002 ; Zhou *et al.*, 2003 ; Gooptu et Lomas, 2009).

La serpinopathie la mieux caractérisée est celle de l'insuffisance de la SERPINA1 (α_1 -AT), décrite pour la première fois comme entité clinique en 1963 (Laurell, 1963). Actuellement, plus de 70 variants naturels de l' α_1 -AT ont été observés, toutefois le variant Z est la forme la plus élucidée causant des maladies (Lomas et Mahadeva, 2002).

Certains variants naturels de l' α_1 -AT ont tendance à s'assembler bout à bout, par insertion du RCL d'une molécule dans le feuillet β A de la suivante, et à former ainsi de longues chaînes polymériques insolubles et inactives (Stein et Carrell, 1995 ; Sivasothy *et al.*, 2000 ; Devlin *et al.*, 2002). Dans le cas de l' α_1 -AT, la polymérisation constitue une double menace pour la santé. D'une part, l'incapacité de cette protéine à assurer sa fonction biologique induit à une défaillance de la protection des tissus pulmonaires qui peut à terme, être à l'origine d'un emphysème. D'autre part, l'accumulation de polymères dans les hépatocytes du foie peut conduire au développement d'une cirrhose.

Les conséquences pathologiques de la polymérisation des serpins sont nombreuses et variées : la thrombose dans le cas de la SERPINC1, l'angioedème dans le cas de la SERPING1, la maladie pulmonaire obstructive chronique dans le cas de la SERPINA3 ou encore la démence dans le cas de la SERPINI1 (neuroserpine) et sa polymérisation pourrait causer une maladie autosomale de la famille d'encéphalopathie ou FENIB (*familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies*) (Faber *et al.*, 1993 ; Bruce *et al.*, 1994 ; Eldering *et al.*, 1995 ; Davis *et al.*, 1999 ; Kaiserman *et al.*, 2006 ; Law *et al.*, 2006).

Chapitre IV

« La famille des serpins A3 »

IV.1. Les serpins du clade A

C'est le plus large clade, regroupant 13 serpins, identifiées par la SERPINA1 (α_1 -AT). Les serpins du clade A sont impliquées dans divers processus associés à l'inhibition des peptidases (type serine ou cystéine), ainsi qu'à d'autres, à fonction non-inhibitrices. Il renferme les deux serpins archétypales : SERPINA1 (α_1 -AT) et la SERPINA3 (α_1 -ACT), ainsi que trois autres serpins non inhibitrices : SERPINA6 (CBG), SERPINA7 (TBG) et la SERPINA8 (AGT). Elles sont assemblées sur le locus du chromosome humain 14q32.1 (figure 17) (Forsyth *et al.*, 2003), à l'exception du TBG et AGT, localisés dans les chromosomes Xq22.2 (Mori *et al.*, 1995) et 1q42-q43 (Isa *et al.*, 1990), respectivement. Plusieurs serpins du clade A sont à expression hépatique (Marsden et Fournier, 2003), excepté de la SERPINA9 et quelques unes qui ont d'autres sites secondaires d'expression (Krebs *et al.*, 1999 ; Frazer *et al.*, 2000 ; Uhrin *et al.*, 2000). Toutes les serpins du clade A semblent avoir un peptide signal à leur extrémité N-terminale et leur excrétion est extracellulaire.

IV.2. La sous-famille des serpins A3

IV.2.1. α_1 -antichymotrypsine / SERPINA3 : Généralités, structure et localisation

L'un des principaux inhibiteurs de serine protéinase circulant dans le plasma humain est l' α_1 -antichymotrypsine (l' α_1 -ACT), appelé aussi SERPINA3 (Silverman *et al.*, 2001), décrit pour la première fois en 1965 (Heimburger et Haupt, 1965). C'est le 3^{ème} membre du clade A de la superfamille des serpins, et figure parmi les 13 serpins extracellulaires humaines de ce clade (tableau 01). La SERPINA3 présente une identité de 41% à son homologue SERPINA1 humain (Van Gent *et al.*, 2003), et son gène a une longueur de 12 kpb approximativement, organisé en cinq exons (le premier est non codant) et quatre introns (Bao *et al.*, 1987), situés dans le chromosome 14q32.1 (figure 17) (Billingsley *et al.*, 1993).

L' α_1 -ACT est une protéine plasmatique synthétisée principalement par les cellules hépatiques (Travis et Salvesen, 1983) et dans d'autres tissus à des taux plus faibles tels que les cellules épithéliales des bronches (poumons), la prostate, les seins (Cichy *et al.*, 1995 ; Kalsheker, 1996) et les mastocytes (Berninger, 1985). Chez les mammifères, des isoformes de l' α_1 -ACT sont aussi produits en plus faibles quantités dans le cerveau (Hwang *et al.*, 1999a).

La SERPINA3 est une glycoprotéine monomérique synthétisée sous forme d'un précurseur de 423 acides aminés et ayant un poids moléculaire (PM) variant de 55 à 68 kDa (Travis et Johnson, 1978 ; Travis *et al.*, 1978 ; Laine et Hayem, 1981 ; Travis et Salvesen, 1983 ; Bao *et al.*, 1987 ; Kalsheker, 1996) et qui exprime un haut degré de micro-hétérogénéité. Ces variations sont dues aux glycosylations de la protéine (Tokes *et al.*, 1981), dont 25 % de sa masse sont occupés par des hydrates de carbone de type N-glycannes. Sa séquence peptidique comprend un peptide signal de 24 acides aminés à l'extrémité N-terminale (Chandra *et al.*, 1983 ; Lindmark *et al.*, 1989 ; Hwang *et al.*, 1999b). Elle comporte six sites potentiels de N-glycosylation dans sa séquence primaire (Wei *et al.*, 1994), mais aucune étude n'a toutefois encore déterminée la localisation, la structure ou la fonction des glycannes présents. De plus, les N-glycannes de l' α_1 -ACT humaine comportent des résidus d'acides sialiques terminaux, monosaccharides très importants pour assurer la demi-vie des protéines plasmatiques (Matsumoto *et al.*, 1995 ; Kelm et Schauer, 1997 ; Ni *et al.*, 2000). Quant à sa glycosylation, il est bien connu aujourd'hui qu'elle n'est pas essentielle pour son activité inhibitrice. Les peptidases cibles vont cliver entre les résidus Leu³⁵⁸ (P1) et Ser³⁵⁹ (P'1) (Rubin *et al.*, 1990). Il est à noter que contrairement à l' α_1 -PI, l' α_1 -ACT résiste à l'oxydation vu qu'elle ne possède pas de méthionine dans sa boucle réactive.

La structure de la SERPINA3 est similaire à celle des autres serpinés, caractérisée par trois feuillets β (A–C), neuf hélices α (A–I) et une boucle d'inhibition mobile (RCL) qui agit comme pseudosubstrat avec la protéinase apparentée (Baumann *et al.*, 1991 ; Wei *et al.*, 1994). La longueur de la séquence du RCL est critique pour sa fonction. La relocalisation de l'emplacement du site actif par un seul résidu dans sa boucle réactive a montré qu'elle affecte dramatiquement son activité inhibitrice (Plotnick *et al.*, 2002). L'interaction de la SERPINA3 avec sa protéase cible aboutit à la formation d'un complexe, et sa clearance de la circulation sanguine est assurée par le foie (Potempa *et al.*, 1991), à une vitesse de 10 à 50 fois plus rapide que l' α_1 -ACT seule (Mast *et al.*, 1991). Ce processus peut être affecté par la concurrence d'autres complexes (des autres serpinés) déjà formés (Pizzo *et al.*, 1988). En outre, la formation

de ce complexe stimule l'expression et la production de la serpine native (Perlmutter *et al.*, 1988), pour rééquilibrer sa concentration dans le plasma.

IV.2.2. α_1 -antichymotrypsine / SERPINA3 : Fonctions et rôles potentiels

La SERPINA3 est une protéine multifonctionnelle dont la concentration est faible à l'état physiologique normal et augmente dramatiquement d'un facteur cinq en phase aigue dans les sites d'inflammation, et son taux dans le plasma se tient à monter après 8 h et il double après 16 h en réponse à l'inflammation (Aronsen *et al.*, 1972 ; Travis et Salvesen, 1983).

In vivo, l' α_1 -ACT joue un rôle anti-inflammatoire en inhibant les peptidases : chymotrypsine, cathepsine G (Beatty *et al.*, 1980 ; Bao *et al.*, 1987 ; Rehault *et al.*, 1999) et la chymase des mastocytes (Schechter *et al.*, 1993), libérés par les leucocytes (Travis et Salvesen, 1983 ; Baker *et al.*, 2007). Elle s'est avérée avoir la capacité d'inhiber le chimiotactisme de neutrophile et la production des radicaux du superoxyde (Schuster *et al.*, 1992 ; Lomas *et al.*, 1995b), ainsi que la synthèse du TNF- α -PAF (*tumor necrosis factor- α -induced platelet-activating factor*) dans les neutrophiles, les macrophages et les cellules endothéliales (Camussi *et al.*, 1988). Hook *et al.* ont montré qu'elle est également capable d'inhiber la Prohormone Thiol Protéase (PTP) une cystéine protéase (Hook *et al.*, 1993). Il a été trouvé aussi qu'elle possède une activité inhibitrice envers la protéinase K (Komiyama *et al.*, 1996). Récemment, il a été rapporté que l' α_1 -ACT influence la phosphorylation de la protéine TAU (une protéine associée aux microtubules, fortement exprimée dans les neurones se situant dans les axones) et l'apoptose des cellules neuronales (Padmanabhan *et al.*, 2006).

Il est connu aussi que la SERPINA3 a la capacité d'interagir avec l'ADN, un attribut rare parmi les serpins (Rubin *et al.*, 1990 ; Naidoo *et al.*, 1995), ses fonctions physiologiques associées à son affinité pour l'ADN, par contre, restent inconnues. Au sein du noyau, l' α_1 -ACT s'est avérée être un modulateur de la réplication de l'ADN via l'inhibition de l'ADN primase et l'ADN polymérase α (Tsuda *et al.*, 1986; Takada *et al.*, 1988a,b). La mise en évidence de ces nouvelles fonctions, combinée à sa présence dans le noyau des cellules cancéreuses humaines, suggère que cette protéine pourrait influencer la formation des tumeurs (Tsuda *et al.*, 1986). Même si les rôles de la liaison à l'ADN et la localisation nucléaire de l' α_1 -ACT sont encore mal cernés, inhiber ces propriétés pourrait éventuellement compromettre certaines de ses fonctions *in vivo*. De plus, il a été reporté récemment que la SERPINA3 humaine est capable d'inhiber la staphopaine C (ScpA2) une cystéine protéase aviaire sécrétée par des souches de *Staphylococcus aureus* (Wladyka *et al.*, 2011).

Sur le plan médical, une déficience en SERPINA3 peut conduire à différents troubles physiologiques et serpinopathies, notamment des désordres respiratoires (bronchite chronique et emphysème) et des problèmes chroniques du foie (Chang et Lomas, 1998 ; Duranton *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2002). Sous certaines conditions, la SERPINA3, tout comme plusieurs autres serpinés, est sujette à de dramatiques altérations conformationnelles qui mènent à la formation de polymères inactifs et qui sont à l'origine de ces diverses maladies.

Les variations des concentrations de cette protéine sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer, et son insuffisance a été associée à l'affection hépatique. Des mutations ont été identifiées chez des patients présentant la maladie de Parkinson. Elle est surexprimée dans les tissus du cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et elle est un composant majeur des plaques amyloïdes A β (Ma *et al.*, 1994 ; Abraham, 2001), tandis que le polymorphisme de sa région promotrice semble influencer le développement de cette maladie neurodégénérative (Licastro *et al.*, 2005). Elle est surexprimée également dans les tissus du cancer du sein que dans les tissus sains où elle est hautement régulée par les hormones stéroïdiens (Laursen et Lykkesfeldt, 1992 ; Confort *et al.*, 1995). Des concentrations élevées ont été aussi trouvées dans de nombreuses tumeurs, les taux de l'ARNm de l' α_1 -ACT peuvent avoir ainsi une signification pronostique (Yamamura *et al.*, 2004).

La protéine semble être impliquée également dans la protection de la matrice extracellulaire du placenta contre la dégradation, étape cependant nécessaire à l'implantation dès le stade blastocyste. Cependant, la surexpression du gène *SERPINA3* (dû à des défauts de méthylation de l'ADN au niveau du promoteur de l' α_1 -ACT) et la localisation de la protéine au niveau de la membrane du syncytiotrophoblaste, pourraient être très défavorables à une implantation correcte et augmenter ainsi les risques d'une serpinopathie placentaire, dont fait partie la pré-éclampsie (pathologie placentaire très fréquente caractérisée par une hypertension artérielle gravidique) (Chelbi *et al.*, 2007).

Sur le plan appliqué, son affinité pour l'ADN, en plus de la rendre plus stable face aux peptidases, pourrait s'avérer utile pour sa purification à l'aide des techniques de chromatographie d'affinité utilisant l'ADN comme ligand (Siddiqui *et al.*, 1980 ; Abdullah *et al.*, 1983). L' α_1 -ACT s'est révélée aussi en complexe avec l'antigène spécifique de la prostate, qui est considéré important pour la détection du cancer de la prostate (Mikolajczyk *et al.*, 2002 ; Stephan *et al.*, 2002 ; Martinez *et al.*, 2002 ; Schmid *et al.*, 2007). Des taux élevés de l' α_1 -ACT dans le sérum peut être un bio-marqueur potentiel pour détecter les cancers du pancréas

(Koomen *et al.*, 2005), de l'appareil gastro-intestinale (Alggayer *et al.*, 1998) et du poumon (Higashiyama *et al.*, 1995). En outre, il a été très récemment proposé que la SERPINA3 peut être utilisée comme biomarqueur pour détecter les infections dues aux prions chez l'humain (Miele *et al.*, 2008). Finalement, pour l' α_1 -ACT comme pour de nombreuses autres protéines à plusieurs fonctions, la localisation cellulaire peut être cruciale pour la modulation de ces différentes activités (Jeffery, 1999 ; Arnoys et Wang, 2007).

IV.2.3. Polymorphisme de la famille des SERPINA3 chez les mammifères

Plusieurs serpinines de la famille de l' α_1 -antichymotrypsine (SERPINA3) ont été décrites chez plusieurs espèces de mammifères. Le nombre le plus élevé d'orthologues de la famille des serpinines A3 ont été trouvés chez la souris (quatorze) et le bovin (onze), et à moindre nombre chez d'autres espèces tels que, le rat (six), le porc (quatre), la chèvre (deux), le xénope (deux), et un seul membre du clade A3 chez le singe d'orang-outang de Sumatra, l'Ayus ou poisson parfumé, l'autruche et le poulet domestique.

IV.2.3.1. Souris (*Mus musculus*)

Le premier orthologue de l' α_1 -ACT humain a été isolé dans le plasma de la souris en 1982 par Takahara et Sinohara. Cependant, cette serpinine a montré une plus grande activité inhibitrice vis-à-vis de la trypsine que la chymotrypsine d'où son appellation contrapsin (contre-trypsine) (Takahara et Sinohara, 1982). L'analyse des séquences a révélé que la contrapsin présente une identité nucléotidique de 70% et peptidique de 60% à son homologue SERPINA3, bien que son RCL était sensiblement différent avec un nombre élevé de substitutions d'acides aminés dans cette région (Hill *et al.*, 1984 ; Hill *et al.*, 1985). D'autres investigations postérieures ont montré que la contrapsin est un membre d'une famille multi-génique regroupée dans un seul cluster sur le chromosome 12 nommé *Spi-2* (Hill *et al.*, 1985 ; Inglis et Hill, 1991 ; Horvath *et al.*, 2004). Le cluster des gènes correspondant au chromosome humain 14q32 est tracé sur le chromosome 12F1 chez la souris (Goodwin *et al.*, 1997).

L'existence d'un locus de dix (10) membres d'une famille multi-génique des serpinines A3 murine étroitement liées a été démontrée sur le chromosome 12 (Inglis et Hill, 1991). Quatre (4) autres membres ont été plus tard identifiés sur le même chromosome (Forsyth *et al.*, 2003), formant ainsi une famille de 14 membres. Ces 14 orthologues ont une très haute homologie de séquence à l' α_1 -ACT et sont présumés être dérivés d'un seul ancêtre commun (Rheume *et al.*, 1994). Le locus *Spi-2* de la souris a été par la suite renommé, *serpina3*, en accord avec la nouvelle nomenclature des serpinines (Forsyth *et al.*, 2003).

IV.2.3.2. Bovin (*Bos taurus*)

Les serpinés sont largement étudiés dans de nombreux tissus et cellules de mammifères mais très peu chez le bovin, et les connaissances sur les gènes des serpinés bovins sont restreintes. Néanmoins, trois serpinés du clade A3 (Endopine 1, Endopine 2A et 2C) ont été identifiées chez le bovin, et qui sont potentiellement impliqués dans la surveillance des voies sécrétoires. La première protéine séquencée c'est bien l'Endopine 1 (Hwang *et al.*, 1999a), « *endo* » pour les cellules endocrines et « *pine* » pour les serpinés. L'Endopine 1 a été identifiée dans les vésicules neurosécrétrices des cellules de chromaffine de la médulle adrénaie (Hwang *et al.*, 1999a ; Hook *et al.*, 2002), elle a été également détectée dans les tissus musculaires avec une localisation intracellulaire (Tassy *et al.*, 2005). Elle possède un résidu d'arginine en position P1 sur le site de clivage de son RCL. Trois enzymes (la trypsine, l'élastase humaine et la plasmine) ont été identifiées comme étant ces enzymes cibles (Hwang *et al.*, 1999a ; Tassy *et al.*, 2005). Elle a été trouvée aussi capable d'inhiber la Prohormone Thiol Peptidase (PTP), une cystéine protéase qui convertit spécifiquement la pro-enkephaline inactive en forme active par clivage protéolytique limité (Hwang *et al.*, 1999a).

L'Endopine 2A (autrefois Endopine 2) est une serpine à inhibition croisée (cross-class inhibition) qui inhibe en même temps des membres de peptidases de type cystéine et sérine (Hwang *et al.*, 2002). Une forme glycosylée de l'inhibiteur s'est avérée en association avec les vésicules de sécrétion des cellules chromaffines comme démontré par la co-localisation avec la (Met)-enkephaline par des études de microscopie d'immunofluorescence confocale (Ragg, 2007). Elle a été aussi détectée dans les granules de chromaffines purifiées (Hwang *et al.*, 2002 ; Hook *et al.*, 2002), toutefois, aucune enzyme cible n'a été identifiée.

L'autre serpine bovine du clade A3 récemment décrite est l'Endopine 2C, qui peut intervenir également dans les voies cellulaires d'excrétion. L'Endopine 2C recombinante a montré une forte et efficace inhibition de la cathepsine L, et elle inhibe faiblement la papaïne, et l'élastase pancréatique porcine (Hwang *et al.*, 2005).

Parmi les séries des inhibiteurs à sérine fractionnés du muscle squelettique du bovin, deux serpinés de la famille des SERPINA3 ont été extraites et caractérisées biochimiquement (Tassy *et al.*, 2005 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006a). Ces deux serpinés initialement nommés mEndopine 1A et 1B sont aujourd'hui répertoriés dans les banques de données sous le nom de bovSERPINA3-1 et bovSERPINA3-3, respectivement (Ouali *et al.*, 1995 ; Pélissier *et al.*, 2008). Le gène codant cet inhibiteur, a été identifié et séquencé, il est constitué de 4 exons et 3

introns. Il s'agit en fait de deux membres d'une famille complexe de serpinines (bovSERPINA3-1, ..., bovSERPINA3-8), qui partagent une identité proche de 93%. Ces deux anti-peptidases, bien que très proches structurellement, présentent des variations en acides aminés, en particulier au niveau du site actif de leur RCL (Herrera-Mendez *et al.*, 2006a). Elles sont également différentes de par leur degré de glycosylation qui peut justifier les modifications retrouvées au niveau des profils d'inhibition mesurés sur différentes classes de peptidases commerciales. Par exemple, la serpine bovSERPINA3-3 possède une masse moléculaire d'environ 75 kDa supérieure à sa masse théorique d'environ 47 kDa.

En 2008, Pélissier *et al.*, ont pu mettre en évidence cette famille multi-génique des serpinines A3 bovines composée d'au moins 9 membres ; qui possèdent la capacité d'inhiber la chymotrypsine, la trypsine, l'élastase et la plasmine, ainsi que les caspases 3 et 8 considérées comme peptidases de type cystéine intervenant dans l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Pélissier *et al.*, 2008 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2009). L'ensemble de ces gènes est localisé sur un fragment d'ADN d'environ 200 kpb situé dans le locus q24 du chromosome 21 (figure 18) (Pélissier *et al.*, 2008). L'existence d'un seul gène orthologue chez l'Homme, *serpina3*, avec lequel elles partagent approximativement 70 % d'identité démontre la présence d'une situation originale chez le bovin.

IV.2.3.3. Rat (*Rattus norvegicus*)

Six serpinines du clade A3 appelés contrapsins, homologues à la SERPINA3 ont été identifiées dans le génome du rat, situés sur le chromosome 6q32, il s'agit des Serpina3I (Spin2a), Serpina3k (Spin2b), Serpina3n (Spin2c), Serpina3m (LOC299279), SPI-2.2, et SPI-2.4 (Ohkubo *et al.*, 1991 ; Hu *et al.*, 2002 ; Horvath *et al.*, 2004). De façon remarquable la serpine Spin2c (Serpina3n) du rat possède un RCL identique à celui de la serpina3n de la souris sur toute la séquence P15–P4' (Schwartzberg *et al.*, 1989). Les cinq autres serpinines restantes sont largement divergentes et montre une très légère ressemblance aux autres serpinines A3 murine sur toute la longueur de la séquence du RCL.

Chez les rats masculins, le niveau d'expression de la serpine A3 est plus élevé que chez les rats femelles, où il est réduit pendant l'inflammation aiguë (Le Cam *et al.*, 1987 ; Pages *et al.*, 1990). Il a été montré qu'elles s'associent aux kallikréines et les inhibent, et elles inhibent aussi la trypsine d'où leur nom contrapsins, tandis qu'elles ne possèdent pas le pouvoir d'inhibition de la chymotrypsine ou l'élastase (Le Cam *et al.*, 1987 ; Ohkubo *et al.*, 1991).

IV.2.3.4. Porc (*Sus scrofa*)

Chez le porc, six (6) inhibiteurs de serine peptidases ont été identifiées : PII (SERPINA1), PI2, PI3, PI4, PO1A et PO1B. Les sites du locus correspondant sont étroitement liés (Gahne et Juneja, 1986 ; Stratil *et al.*, 1990 ; Cizova *et al.*, 1993) et la position du groupe de liaison est localisée à l'extrémité distale du chromosome 7q (exactement dans la région 7q23–q26), c'est le cas des deux gènes *PI1* et *PI2* (de la *SERPINA3*) situés dans cette région (Archibald *et al.*, 1996; Musilova *et al.*, 1995). Chez l'humain, la taille globale dans l'ADN génomique du gène de la *SERPINA3* est estimée à 11,7 kpb (Bao *et al.*, 1987), alors que le gène *SERPINA3-2* porcine est estimé à 9,0 kpb approximativement (Stratil *et al.*, 2002).

Trois (PI2, PI3 et PI4) des six gènes porcins font partie de la famille des *SERPINA3* porcine sur la base d'une caractérisation physico-chimique partielle de leurs protéines (Stratil *et al.*, 1995). Un seul ADN complémentaire entier, nommé *SERPINA3-1*, correspondant à la PI2 et un gène, nommé *SERPINA3-2*, ont été séquencés (Buchman *et al.*, 1990 ; Stratil *et al.*, 2002) et sont clairement similaires à la famille des *SERPINA3* humaine. Les deux présentent une identité de 76 % en acides aminés, avec une très large différence près de l'extrémité C-terminale contenant le site du clivage P1–P1' (Stratil *et al.*, 2002). Les deux gènes PO1A et PO1B codent pour des inhibiteurs de cystéines peptidases, qui semblent être très divergents des autres serpines (Gahne et Juneja, 1985; Stratil *et al.*, 1988).

IV.2.3.5. Autres espèces

Chez d'autres espèces plusieurs homologues de l' α_1 -ACT ont été identifiés, et qui sont répertoriés dans les bases de données protéiques et la plus part d'entre eux ne sont pas publiés. Parmi ces différentes serpines du clade A3, on trouve deux membres chez le Xénope (la *serpina3* LOC495377 (AN : Q5U539) et la *serpina3* (AN: Q5M8K2)), un seul membre chez le singe d'orang-outang de Sumatra (*Pongo abelii*) et qui est hautement identique à la *SERPINA3* humaine, son numéro d'accèsion est Q5R536 sur UniProt. Un autre membre de cette famille des serpines A3 est identifié chez l'Ayus ou poisson parfumé du Japon (*Plecoglossus altivelis*), d'un poids moléculaire ne dépassant pas 18,7 kDa, de 168 résidus d'acides aminés (Miyachi *et al.*, 2010).

Deux inhibiteurs de peptidases à sérine du clade A3 ont été isolés et caractérisés dans le plasma de la chèvre. L'analyse des séquences N-terminales des protéines purifiées a révélé que toutes les deux sont similaires et sont des homologues de la *SERPINA3* que la *SERPINA1*. Contrairement à l' α_1 -ACT humaine, un des inhibiteurs désigné sous l'appellation, contrapsin,

s'est avéré avoir une forte et spécifique inhibition de la trypsine, alors que l'autre était un inhibiteur efficace de l'élastase de neutrophile, appelé elastasine (Potempa *et al.*, 1995). Frost *et al.* (1997), ont aussi purifié et caractérisé partiellement l' α_1 -ACT de l'Autruche à partir du sérum. Enfin, un autre membre est identifié chez le poulet domestique (*Gallus gallus*) d'un PM de 42,9 kDa et une séquence en acides aminés de 378 résidus (Hillier *et al.*, 2004).

IV.2.4. Polymorphisme de la SERPINA3 chez l'*Homo sapiens*

Chez l'*Homo sapiens*, l' α_1 -ACT ne suit pas la règle vu qu'un seul gène de cet inhibiteur qui semble existait, ce qui fait l'exception aux autres espèces de mammifères décrites ci-dessus. La possibilité formelle qui existe est que la forme unique de la SERPINA3 chez l'homme est un résultat de la perte d'un gène, cependant, il n'y a aucune évidence de pseudogènes ou de fragments relatifs de gènes sur le chromosome 14. Néanmoins, on ignore toutes connaissances sur les serpinés A3 humaines qui ne comprendrait qu'un seul membre jusqu'à ce jour. L'étude du cluster du clade « A » dans d'autres primates pourra peut être nous aider à aborder cette question.

Le polymorphisme décrit pour cette protéine semble être tissu spécifique, et il apparaît en association à quelques résidus de la séquence peptidique. Les seuls polymorphismes décrits, sont ceux associés aux changements d'allèles dans les séquences de la région promotrice du peptide signal induisant certaines serpinopathies. Le premier polymorphisme décrit est associé aux changements d'allèles de A → T (de l'Alanine à la Thréonine (A/T)) au codon 15 de la région du peptide signal (Faber *et al.*, 1993 ; Kamboh *et al.*, 1995 ; Dardiotis *et al.*, 2008 ; Somarajan *et al.*, 2010). Des études expérimentales (Morgan *et al.*, 2001) et cliniques indiquent que le polymorphisme A/T de la SERPINA3 influence l'expression et le taux plasmatique de la protéine (Licastro *et al.*, 2000 ; Slowik *et al.*, 2005). Il a été rapporté que la différence dans cet allèle n'est pas associée au taux de l' α_1 -ACT dans le sérum (Poller *et al.*, 1993). Cependant, il a été considéré que le peptide signal de cet allèle pourrait influencer la sécrétion locale de la SERPINA3 par les macrophages et l'épithélium alvéolaires des poumons, spécifiquement durant la phase inflammatoire (Nagareda *et al.*, 1991 ; Cichy *et al.*, 1995). Tandis qu'on ignore aujourd'hui, si ce polymorphisme affecte la fonction inhibitrice de la SERPINA3.

Le second polymorphisme décrit est associé aux changements de l'allèle G → T (de la Guanine à la Thiamine (G/T)) dans la région promotrice du gène de l' α_1 -ACT, ou l'allèle T est associé à une augmentation de 22 % de la concentration moyenne de la SERPINA3 dans le plasma (Morgan *et al.*, 2001).

*MATERIEL ET
METHODES*

Chapitre V

« Matériel et Méthodes »

I. Matériels

I.1. Matériel biologique « sérum humain »

Le sérum du sang humain utilisé pour la purification de l'inhibiteur de la SERPINA3, est prélevé et collecté chez un donneur sain après une coagulation de 2 à 4 heures. Le sang est prélevé au Centre Jean Perrin (CJP), Clermont-Ferrand – France, puis acheminé directement à l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), équipe BPM (unité 370, QuaPA), station de recherches de Theix.

I.2. Enzymes, substrats et inhibiteurs

Les substrats et inhibiteurs : *N*-CBZ-Phe-Arg-NHMec, MeO-Ala-Ala-Pro-Phe-NHMec, *N*-MethylSuc-Ala-Ala-Pro-Val-NHMec et *N*-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-NHMec de chez Sigma pour la trypsine, la chymotrypsine, la caspase 3 et l'élastase respectivement (où CBZ, benzyloxycarbonyl ; NHMec, 7-amido-4-méthylcoumarin; Suc, succinyl ; MeO, methoxy), et leur inhibiteurs synthétiques respectifs : 4-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoate ou p-NPGB (de chez Sigma), Z-Gly-Gly-Phe-CMK, Z-Asp-Glu-Val-Asp-CMK, et Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-CMK (de chez Bachem) (où CMK, chloromethylketone).

Les enzymes : trypsine pancréatique bovine (EC 3.4.21.4), chymotrypsine du plasma bovin (EC 3.4.21.1), et caspase 3 (EC 3.4.22.B9) proviennent de chez Sigma ; quant à l'élastase du leucocyte humain (EC 3.4.21.37), provient de chez Calbiochem (Meudon, France).

I.3. Matériels de chromatographie

Les supports et les colonnes pour système FLPC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) utilisés lors des étapes de chromatographie sont : HiTrap Blue HP 5 ml (colonne d'affinité), et deux Q-Sépharose (échangeur anionique) de dimension différentes ont été obtenus chez Pharmacia.

I.4. Matériels d'électrophorèse et du Western Blot

Deux cuves d'électrophorèse ont été utilisées, la première de marque Hoefer Scientific Instruments, série SE 250 à l'INRA de Clermont-Ferrand (France) et la deuxième de marque MAX FILL à l'INATAA de Constantine. La cuve de transfert pour le western blot utilisée est la même dans les deux institutions de marque O_{WL} HEP-1 de chez Thermo Scientific.

I.5. Matériels de spectrométrie

Deux différents types de spectrofluorimètre ont été utilisés : un spectrofluorimètre Perkin Elmer type LS-5, et un autre de chez Bio-Tek Instruments type FLx800 Microplate Fluorescence Reader. On a aussi utilisé un spectrophotomètre U-2001 (Hitachi) pour la mesure des absorbances.

I.6. Matériels de spectrométrie de masse

Deux spectromètres de masse ont été utilisés : le premier de type MALDI-TOF modèle Voyager DE-PRO (PerSeptive BioSystems, Farmingham, USA) et le second de type LC MS/MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) modèle LCQ Ion Trap (Thermo Electron, Coutabœuf, France).

II. Méthodes

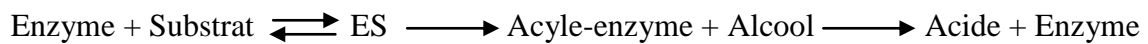
II.1. Préparation des enzymes

La trypsine a été préparée dans une solution d'HCl à 1mM, puis aliquotée dans des Ependorff de 1 ml et conservés à - 80 °C. La chymotrypsine a été préparée dans un tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, CaCl₂ 10 mM à une concentration de 100µM. L'élastase a été reconstituée à raison de $8,5 \cdot 10^{-6}$ mol/l dans une solution d'acétate de sodium à 50mM, pH 5,5, NaCl 150mM. Enfin, la caspase 3 ($10 \cdot 10^{-9}$ M) a été préparée dans un tampon HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1 %, saccharose 10 % auquel sont ajoutés 10 mM de DTT au moment de son utilisation.

II.2. Titration des enzymes

La trypsine qui est une endoprotéase hydrolysant les liaisons peptidiques en position C-terminale dans lesquelles un acide aminé basique, la Lys (K) ou Arg (R), engage sa fonction acide, est titrée en utilisant du 4-Nitrophényl-p-guanidinobenzoate (p-NPGB) selon la méthode décrite par Chase et Shaw (1970). Les serine protéinases sont particulièrement

faciles à doser car elles ont l'avantage de former, lors du processus catalytique, un intermédiaire nommé acyle-enzyme. Cet acyle-enzyme est ensuite hydrolysé en acide et enzyme. Si cette hydrolyse est très lente, l'alcool libéré lors de la formation de l'acyle-enzyme est équivalent au nombre de moles d'enzyme active que l'on peut déduire en mesurant l'absorbance de l'alcool chromogénique formé.



Le substrat de la trypsine utilisé est le p-NPGB de chez Sigma. Ce substrat est choisi préférentiellement car l'acyle-enzyme formée lors du processus catalytique est particulièrement stable.

Dans une microcuve de 1 cm de trajet optique, 100 μl d'une solution de trypsine, préparée à raison de 1 mg/ml à l'aide d'un tampon HCl 1mM, sont dilués avec 890 μl de tampon d'incubation (Tris-HCl, 50mM), pH 8.5, après mélange 10 μl de la solution de p-NPGB sont ajoutés dans la microcuve. Le p-NPGB réagit avec la trypsine et l'alcool formé, le p-nitrophénol, donne à la solution une coloration jaunâtre visible à l'œil, dont l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 410 nm à l'aide du spectrophotomètre U2001 (Hitachi). Une autre mesure témoin est réalisée en même temps avec une autre microcuve contenant 100 μl de tampon sans trypsine, 890 μl du tampon d'incubation et 10 μl du substrat (p-NPGB).

La molarité du p-nitrophénol généré peut être calculée selon la formule :

$$[\text{p-Nitrophénol}] = \text{DO} \times 6,025.10^{-5} \times 10$$

Où la DO représente la densité optique du p-nitrophénol libéré, $6,025.10^{-5}$ le coefficient d'extinction molaire du p-nitrophénol, et 10 le facteur de dilution de la trypsine. La molarité du p-nitrophénol produit permet de déduire la molarité de la trypsine active.

La caspase 3 est une protéase à cystéine, qui clive son substrat cible du côté C-terminal d'un résidu Asp (D) présent dans un site de reconnaissance spécifique. Dans le cas de la caspase 3 humaine, ce site correspond au motif DEVDX ou DMQDX avec X correspondant à n'importe quel acide aminé en dehors de la proline. La caspase 3 liquide stockée à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (EC 3.4.22.B9) provenant de chez sigma est titrée avec l'inhibiteur commercial irréversible Z-Asp-Glu-Val-Asp-CMK (Z-DEVD-CMK) de chez Bachem. La

titration est réalisée selon la méthode de Stennicke et Salvesen (1999), l'enzyme est reprise au préalable dans le tampon d'incubation : HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1%, saccharose 10 %, auquel sont ajoutés 10 mM de DTT au moment de son utilisation.

La concentration de la caspase 3 est de 0,29 mg/ml, elle a été diluée 10 fois dans le tampon d'incubation, donc sa molarité est de $8,16 \cdot 10^{-7}$ M. Une solution de 5 nM de la caspase 3 est titrée avec une gamme de dilution de l'inhibiteur (Z-DEVD-CMK) (figure 19) allant de 0 à 50 μ M qui est estimée après une pré-incubation de 5 minutes à 25°C, ou 50 μ l du substrat N-Acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-NHmec de chez sigma à 100 μ M est ajouté. La fluorescence est lue pendant 5 à 10 minutes à l'aide du spectrofluorimètre Bio-Tek type FLx800 ou celui du Perkin Elmer type LS-5 à une longueur d'onde d'excitation de $\lambda = 360$ nm et d'émission de $\lambda = 440$ nM. Le calcul de la concentration de l'enzyme active dans la solution est déterminé par la formule :

$$[E]_{\text{active}} = [I] (V_I/V_E) \times \text{facteur de dilution}$$

Où :

$[E]_{\text{active}}$: concentration réelle de l'enzyme active (en nM) ;

$[I]$: concentration de l'inhibiteur (pour notre exemple nous avons 9,06 nM) ;

V_I : volume de 20 μ l des différentes dilutions de l'inhibiteur ;

V_E : volume de l'enzyme de 30 μ l ($[E] = 5$ nM) ;

La chymotrypsine (EC 3.4.21.1) est une protéase digestive, de la famille des serine protéases, qui peut accomplir la protéolyse. Elle catalyse l'hydrolyse du lien peptidique d'une protéine, coupant préférentiellement sur le côté C-terminal des acides aminés à longues chaînes latérales aromatiques et hydrophobes : de la Tyr, du Trp, et de la Phe. Ces acides aminés non-polaires créent une poche hydrophobe nécessaire à l'activité enzymatique. Elle a été titrée en utilisant l'inhibiteur irréversible Z-Gly-Gly-Phe-CMK (où CMK = Chloromethylketone) (Wilcox *et al.*, 1971). Une quantité de 3,4 mg de l'enzyme lyophilisée est reconstituée dans 1360 μ l du tampon de reconstitution Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, CaCl₂ 10 mM, pour avoir une concentration finale de 100 μ M.

L'élastase du leucocyte humain ou HLE (*Human Leucocyte Elastase*) (E.C. 3.4.21.37), est une sérine protéase qu'on rencontre dans les granules des neutrophiles

(Vender, 1996), a été titrée après restitution dans son tampon de reconstitution : acétate de sodium 50 mM, pH 5.5, NaCl 150 mM à une concentration finale de $8,5 \cdot 10^{-6}$ mol/l en utilisant l'inhibiteur irréversible Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-CMK de chez Bachem (Powers *et al.*, 1977).

II.3. Mesure des activités enzymatiques

Les activités des différentes enzymes sont mesurées en suivant l'hydrolyse d'un substrat synthétique fluorescent à l'aide des spectrofluorimètres Perkin Elmer LS-50B (pour la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et la caspase 3) et Bio-Tek's FLx800 Microplate Fluorescence Reader (pour la caspase 3 uniquement) étalonnés au préalable avec des solutions de 0,1 et 0,5 μ M du $-NH_2Mec$ (7-amido-4-méthylcoumarin). La fluorescence du $-NH_2Mec$ libérée après hydrolyse du substrat de l'enzyme, est mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 440 nm à des largeurs de fente de 8 ou 15 nm. Le pas de longueur d'onde était de 0,5 nm et la durée d'acquisition du signal était de 1 seconde pour chaque puits.

L'activité de la trypsine est mesurée selon Tassy *et al.* (2005) en utilisant N-CBZ-Phe-Arg-NHMec comme substrat. En ce qui concerne la chymotrypsine, le substrat utilisé est le Meo-Ala-Ala-Pro-Phe-NHMec (Barret, 1980), et pour l'élastase le substrat utilisé est le Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NHMec (Powers *et al.*, 1977). Les activités de la caspase 3 ont été mesurées selon Stennicke et Salvesen (1999) en utilisant comme substrat le N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-NHMec.

Les substrats de la chymotrypsine, l'élastase et la caspase 3 ont été reconstitués en solutions stock dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à une concentration finale de 10 mM, et sont conservés à température ambiante et à l'abri de la lumière. Quant au p-NPGB, le substrat spécifique de la trypsine, il a été reconstitué dans du DMF (diméthylformamide) à une concentration finale de 50 mM et la solution obtenue, pour être plus stable, est diluée dans 4 volumes d'acétonitrile à une concentration finale de 10 mM. La solution du p-NPGB ainsi préparée peut être conservée plusieurs semaines à 4°C.

Les différents tampons d'incubation adéquats utilisés pour les différentes enzymes étudiées sont comme suit :

- ✓ Tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.5 stocké à 4 °C pour la trypsine ;
- ✓ Tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.0, CaCl₂ 10 mM stocké à 4 °C pour la chymotrypsine ;

- ✓ Tampon Tris/HCl 70 mM, pH 8.0, CaCl₂ 10 mM stocké à 4 °C pour l'élastase ;
- ✓ Tampon HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1%, saccharose 10% auquel sont ajoutés 10 mM de DTT extemporanément pour la caspase 3.

40 µl de la solution d'enzyme (5nM) sont incubés dans une microplaque de 96 puits à 37°C en présence de 50 µl du substrat spécifique (10 mM dans du DMSO) diluée 33 fois [100 µM] dans du Brij 35 à 0.1%, et complété avec le tampon d'incubation adéquat à un volume final de 150 à 160 µl, pendant 15 min pour la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase avant d'effectuer la lecture. Une unité d'activité enzymatique correspond à 1 µM de N-Mec libéré par minute à 37 °C.

En ce qui concerne la caspase 3, 30 µl de l'enzyme ($8,16 \cdot 10^{-7}$ M) est incubée à 25°C pendant 5 minutes avec 50 µl du substrat N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-NHMec, 100 µM. Une unité d'activité enzymatique correspond à 1 µM de N-Mec libéré par minute à 25 °C.

II.4. Purification de la SERPINA3

Pour son utilisation ultérieure dans les diverses études biochimiques et structurales, la protéine sauvage SERPINA3 humaine a dû être purifiée. Plusieurs méthodes existent pour purifier l' α_1 -antichymotrypsine humaine (l' α_1 -ACT) ou SERPINA3.

Travis *et al.* (1978) ont purifié l' α_1 -ACT jusqu'à homogénéité par fractionnement à l'ammonium sulfate par chromatographie sur Cibacron Blue Sépharose à pH 7,0 suivie par chromatographie sur SP-Sephadex C-50 à pH 5,5 à partir d'un stock de plasma humain. Katsunuma *et al.* (1980) ont purifié une protéine se liant à l'ADN, supposé être un marqueur tumoral jusqu'à homogénéité. Plus tard, il a été constaté que la protéine se liant à l'ADN est l' α_1 -ACT. Laine et Hayem (1981) ont employé quatre étapes de chromatographie pour obtenir l' α_1 -ACT pure. La purification par affinité basée sur la matrice du Sépharose couplée aux immunoglobulines de l'anti-SERPINA3 a été aussi décrite par Matsumoto *et al.* (1981). Récemment, Manolov *et al.* (2008) ont décrit une méthode simple et un protocole rentable et effectif de purification à partir du plasma humain en utilisant la protéine recombinante de surface (Usp A1, *ubiquitous surface protein*) de *Moraxella catarrhalis* ayant la capacité de se lier spécifiquement à l' α_1 -ACT par un mécanisme de virulence nouvellement décrit.

En plus de l'isolement à partir de plasma complet, l' α_1 -ACT humaine a été clonée, séquencée et exprimée dans *Escherichia coli* (Rubin *et al.*, 1990) et est exprimée aussi

récemment en culture cellulaire de tabac *Nicotiana tabacum* cv BY-2 (Benchabane *et al.*, 2009).

Notre protocole de purification simple et moins coûteux de la SERPINA3 est inspiré et développé à partir de la première méthode décrite par Travis *et al.* (1978) et citée précédemment, par l'utilisation de quatre étapes de chromatographie, en exploitant uniquement deux types de supports chromatographiques.

II.4.1. Préparation du sérum

Dans le but de comparer les résultats des différents essais chromatographiques pour optimiser et mettre au point le protocole de purification nous avons utilisé le sang du même donneur pendant toute l'étude. Notre choix s'est porté sur le sérum humain vu sa richesse en inhibiteur de type SERPINA3 (α_1 -ACT), et qui est sécrétée, comme pour l' α_1 -AT, par les hépatocytes à un taux basal de 0,3 à 0,6 g/litre et peut atteindre une concentration de 3 g/litre dans les conditions inflammatoires (Calvin et Price, 1986 ; Whicher *et al.*, 1991).

Le sérum est préparé à partir de 18 ml du sang humain (figure 20). Après 2 heures de coagulation du sang collecté, le sérum est récupéré délicatement dans des tubes de 5 ml puis soumis à une centrifugation à faible vitesse de 1000 rpm dans une centrifugeuse de type Jouan BR4i pendant 10 minutes, permettant l'élimination de l'hémoglobine, une quantité d'albumine, les lipoprotéines et d'autres protéines sériques, les noyaux et les débris cellulaires. Un volume de 5 ml du sérum ayant une coloration jaunâtre est ainsi récupéré puis dilué à 1 : 1 dans du tampon phosphate NaH_2PO_4 30 mM, pH 7,0.

II.4.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation saline consiste à ajouter du sel à la solution de protéines. La solubilité des protéines dépend de la force ionique du milieu : $\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$, où C_i : concentration en sel, Z_i : nombre de charges (μ d'autant plus élevée qu'il s'agit d'un sel divalent comme dans le cas du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). S'il on part de zéro, la solubilité d'une protéine augmente d'abord quand on ajoute du sel (*Salting in*) ensuite il se produit l'effet inverse (*Salting out*). Ceci est vrai avec tous les sels. On utilise préférentiellement l'ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ car il est très soluble (jusqu'à 4 M.l⁻¹). On peut donc obtenir de très grandes forces ioniques.

Le pH des 10 ml du sérum ainsi dilué contenant l'inhibiteur est ajusté à pH 7,0 avec une solution de NaOH, puis concentré par précipitation au sulfate d'ammonium (AS) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (figure 20) entre 50 et 80 % de saturation, à 25 °C (Green et Hughes, 1955).

La première saturation jusqu'à 50 % est effectuée par ajout de 3,13 g de cristaux de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à raison de 0,3 g/min, sous agitation. L'addition de quantités importantes d'AS entraîne une baisse du pH pouvant atteindre une unité pH. Au cours de la précipitation, le pH est donc régulièrement réajusté à 7,0 par une solution de NaOH. La solution a été centrifugée à 20 000 $\times g$ pendant 15 min et à 25°C. Après élimination du culot, le surnageant a été repris et de nouveau fractionné au sulfate d'ammonium jusqu'à 80 % de saturation par ajout de 2,567 g d'AS sous agitation et avec ajustement du pH à 7,0. L'échantillon est ensuite centrifugé 15 minutes à 20 000 $\times g$ et à 25°C.

II.4.3. Dialyse

Fréquemment, il est nécessaire d'éliminer le sel ou de changer le tampon après chaque étape de purification dans le but de travailler efficacement dans la prochaine étape, vu que le pH peut influencer le contact et l'interaction de la protéine avec le ligand de la colonne chromatographique. Par ailleurs, on élimine aussi le sel après chaque étape de précipitation. Ceci s'effectue par dialyse. Où la solution protéique est placée dans un boudin (membrane) de dialyse semi-perméable puis placée dans le tampon de dialyse adéquat, les petites molécules peuvent passer facilement à travers la membrane, tandis que les grosses molécules sont retenues.

Le culot (précipité) est alors repris et solubilisé dans 10 ml environ de NaH_2PO_4 30 mM, pH 7,0, puis dialysé à 4°C dans un boudin de dialyse type Spectra/Por Biotech RC de 1 cm de diamètre, sous agitation constante pendant une nuit contre 5 litres du même tampon afin d'éliminer le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La présence de sel permet de réduire l'interaction protéine-protéine et, par conséquent, de dissocier les complexes protéiques et de minimiser les interactions avec le support chromatographique.

II.4.4. Purification

La chromatographie occupe une place très importante parmi les procédés de purification des produits biotechnologiques. Pour chaque méthode, un grand nombre de matériaux de séparation et d'appareils sont disponibles dans le commerce. Il est possible, par exemple, de réaliser une stratégie de recouvrement pour une protéine en quelques heures,

avec le système Äkta™. En laboratoire, de nombreux procédés de séparation par chromatographie sont réalisés sous moyenne ou haute pression, tel que le système FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*).

Dans notre cas, et pour purifier la SERPINA3 à partir du sérum, une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative a été utilisée, englobée uniquement en deux types de supports chromatographiques. Le sérum traité obtenu après dialyse et filtration est dégazé, avant d'être chromatographié sur un support d'une colonne de chromatographie d'affinité couplée à un système FPLC de chez Pharmacia. Ce dernier, a servi à la réalisation des différentes chromatographies pour la purification de la SERPINA3 en introduisant les programmes d'élutions par un Gradient Programmer GP-250 Plus.

II.4.4.1. Purification de l'inhibiteur par chromatographie d'affinité

La première colonne de chromatographie utilisée pour purifier l'inhibiteur (serpine) à partir du sérum traité est la HiTrap Blue HP 5 ml, une colonne d'affinité provenant de chez Amersham Biosciences. La HiTrap Blue HP utilisée (figure 21) est une colonne faite du polypropylène biocompatible et n'interagissant pas aux biomolécules. C'est une colonne pré-préparée pour être utilisée en chromatographies d'affinités. Elle est conçue à partir d'une matrice de Blue Sépharose de très haute performance permettant la purification de l'albumine, les enzymes, les facteurs de coagulation, les interférons et d'autres protéines, à laquelle est attaché par liaison covalente un ligand de Cibacron Blue F3G-A (Sahab *et al.*, 2007).

Certaines protéines interagissent bio-spécifiquement au ligand grâce à sa similarité structurelle aux cofacteurs nucléotidiques, tandis que d'autres molécules tel que l'albumine ou les interférons s'attachent d'une manière peu spécifique par des interactions électrostatiques et/ou hydrophobes au ligand anionique aromatique (Gianazza et Arnaud, 1982).

Nous avons opté à une colonne de chromatographie d'affinité sur Blue Sépharose HP, dans le but d'éliminer une grande partie du sérumsalbumine, une protéine majoritaire du sérum humain et ayant un poids moléculaire avoisinant les 66 000 Da et se rapprochant ainsi de celui de la SERPINA3 humaine d'intérêt. La présence de la sérumsalbumine perturbera certainement les tests d'activités enzymatiques, en contaminant l'inhibiteur.

12 ml du sérum traité et filtré à travers un filtre Sartorius de 0,45 μm , ont été chromatographiés à travers cette colonne, en le chargeant par une pompe péristaltique type Minipuls 2 de chez Gilson à un débit de 2 ml/min. L'injection est réalisée à température ambiante (25 °C environ) à travers la colonne HiTrap Blue HP 5 ml (1.6 x 2.5 cm) équilibrée au préalable par le tampon (A) 30mM de NaH_2PO_4 , pH 7.0 (tampon d'équilibration).

Après injection, le retour à la ligne de base, suivi par mesure de la DO à 280 nm, est obtenu par lavage en passant le tampon (A) d'équilibration. Les protéines sont éluées à un débit de 2 ml/min en un gradient croissant à 1M de NaCl et des fractions de 2 ml sont collectées en sortie de la colonne. L'éluion a été effectuée avec le tampon (B), à 30mM NaH_2PO_4 , 1M NaCl, pH 7.0 (tampon d'éluion), qui est suivie par mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 280 nm. Par la suite chaque fraction est testée pour son activité inhibitrice contre la trypsine et la chymotrypsine comme enzymes sélectives.

II.4.4.2. Fractionnement des protéines selon leur charge électrique

Le fractionnement des protéines est réalisé par une chromatographie échangeuse d'ions qui permet de séparer les protéines en fonction de leurs points isoélectriques. En travaillant à un pH fixe, les protéines vont devenir plus ou moins anioniques ou cationiques. Puis, en jouant sur la teneur en sel, les protéines vont engendrer des interactions plus ou moins fortes qui conduisent soit à leurs rétentions, soit à leurs éluions. Un échangeur d'ions est constitué au fait, d'une matrice insoluble sur laquelle sont fixés des groupements chargés positivement dans le cas d'un échange d'anions et négativement dans le cas d'un échange de cations. Les protéines seront plus ou moins liées à la résine en fonction de leur charge globale.

Une chromatographie d'échange d'ions, spécifiquement une échangeuse d'anions est réalisée sur les fractions inhibitrices obtenues précédemment et comportant une activité enzymatique. Le support anionique utilisé en raison de sa capacité à fixer certains contaminants, est le support Q-Sépharose dont le groupement actif est un ammonium quaternaire ($-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$). Le décrochage séquentiel des protéines du support, en fonction de leur charge est réalisé par modification du pH ou par utilisation d'une force ionique. C'est cette deuxième méthode qui est utilisée au cours de cette étude.

a. Préparation du gel

La colonne de la Q-Sépharose Fast flow a été préparée au niveau du laboratoire à partir d'un gel en suspension. Un volume de la suspension de Q-Sépharose FF de chez Pharmacia préparé au préalable à partir d'une suspension stock conservée dans 20 % d'éthanol, est déposé dans un bécher en verre fritté, puis équilibré avec le tampon Tris/HCl 30mM, pH 8,0. La suspension du gel de la Q-Sépharose FF est dégazée afin d'éliminer les bulles d'air microscopiques qui pourraient perturber le passage des protéines.

Le gel est ensuite coulé à température ambiante dans une des colonnes (2,5 x 10 cm ou 1,0 x 7,0 cm) montées verticalement sur un support en une seule étape. Afin de stabiliser le lit du gel, il est nécessaire d'éluer environ deux fois le volume de la colonne avec du tampon d'équilibration lui-même filtré et dégazé à un débit supérieur à celui de l'injection de l'échantillon.

b. Fractionnement de l'inhibiteur

Les fractions inhibitrices obtenues en sortie de la HiTrap Blue HP 5 ml et s'étalant sur tout le chromatogramme ont été poolées. Le pool constitué de 86 fractions est réalisé sur la base de leur activité anti-chymotrypsique maximale et une inhibition anti-trypsique \leq à 25 %. Elles sont mises par la suite à dialyser le même jour contre un tampon A Tris/HCl 30mM, pH 8,0, tampon d'équilibration de la colonne Q-Sépharose Fast Flow (2,5 x 10 cm), pendant une nuit sous agitation et à 4°C.

Par la suite, la colonne est lavée avec le même tampon pendant une nuit à un débit constant de 0,5 ml/min. Un volume de 50 ml du pool filtré sur un filtre Sartorius de 0,45 μ m a été injecté à un débit de 2ml/min à température ambiante sur la Q-Sépharose équilibrée au préalable avec le tampon (A). L'éluat est recyclé une seconde fois sur la colonne afin d'améliorer la séparation, puis collecté.

L'élution est réalisée avec le tampon (B) Tris/HCl 30mM, pH 8,0, NaCl 1M, tampon d'élution des protéines accrochés au support en appliquant un gradient de NaCl, à un débit de 3 ml/min. Des fractions de 3 ml sont collectées et leur activité inhibitrice est mesurée contre la trypsine et la chymotrypsine. Les fractions présentant un pouvoir inhibiteur important contre la chymotrypsine sont concentrées.

II.4.4.3. Fractionnement des protéines par chromatographie échangeuse d'anions

Une deuxième étape de chromatographie d'échange d'anions est réalisée. Les fractions inhibitrices [26 – 56] ayant l'activité anti-chymotrypsique la plus élevée obtenues en sortie de la 1^{ère} Q-Sépharose Fast Flow (2.5 x 10 cm) ont été poolées et dialysées pendant une nuit contre un tampon (A) Tris/HCl 30mM, pH 8.0, tampon d'équilibration de la 2^{ème} colonne Q-Sépharose FF (1.0 x 7.0 cm), sous agitation et à 4°C.

Le pool dialysé et filtré sur un filtre Sartorius de 0,2 µm a été injecté à température ambiante sur la Q-Sépharose FF (1.0 x 7.0 cm) équilibrée au préalable avec le tampon (A).

Les protéines sont éluées avec le même tampon (B) de la 1^{ère} Q-Sépharose utilisée avec un gradient linéaire de NaCl (0 - 1 M) à un débit de 2ml/min. Des fractions de 4 et 2 ml sont collectées pour le non-retenu (NR) et l'éluât respectivement et la mesure de leur activité inhibitrice contre la trypsine et la chymotrypsine est effectuée.

Après réalisation des activités enzymatiques, on s'est intéressé à trois fractions (16, 17 et 18) du premier pic élué afin de réaliser les courbes d'inhibition avec les différentes enzymes d'intérêt. Pour mieux concentrer notre inhibiteur, on a utilisé la petite colonne de la Q-Sépharose pour avoir la fraction inhibitrice en concentration élevée par une élution directe à 1 M NaCl après passage en boucle pendant 15 minutes (4 passages). Pour cela, le pool est collecté et dialysé pendant une nuit contre un tampon (A) Tris/HCl 30mM, pH 8.0, tampon d'équilibration de la 2^{ème} colonne Q-Sépharose FF (1.0 x 7.0 cm), sous agitation et à 4°C.

Le pool dialysé et filtré sur un filtre Sartorius de 0,2 µm a été injecté à température ambiante sur la Q-Sépharose FF (1.0 x 7.0 cm) équilibrée au préalable avec le tampon (A).

Les protéines sont éluées directement sans gradient de concentration avec le même tampon (B) avec 1 M de NaCl à un débit de 1 ml/min. Le non retenu (NR = fraction 0) est collecté dans un seul tube après épuisement du pool en inhibiteur (fixation de tout l'inhibiteur sur la colonne). Des fractions de 2 ml sont collectées après élution et l'activité inhibitrice contre la chymotrypsine est effectuée.

II.4.4.4. Purification de l'inhibiteur par la deuxième chromatographie d'affinité

Une seconde étape de chromatographie d'affinité est réalisée. Les fractions inhibitrices [26 – 56] ayant l'activité antichymotrypsique la plus élevée obtenues en sortie de la 1^{ère} Q-Sépharose Fast Flow (2.5 x 10 cm) ont été poolées et dialysées pendant une nuit

contre un tampon (A) NaH_2PO_4 , pH 7.0, tampon d'équilibration de la 2^{ème} colonne HiTrap Blue Sépharose (1.6 x 2.5 cm), sous agitation et à 4°C.

Après filtration sur un filtre Sartorius de 0,80 μm , le pool est injecté à un débit de 2ml/min, le retour à la ligne de base, suivi par mesure de la DO à 280 nm, est obtenu par lavage en passant le tampon (A) d'équilibration. Les protéines sont éluées avec le tampon (B), à 30 mM NaH_2PO_4 , 1M NaCl, pH 7.0 (tampon d'éluion) à un débit de 2 ml/min en un gradient croissant à 1M de NaCl (suivant le même programme de la première HiTrap Blue Sépharose) et des fractions de 2 ml sont collectées en sortie de la colonne. Par la suite, chaque fraction est testée pour son activité inhibitrice contre la chymotrypsine comme enzyme sélective.

Les fractions 3 – 23 éluées avant le gradient de sel (non retenu) et ayant l'activité antichymotrypsique la plus élevée, ont été poolées. Elles sont mises par la suite à dialyser contre le tampon (A) Tris/HCl 30mM, pH 8.0, tampon d'équilibration de la colonne Q-Sépharose Fast Flow (1.0 x 7.0 cm), pendant une nuit sous agitation et à 4°C. Un volume de 34 ml du pool filtré sur un filtre Sartorius de 0,45 μm a été injecté à un débit de 2ml/min à température ambiante sur la Q-Sépharose équilibrée au préalable avec le tampon (A). L'éluat est recyclé une seconde fois sur la colonne afin d'améliorer la séparation, puis collecté.

Les protéines sont éluées directement sans gradient de concentration avec le même tampon (B) avec 1 M de NaCl à un débit de 1 ml/min. Des fractions de 1,5 et 2 ml sont collectées pour le non retenu et l'éluât respectivement et l'activité inhibitrice contre la chymotrypsine est réalisée.

II.5. Caractérisation des propriétés inhibitrices

Les activités inhibitrices déterminées en sortie de colonne, nous permettent de choisir les fractions à collecter pour réaliser le pool qui servira pour la prochaine étape de chromatographie. Le repérage des fractions inhibitrices contenant la SERPINA3 parmi l'ensemble des fractions chromatographiques obtenues est effectué simplement en mesurant les activités inhibitrices. Elles ont été mesurées dans les mêmes conditions que celles décrites pour la mesure des activités enzymatiques, après pré-incubation pendant 15 minutes à 37 °C de 60 à 80 μl de chaque fraction à tester avec 40 μl de trypsine ou de chymotrypsine à une concentration de l'ordre du nanomolaire (5 nM). Les deux enzymes ont été utilisées comme

enzymes modèles, pour distinguer les fractions inhibitrices anti-chymotrypsique des autres qui ne le sont pas, c'est-à-dire ayant une activité anti-trypsique.

La réaction enzymatique est ensuite provoquée par l'addition de 50 μl de N-CBZ-Phe-Arg-NHMec et Meo-Ala-Ala-Pro-Phe-NHMec, substrats respectifs de la trypsine et de la chymotrypsine à une concentration finale de 100 μM .

L'activité inhibitrice est ensuite exprimée en pourcentage de perte d'activité de l'enzyme par rapport à un témoin incubé dans les mêmes conditions, mais dans lequel les 60 à 80 μl de la solution inhibitrice (fraction) à tester sont remplacés par la même quantité du tampon respectif à l'enzyme testée. Une unité d'inhibiteur est la quantité qui inhibe une unité de l'enzyme.

II.6. Réalisation des courbes d'inhibition avec les peptidases à sérine et cystéine

L'inhibition des différentes enzymes protéolytiques par les inhibiteurs protéiques spécifiques implique une interaction forte entre deux protéines. Dans le cas de l'inhibition des protéases par des inhibiteurs protéiques, l'affinité (spécificité) de l'inhibiteur pour l'enzyme est élevée, de l'ordre du nanomolaire, et la concentration de l'inhibiteur est fortement diminuée après la formation du complexe enzyme-inhibiteur. On peut distinguer ainsi trois types d'inhibition : inhibition réversible, irréversible et inhibition temporaire.

Dans l'objectif de réaliser des courbes d'inhibition et de tester cette affinité enzymatique des inhibiteurs purifiés, des fractions seules ou en mélange contenant les inhibiteurs de la SERPINA3 ont été testées séparément contre les quatre enzymes : trypsine, chymotrypsine, élastase et caspase 3. Le test d'inhibition est effectué selon des gammes de concentration en inhibiteur optimisée au préalable puis fixée constante pendant toute l'étude pour chaque enzyme.

L'activité inhibitrice est mesurée en mélangeant une quantité d'enzyme en concentration connue et constante (fixe) [E] avec différentes concentrations (volumes) croissantes de l'inhibiteur [I]. Après incubation pendant 15 minutes à 25°C pour la caspase 3 et à 37°C pour les trois autres enzymes, une concentration constante en substrat spécifique [S] de 50 μl est rajoutée puis l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (comme indiqué dans le paragraphe II.3). La gamme de la concentration en inhibiteur utilisée, spécifique pour chaque enzyme est comme suit : la chymotrypsine et la trypsine varie de 0 à 40 μl , celle de l'élastase varie de 0 à 75 μl et celle de la caspase 3 varie

de 0 à 220 μ l. Toutes les fractions inhibitrices choisies pour réaliser les courbes d'inhibition sont obtenues après fractionnement avec une dernière colonne de chromatographie échangeuse d'anions (Q-Sépharose FF).

La diminution de l'activité enzymatique résiduelle observée doit être proportionnelle à la concentration croissante de l'inhibiteur. Les données sont extrapolées à l'activité zéro, donc cette valeur définit la quantité requise en moles d'inhibiteur pour inhiber une mole d'enzyme. L'activité inhibitrice spécifique est exprimée comme le rapport de l'activité inhibitrice par la concentration de la protéine.

II.7. Caractérisation physico-chimique des inhibiteurs

II.7.1. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse

Dans des tubes eppendorf, on met 40 à 60 μ l de l'échantillon (fractions) à analyser avec l'ajout de 10 à 15 μ l de tampon dénaturant (de solubilisation 5x). Il se compose de Tris/HCl 312,5 mM, EDTA 0,4 mM, SDS 7,5 %, glycérol 25 %, DTT 150 mM et bleu de bromophénol 0,05 %, le tout ajusté à pH 6,8. Le SDS permet de conférer à l'ensemble des protéines une charge globale négative et le DTT (Dithiothréitol) permet de protéger l'oxydation des protéines et de rompre les ponts disulfures. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes dans l'eau bouillante afin de compléter la dénaturation. Les protéines vont être dépliées perdant subséquemment leurs structures primaires et quaternaires (spatiales). Les échantillons sont conservés jusqu'à leur utilisation à -20°C après ajout d'une à deux gouttes du glycérol pour augmenter leur densité grâce à la poussée d'Archimède.

II.7.2. Détermination du poids moléculaire (PM) par méthode électrophorétique

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est une méthode de routine employée dans le domaine de l'analyse protéomique pour la séparation des protéines car elle demeure une technique robuste et reproductible (Garfin, 2003).

L'analyse électrophorétique des échantillons des différentes fractions présumées contenir la SERPINA3, en conditions dénaturantes, est effectuée en présence du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) (3%) un agent tensioactif et de 2-mercaptoéthanol (1%) sur des gels d'acrylamide à 12 % (bis-acrylamide 0,8%) selon la méthode décrite pour la SDS-PAGE par Laemmli (1970).

Le SDS, en solubilisant les protéines (1,4 g de SDS par gramme de protéines) et en leur conférant une charge négative identique, permet la séparation des protéines uniquement sur la base de leur poids moléculaire. Leur vitesse de migration sera donc fonction de la taille des protéines et de la taille des mailles du gel. Le 2-mercaptoéthanol est un agent réducteur des ponts disulfures et permet de mettre en évidence les différentes sous-unités d'une protéine. Elles vont donc être séparées suivant leurs poids moléculaires : les protéines de fortes tailles auront des difficultés à traverser les mailles du gel d'acrylamide. La structure primaire des protéines permet leur migration à travers ce dernier.

Les dépôts sont réalisés dans les puits formés dans les gels après polymérisation. Sur chaque gel, une solution contenant des marqueurs de masses moléculaires est déposée dans le premier puits. Cette méthode permet donc de déterminer la masse moléculaire des protéines inconnues de chaque échantillon déposé dans chaque puits formé dans le gel de concentration, en comparant leur déplacement à celui des protéines connues (marqueurs standards). Les marqueurs de poids moléculaire utilisés proviennent de chez Bio-Rad (#161-0373), et qui sont des protéines recombinantes pré-marquées au bleu permettant d'estimer de haut en bas la distance de migration et qui sont par ordre décroissant comme suit (kDa) : 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 et 10. La masse moléculaire des protéines est ainsi estimée à partir d'une courbe d'étalonnage (figure 22).

Puis les gels sont placés dans une cuve d'électrophorèse (figure 22) remplie de tampon d'électrophorèse ou tampon de migration, Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 %, et 2-mercaptoéthanol 0,05 % à pH 8,3. Puis, la cuve est reliée à un générateur, générant un courant électrique (1000 mA, 300 W) faisant migrer les protéines, d'abord à 80 volts pendant 15 à 20 minutes afin de concentrer les protéines dans le premier gel de stacking, et ce fort courant électrique force la migration de la glycine et des protéines qui vont stacker au front de migration des ions chlorure et d'obtenir ainsi de très fines bandes de protéines concentrées à la limite supérieure du second gel.

Ensuite, ce dernier gel de séparation (résolving), permet de séparer les protéines selon un gradient de taille, par un maillage moléculaire, en augmentant le potentiel électrique à 140 volts pendant 2 heures environ. Toute cette opération est réalisée à température ambiante. Le dégagement de chaleur généré par le courant électrique nécessite un circuit de refroidissement qui est assuré par une circulation de l'eau du robinet froide.

Pour colorer et par conséquent mettre en évidence les protéines, deux méthodes de coloration ont été utilisées dont la sensibilité diffère. La première au bleu de Coomassie, qui a été utilisée lorsque la quantité de protéines était suffisamment importante, car c'est la moins sensible. Par contre, la deuxième coloration est une coloration à l'argent. Elle est plus sensible (100 fois) et a été choisie lorsque la quantité de protéines déposées dans les puits était faible pour vérifier la pureté de la préparation d'une part et pour exciser les bandes pour la spectrométrie de masse.

a. Coloration au bleu de Coomassie R-250

Après migration, les protéines sont fixées dans une solution d'éthanol 30 %, acide acétique 5 %. Pour l'utilisation du Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck ou Bio-Rad), le gel de polyacrylamide est directement mis à incubation avec le bleu de Coomassie R 250, solubilisé dans la solution de coloration contenant de l'éthanol 40 %, acide acétique 10 % et 2,9 mM du bleu de Coomassie R 250 pendant au moins 20 minutes sous agitation. La coloration au bleu de Coomassie se base sur la fixation de cette molécule aux acides aminés basiques (notamment Arg) et aromatiques (Phe, Tyr et Trp).

Le gel est ensuite décoloré par des lavages successifs et sous agitation dans une solution de décoloration, qui est la même solution que celle ayant servi à la fixation des protéines jusqu'à bonne lisibilité des bandes protéiques.

b. Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent permet d'observer les protéines totales obtenues après les différentes étapes chromatographiques. L'ensemble des protéines purifiées peuvent aussi être révélées à l'argent, vu qu'il s'agit bien d'une méthode beaucoup plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie. Le protocole décrit ici, est une adaptation du protocole de Yan *et al.* (2000). Il concerne bien une coloration à l'argent adaptée aux petits gels et compatible aux analyses de la spectrométrie de masse, utilisant un volume final de 50 ml pour les cinq solutions (A, B, C, D, et E) fraîchement préparées.

Le gel après électrophorèse est démoulé, le stacking est découpé puis le gel est plongé et laissé se fixer deux fois 15 minutes (2x) sous agitation dans la solution (A) (solution de fixation) contenant 10 % d'acide acétique et 40 % d'éthanol. Il est ensuite immergé dans une solution (B) (solution de sensibilisation) contenant l'éthanol 30 %, le sodium thiosulfate 0,2% et le sodium acétate 6,8 % pendant 30 minutes. Après, trois lavages à l'eau milli-Q (eau

pure) sont réalisés pendant 5 minutes (3x). La coloration avec la solution (C) au nitrate d'argent 0,25 % se fait pendant 20 minutes à l'abri de la lumière et la solution est préparée au dernier moment, vue sa sensibilité à la lumière. Puis, deux lavages de 1 minute avec l'eau milli-Q sont effectués. Le gel d'acrylamide est ensuite plongé dans la solution (D) (solution de développement) de sodium carbonate 2,5 %, formaldéhyde 0,04 % jusqu'à obtention de la coloration désirée. Enfin, le gel est mis 10 minutes dans la solution (E) (solution stop) contenant 1,46 % d'EDTA, qui permet d'arrêter la réaction de coloration des bandes protéiques. À la fin, 3 lavages de 5 minutes en eau milli-Q sont réalisés. On peut ainsi observer toutes les protéines contenues dans les fractions à des tailles différentes.

II.7.3. Analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle (2DE)

L'électrophorèse a connu son essor suite au développement de la PAGE bidimensionnelle. L'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) (O'Farrell, 1975) est actuellement une méthode très résolutive et reproductible depuis la réalisation de nombreuses études sur les méthodes d'extraction et de solubilisation des protéines. La 2D-PAGE repose sur la combinaison de deux électrophorèses sur gel successives, présentant l'avantage d'être des séparations selon deux paramètres indépendants et d'avoir une haute résolution. Ainsi, selon la première dimension, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique par focalisation isoélectrique. Selon la seconde dimension, elles sont séparées suivant leur masse par PAGE au SDS (SDS-PAGE).

Le pré-requis pour réaliser de bonnes analyses par 2DE reste une préparation optimisée des échantillons ainsi que des différentes solutions utiles à la réalisation des électrophorèses. Ceci permet également de séparer une quantité importante en protéines (2 à 5 mg de protéines), favorisant ainsi l'étude des protéines faiblement représentées, tel que les inhibiteurs de la superfamille des serpin.

Les gels de 2DE permettent de visualiser entre 100 et 3000 spots protéiques selon les échantillons et les méthodes de révélation employées. La reproductibilité technique de séparation des protéines par 2DE est bien maîtrisée, facilitant la localisation précise des spots protéiques.

Une étape essentielle pour réaliser des études différentielles de composition en protéines est l'analyse des images résultantes de la visualisation des protéines sur les gels de

2DE. Son but est de quantifier, de manière relative, le niveau d'expression des protéines. Pour cela, l'analyse se décompose généralement en quatre étapes :

- ✓ la détection des spots protéiques ;
- ✓ le *matching* ;
- ✓ la suppression du bruit de fond ;
- ✓ et la normalisation.

Par la suite, le traitement statistique des données permet de déterminer quelles sont les protéines significativement et différentiellement exprimées entre deux échantillons. Leur identification par spectrométrie de masse permet d'interpréter biologiquement les variations d'expression de protéines observées.

II.7.3.1. Première dimension

La première dimension en 2DE sur gel de polyacrylamide consiste en une focalisation isoélectrique (IEF, *isoelectric focusing*). Dans la première dimension, les protéines du sérum humain traité sont séparées en fonction de leur point isoélectrique (pI) dans des bandes de gels à gradient de pH immobilisé ou « IPG strips » (*immobilized pH gradient strips*) établi par des ampholytes. Ainsi, sous l'effet d'un champ électrique constant, les protéines chargées vont migrer dans le gradient de pH du gel d'acrylamide jusqu'au pH égal à leur pI. Leur charge étant nulle à cette valeur de pH, les protéines vont ainsi arrêter leur migration. Les protéines sont donc séparées selon leur point isoélectrique.

La focalisation se fait sur une bandelette en matière plastique sur laquelle a été coulé un gel polyacrylamide à 3 % à gradient de pH immobilisé. Ce gel se présente sous forme déshydraté. L'étape de réhydratation se fait par contact direct avec la solution du sérum humain protéique contenant l'inhibiteur de la SERPINA3. La faible concentration du gel permet l'entrée des protéines notamment les inhibiteurs pendant la réhydratation et évite de séparer les protéines selon leur poids moléculaire durant l'IEF. Les IPG strips commerciaux permettent d'obtenir une meilleure reproductibilité entre IEF. Nous avons optés aux IPG strips commercialisés par Bio-Rad, réputés avec ceux d'Amersham pour leur meilleure résolution (Taylor et Coorsen, 2006). Nous avons privilégiés les IPG strips de 0,5 x 7 cm possédant un gradient (gamme) de pH de 4,0 à 7,0.

a. Réhydratation

10 µl environ du sérum ont été chargés par bandelette. Les volumes correspondants sont dilués dans un tampon de réhydratation (urée 7 M, thiourée 2 %, CHAPS 2%, DTT 0,2%, ampholytes (pH 4 – 7) 2%, $2 \cdot 10^{-3}$ % bleu de bromophénol, Pefabloc 5 mM).

Les bandelettes sont placées dans les rigoles de l'IEF-CELL (Bio-Rad) contenant les échantillons puis sont recouvertes d'huile minérale. Les gels sont réhydratés de manière passive (20°C, 0 V) pendant une nuit.

b. Focalisation

Le programme de focalisation est le suivant :

- 50 V (→ constante) pendant 2 h ;
- 100 V (→) jusqu'à atteindre 200 V.h ;
- 500 V (→) pendant 1 h ;
- 1000 V (↑ rapide) pendant 2 h ;
- 10000 V (↑) pendant 6 h ;
- et enfin 10000 V (→) jusqu'à atteindre 40 000 V.h.

A la fin de cette étape, les bandelettes sont stockées à - 20°C jusqu'à leur prochaine utilisation pour la deuxième dimension.

II.7.3.2. Deuxième dimension

Suite à l'IEF, il est possible de séparer les différentes protéines (inhibiteurs de la superfamille des serpinés en particulier) selon une seconde dimension par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (2D-PAGE).

a. Equilibration

Les bandelettes sont équilibrées dans deux tampons d'équilibration (Giometti *et al.*, 2003) successifs :

- ✓ **Tampon 1** : urée 6 M, SDS 2%, glycérol 30%, Tris 50 mM, pH 8.8, DTT 1%.
Incubation pendant 15 minutes sous agitation ;

- ✓ **Tampon 2** : urée 6 M, SDS 2%, glycérol 30%, Tris 50 mM, pH 8.8, iodoacétamide 2,5% et une pincée de bleu de bromophénol. Incubation pendant 20 minutes sous agitation.

Cette phase permet de conférer une charge globale négative aux protéines grâce au SDS afin de les séparer uniquement selon leur poids moléculaire lors de la deuxième dimension. Elle permet également de rompre les ponts disulfures grâce au DTT et d'empêcher leur conformation en alkylant les résidus soufrés par l'iodoacétamide pour aider le transfert des protéines d'un gel à l'autre.

b. SDS/PAGE

Après équilibration, les bandelettes sont déposées au dessus du gel de deuxième dimension (gel à 12%, rapport acrylamide/bisacrylamide : 37,5 / 1). Deux bandelettes sont déposées par gel, une à chaque extrémité. Une solution d'agarose à 0,5 % est déposée pour assurer le contact entre les deux gels et immobiliser la bandelette. Les gels sont placés dans la cuve d'électrophorèse *Multi Gels Electrophoresis Units* (Bio-Rad). La migration est réalisée par la suite en deux étapes :

- ✓ Une première étape de migration se déroule pendant 1 heure sous 40 V à ampérage constant de 15 mA/gel ;
- ✓ Puis une deuxième étape d'environ 17 heures à 110 V et 15 mA/gel permet la séparation des protéines.

c. Coloration au nitrate d'argent

Pour mieux détecter l'ensemble des spots protéiques présents dans le gel de 2DE, il est recommandé de le colorer au nitrate d'argent. Pour cela, le protocole de Yan *et al.* (2000) déjà cité ci-dessus est utilisé. Après trois lavages successifs de 5 minutes dans de l'eau milli-Q, les gels sont finalement scannés si besoin pour l'analyse comparative par analyse d'image.

II.7.3.3. Caractérisation par western blot

Après avoir confirmé la présence des spots protéiques dans le gel de 2DE, l'autre gel est gardé pour la caractérisation (révélation) par western blot détaillée ci-après.

II.8. Caractérisation immunochimique

II.8.1. Préparation des anticorps polyclonaux

L'antisérum dirigé contre la bovSERPINA3 est produit chez le lapin par l'équipe de Dr. Ouali à l'INRA de Clermont-Ferrand. La méthode de production utilisée est celle publiée dans l'article de Dutaud *et al.* (2002). Ainsi, le sérum anti-albumine généré chez le lapin et dirigé contre l'albumine humaine a été gracieusement fourni par Annie VENIEN (Unité d'Immunochimie, Station de Recherches sur la Viande, INRA, Theix), et est utilisé pour révéler la présence du sérumalbumine dans nos fractions.

II.8.2. Caractérisation par western blot

La caractérisation par immunoblot des gels de la SDS-PAGE et du gel de 2DE des différentes fractions chromatographiques et du sérum humain respectivement a été réalisée selon le protocole décrit par Sentandreu *et al.* (2003).

La technique du western blot est utilisée pour détecter la présence de la SERPINA3 et les différents isoformes de cet inhibiteur dans les échantillons des fractions chromatographiques à l'aide d'un anticorps polyclonal ayant 75 % d'identité contre la SERPINA3 bovine. Cette technique utilise donc d'abord l'électrophorèse en conditions dénaturantes pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire, puis ces dernières sont transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene difluoride).

II.8.2.1. Transfert actif sur membrane de nitrocellulose

Après migration, le gel est démoulé et rincé dans le tampon de transfert contenant du Tris 48 mM, glycine 39 mM, éthanol 20 %, pH 8.7, ensuite les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de type Immobilon P en PVDF de chez Sigma. Cette dernière est plongée au préalable 5 minutes dans l'éthanol pur, puis rincée abondamment à l'eau et enfin trempée pendant 2 minutes dans le tampon de transfert.

Une des méthodes de transfert envisageables, dite de transfert semi-sec, consiste à prendre en sandwich (figure 23) le gel et la membrane entre deux papiers absorbants (papier blotting de chez sigma) imbibés dans le tampon de transfert qui assure la conductivité du montage. L'utilisation de l'éthanol va activer le gel en enlevant le SDS des protéines et en augmentant par la suite les liaisons hydrophobes des protéines à la membrane. Le transfert est réalisé pendant 30 min pour un seul gel et 1 heure pour deux gels sous une même tension de

courant à 10 V. Ce qui se passe réellement dans cette étape est que les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Il résulte de ce transfert que les protéines sont exposées sur une surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures.

II.8.2.2. Hybridation des anticorps et lavages

A la fin du transfert, la membrane est saturée dans le tampon de saturation PBS 1X (NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 43 mM, KH₂PO₄ 14 mM, pH 7,4) à 10 %, lait écrémé à 10% et Tween 20 de chez Sigma à 0.1% pendant une nuit à 4°C et sous agitation. Après saturation des sites non spécifiques par les protéines du lait, la membrane est lavée deux fois 5 min avec du tampon de lavage/dilution (PBS 10 %, Tween 0,1 % et lait écrémé 1 %).

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire (anti-SERPINA3 ou anti-albumine) dilué à une concentration adéquate dans le tampon de lavage/dilution au 1/500 ou 1/666^{ème} respectivement pendant 1h 30 minutes à température ambiante et sous agitation.

Après quatre lavages de 5 min, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire commercial de chèvre anti-immunoglobulines de lapin et conjugué à la phosphatase alcaline de chez Jackson ImmunoResearch dilué au 1/2000^{ème}.

II.8.2.3. Révélation

La membrane est lavée ensuite quatre fois 5 minutes avec du tampon de lavage/dilution, puis deux fois 2 minutes avec le tampon PBS à 10 % (sans lait et sans Tween). Après rinçage, l'activité de l'enzyme est révélée par un kit de chimioluminescence après incubation 5 minutes avec 1,5 ml de Lumiphos de chez Thermo Scientific (substrat spécifique), puis égouttée avant d'être mise entre deux feuilles plastiques transparentes. La réaction de l'enzyme avec le substrat émet de la lumière au niveau de la bande protéique d'intérêt. Ce spot impressionne, après un temps variable selon l'intensité émise, un film autoradiographique. L'ensemble (membrane et feuilles) est ensuite placé dans une hypercassette de chez Thermo Scientific (protégeant de la lumière).

La révélation de la SERPINA3 est réalisée dans une chambre noire sous une lampe rouge de chez Dr. Fischer GmbH (230 V, 15 W) où elle est mise en contact d'un film photographique (Hyperfilm, Amersham). Le temps d'exposition varie de 5 minutes à 30 minutes selon l'intensité du signal.

Après, ce film est plongé dans un bac de révélateur photo de chez Sigma jusqu'à apparition des bandes puis rincé immédiatement dans un bac d'eau et enfin il est plongé dans l'autre bac contenant le fixateur pendant 30 secondes, puis lavé à l'eau.

II.9. Spectrométrie de masse

Cette analyse consiste en la mesure des masses d'un mélange peptidique obtenu par digestion enzymatique d'une protéine inconnue et son identification par des outils informatiques reliés aux bases de données protéiques. L'enchaînement des acides aminés d'un peptide peut être également obtenu par études de spectrométrie de la masse en tandem (MS/MS). Le protocole détaillé ci-dessous est fourni et utilisé par la Plateforme d'Exploration du Métabolisme de l'INRA de Clermont – Theix.

II.9.1. L'empreinte peptidique massique (EPM) par MALDI-TOF

II.9.1.1. Principe

Le principe de cette technique se résume en deux étapes. La première repose sur l'ionisation des peptides de digestion des protéines à étudier (les bandes protéiques à identifier sont prélevées sur un gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent). Elles sont décolorées et déshydratées. La protéine est ensuite hydrolysée en peptides par la trypsine. Le mélange peptidique obtenu est déposé sur une cible en présence de matrice puis il est analysé par MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) – TOF (*Time of Flight*). C'est une technique d'ionisation dite douce puisque elle génère des ions moléculaires relativement stables. La deuxième étape consiste en la mesure du temps de vol (de l'ordre des nanosecondes) des ions formés dans un tube de vol dans lequel est réalisé un vide poussé (10^{-7} millibare). Cette méthode permet d'analyser une large gamme de masse (0,5 à 300 kDa), l'acquisition des données est rapide.

II.9.1.2. Préparation des bandes

a. Prélèvement des bandes : les bandes d'intérêt sont soigneusement (environnement sans poussières ni empreintes de doigts) excisées. Avant d'exciser les bandes du gel d'acrylamide, il est nécessaire de bien rincer le gel à l'eau distillée. Les bandes sont excisées à l'aide d'un scalpel stérile (faire l'excision le plus près du spot pour éviter le bruit de fond). Les échantillons sont ensuite placés dans des tubes eppendorf de 0,5 ml. A noter que les excisions

ont été réalisées à partir de gels colorés au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent, seules les techniques de décoloration diffèrent.

b. Décoloration des bandes : deux types de bandes ont été décolorées à savoir les :

- ✓ *bandes colorées au bleu de Coomassie R 250* : ajouter 100 µl de tampon de bicarbonate d'ammonium 25 mM, acétonitrile 5 % dans chaque tube eppendorf et laisser incuber pendant 30 minutes. Après cela, le tampon est éliminé pour le changer avec le même tampon à 50 % d'acétonitrile et laisser incuber 30 minutes. Cette étape peut être réalisée encore une deuxième fois jusqu'à décoloration totale.
- ✓ *bandes colorées au nitrate d'argent* : le nitrate d'argent est décoloré par une solution de Potassium Ferricyanid 30 mM, sodium thiosulfate pentahydrate 100 mM. Ce mélange (2 ml) est préparé au dernier moment vu son instabilité à la lumière. Puis 200µl de cette solution ont été ajoutés par tube et laisser à incubation 1 à 2 minutes, jusqu'à disparition de la coloration à l'argent. La solution est éliminée, puis deux bains successifs avec 150 µl d'eau pure ont été réalisés pendant 15 minutes pour stopper la réaction. La décoloration est continuée en utilisant le protocole de la décoloration au bleu de coomassie tel qu'il est afin de compléter la décoloration à l'argent.

c. Déshydratation : les bandes sont ensuite déshydratées dans 200 µl d'acétonitrile 100% pendant 10 minutes d'incubation. Le surnageant d'acétonitrile est ensuite éliminé et les bandes sont passées au Speed Vac de chez Jouan RC 10.22 pour éliminer le reste d'acétonitrile et compléter le séchage des bandes. Ces dernières sont généralement stoppées à ce stade en les stockant à – 20°C avant de les passer à la spectrométrie de masse.

II.9.1.3. Préparation des protéines pour l'analyse

a. Hydrolyse trypsique de la protéine : la protéine est hydrolysée en peptides avec 150 ng d'enzyme. La réhydratation est effectuée dans 15 µl de bicarbonate d'ammonium 50mM contenant 10 ng/µl de trypsine Promega (*Sequencing Grade Modified Trypsin*) et suivie d'une incubation de 5 heures dans une étuve Memmert U26 à 37°C.

b. Extraction des peptides : les peptides sont extraits du gel par 8 µl d'acétonitrile 100%, puis agiter au vortex, avant de les passer au bain d'ultrasons pendant 2 minutes et enfin une incubation de 15 minutes est effectuée à 37°C.

c. Préparation de la matrice et du calibrant : une solution de matrice en acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) est préparée à raison de 5 mg/ml dans un mélange (acétonitrile : eau : acide trifluoroacétique ; 50 : 50 : 0,1). Cette préparation est agitée à l'aide d'un vortex puis centrifugée 2 minutes à 3000g pour éliminer les agrégats non dissous. La matrice est alors prête à être utilisée. Le calibrant ProtéoMix4 (LaserBiolabs) est préparée à raison de 5 µl qsp 50 µl de matrice CHCA.

d. Dépôts sur la cible du MALDI-TOF : Nettoyer (sans frotter) la surface de la plaque à l'eau puis au savon et la rincer à l'eau MilliQ. Déposer sur la cible MALDI 1 µl d'échantillon préalablement vortexé puis 1 µl de matrice. Laisser sécher le dépôt pour que le mélange peptidique se cristallise dans la matrice. Puis déposer 0,4 µl de calibrant à proximité de chaque échantillon, et enfin la plaque est prête à être introduite dans le MALDI-TOF. Où s'effectue l'irradiation à 337 nm de la matrice co-cristallisée avec le mélange peptidique, en les envoyant au TOF. Ce dernier permet d'analyser les ions produits dans la source MALDI. Une calibration externe est faite en bordure du dépôt avec un calibrant composé d'un mélange de peptides. Puis on réalise une calibration interne avec 3 pics remarquables correspondant à des peptides d'autolyse de la trypsine présents dans le spectre de masse de l'analyte. Il s'agit des pics de m/Z (rapport masse sur charge) = 842,509 ; 1045,564 et 2211,104 avec la trypsine Promega utilisée.

II.9.1.4. Identification des protéines

L'identification se fait par interrogation des bases de données protéiques (ex : ProFound, MS-FIT) à partir des masses des peptides obtenus et sélectionnés et des critères à renseigner : la banque de donnée à interroger, la famille, le genre, l'espèce à partir desquels la protéine est isolée, toutefois la recherche sans renseigner ce critère est plus objective, l'enzyme de digestion, les modifications liées aux traitements de la protéine, la tolérance vis-à-vis des masses des peptides mesurées par rapport aux masses théoriques.

Ces moteurs de recherche comparent le spectre de masse aux spectres de masse virtuels des protéines dont le gène est caractérisé et qui sont rassemblées dans des banques de données spécialisées, dans notre cas la base de données utilisée est SWISS-PROT. Cette comparaison est associée à un score fondé sur le nombre de fragments protéolytiques obtenus dont les masses peuvent correspondre à celles des fragments protéolytiques des banques de données, et par la précision avec laquelle les masses sont déterminées. Les meilleurs scores correspondent aux comparaisons les plus fiables.

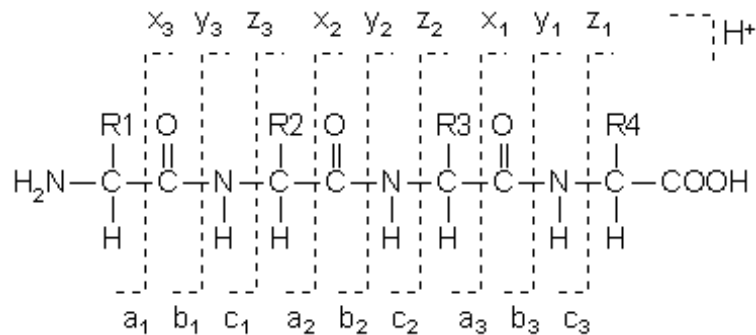
II.9.2. EPM par spectrométrie de masse MS/MS

Bien que l'empreinte peptidique massique (EPM) obtenue par spectrométrie MS MALDI-TOF soit très performante pour l'identification des protéines, elle a certaines limites notamment dans la caractérisation précise des protéines. En effet, l'information donnée dans la technique EPM est simplement une information de masse de l'ion détecté. L'identification est alors possible que si nous détectons suffisamment de peptides différents d'une même protéine. Si ce nombre de peptide est trop faible ou si la protéine n'est pas dans les banques, il va être difficile par cette technique d'identifier et à fortiori de caractériser la protéine.

C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser un autre appareil de masse que le MALDI-TOF. Cet appareil de masse permet d'obtenir une double empreinte dite MS/MS des peptides et ainsi obtenir l'identification par la séquence d'une protéine qui n'est pas nécessairement présente dans les banques (identification par homologie). Sur le centre de Theix, le spectromètre de masse MS/MS est un ESI-IT. Cet appareil possède donc une source électrospray qui permet l'ionisation (ESI) et le passage à l'état gazeux des ions dans l'analyseur qui est ici un piège à ions (IT). De plus, pour augmenter le pouvoir d'analyse de cette méthode de masse MS/MS, l'appareil a été couplé à une chaîne chromatographique liquide (LC PACKING) qui permet une séparation des peptides dans un flux d'un gradient d'acétonitrile. Ainsi, en sortie de colonne, les peptides élués vont rentrer dans l'analyseur du spectromètre de masse (IT), via la source électrospray (ESI), sous forme d'ions gazeux. Un premier spectre de masse (MS) sera alors généré sur la base de la stabilité des ions peptides dans la trappe à ions qui est remplie de gaz hélium. Puis chaque pic de masse détecté dans cette première étape est isolé par des champs électriques variables, puis fragmenté par des collisions avec les atomes d'hélium. Les liaisons peptidiques sont rompues dans cette étape. Les ions fils formés issus de la fragmentation de l'ion parent détecté dans l'étape MS sont très spécifiques et ont été caractérisés de la manière suivante par Roepstorff et Fohlman (1984).

Pour résumer, on pourra observer des fragments amino-terminaux obtenus en cassant une liaison peptidique et en conservant la charge du côté amino-terminal. Ces ions sont appelés a, b ou c. Les fragments carboxy-terminaux sont complémentaires de fragments amino-terminaux mais la charge est localisée du côté carboxy-terminal. Ces ions sont appelés x, y et z. Néanmoins, pour les recherches dans les banques de données, seule l'information sur les ions principaux complémentaires b et y est utilisée. Les différents moteurs de

recherche protéomique (MASCOT, par exemple) vont utiliser des algorithmes mathématiques permettant la comparaison des empreintes observées et théoriques (présentes dans les banques) et ainsi donner un score reflétant le degré d'identité des spectres. Outre l'identification, l'analyse par MS/MS permet de caractériser les protéines pour avoir accès aux modifications post-traductionnelles, aux mutations ou aux modifications chimiques d'acides aminés.



Les analyses MS/MS ont été réalisées avec un spectromètre de masse LCQ Ion Trap (Thermo Electron, Courtabœuf, France) équipé d'une source nanospray. Les peptides élués de la colonne C18 (Pep Map, LC PACKING) sont ionisés en appliquant une tension de 2 kV en jonction liquide sur une aiguille non métallisée (New Objective, Cambridge, MA, USA). Les peptides sont alors analysés par la méthode « *data dependent triple-play* ». Cette méthode consiste à faire trois analyses à la suite. La première est une analyse « *full scan* » pour détecter l'ion parent le plus intense, la deuxième est de faire un « *zoom scan* » sur l'ion parent sélectionné et ainsi connaître son état de charge, enfin la dernière est d'isoler cet ion pour le fragmenter avec une énergie de collision de 30 %. Le spectre MS/MS ainsi obtenu est utilisé par MASCOT pour identifier et caractériser le peptide.

*RESULTATS ET
DISCUSSION*

Chapitre VI

« Résultats et discussion »

Préambule

Les inhibiteurs de peptidases à sérine du clade A3 (SERPINA3) constituent une avenue thérapeutique intéressante pour le traitement ou le dépistage des cancers et maladies neurodégénératives liés à une accélération ou à un dysfonctionnement de l'apoptose respectivement. Par ailleurs, les serpins A3 bovines (bovSERPINA3) sont impliquées dans le processus d'attendrissage des viandes en jouant un rôle crucial dans la première phase de l'évolution du muscle (mort cellulaire programmée ou apoptose) après abattage, en inhibant les caspases. Dans le contexte de la viande, ces inhibiteurs étaient d'autant plus importants que leur concentration dans le tissu musculaire s'est avéré être le meilleur indice de prédiction de la tendreté de la viande.

Compte tenu de leur importance dans la régulation de l'apoptose, nous avons essayé de vérifier si la SERPINA3 sauvage humaine est capable d'inhiber les caspases exécutrices (caspase 3) comme les serpins A3 bovines et d'éclaircir ainsi le mode d'inhibition de ces caspases par les serpins du clade A3 en rapport équimolaire, enzymes possédant deux sites actifs alors que toutes les sérines protéases cibles des serpins n'en contiennent qu'un seul. Mais aussi de préciser la relation entre ces serpins bovines et humaines du clade A3, serpins présentant une grande homologie de structure avec celles qui ont été purifiées (bovSERPINA3) à partir du muscle du bovin.

Pour réaliser ceci, il fallait tout d'abord purifier l'inhibiteur du sérum humain, qui n'a jusqu'à présent, été isolé que de plasma ou sérum. Mon travail personnel était alors essentiellement consacré à la purification de la SERPINA3 sauvage humaine tout en développant un protocole de purification adéquat selon le type de colonnes de chromatographies disponibles au laboratoire.

Nous présenterons donc successivement le protocole élaboré pour purifier la SERPINA3, puis quelques éléments en faveur d'un polymorphisme de cet inhibiteur qui ne comprendrait qu'un seul membre dans la littérature jusqu'à ce jour, puis nous consacrerons

une large partie à la caractérisation et l'identité de cette famille d'inhibiteurs en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la bovSERPINA3 présentant 75 % d'identité. Enfin, nous terminerons par la présentation de cette famille multi-génique et de ses fonctions biologiques possibles et notamment son implication probable dans la régulation de l'apoptose et conséquences. Cette hypothèse implique au fait l'inhibition de la caspase 3, peptidase jamais considérée à ce jour, comme une cible de ce type d'inhibiteurs dans les phénomènes de mort cellulaire. Nous présenterons alors quelques preuves montrant que la caspase 3 peut être inhibé ou régulé par la SERPINA3 sauvage humaine ou seule la serpine CrmA (*Cytokine response modifier A*) d'origine virale est connue être capable d'inhiber ce type de peptidases apoptogènes.

I. Purification de l' α_1 -antichymotrypsine (SERPINA3) humaine

Mon travail s'insère dans le cadre d'une étude globale qui vise à mieux connaître et caractériser la famille des serpinines du clade A3 bovines et humaines. Pour réaliser cette étude et pouvoir purifier l' α_1 -ACT du sérum humain, nous avons travaillé en collaboration avec nos collègues du Centre Jean Perrin (CJP) de Clermont-Ferrand – France. La source de purification de la SERPINA3 sauvage est le sérum humain issu du sang d'un donneur sain.

Notre choix a porté sur le sérum humain pour la purification en raison de sa richesse en inhibiteurs du clade A3, comme l'ont montré plusieurs auteurs (Calvin et Price, 1986 ; Whicher *et al.*, 1991) indiquant la sécrétion de l' α_1 -ACT par les hépatocytes à un taux basal de 0,3 à 0,6 g/litre.

Les premières méthodes de purification de l' α_1 -ACT ont été décrites il y a une trentaine d'années. Malgré de nombreuses publications y faisant référence, la purification des serpinines et celles du clade A3 en particulier à partir du sérum humain demeure un exercice très délicat. Différentes méthodes ont été utilisées, et la méthode classique réside ainsi en un enchaînement de deux à cinq étapes chromatographiques, basées sur des interactions faibles et peu spécifiques (Travis *et al.*, 1978 ; Katsunuma *et al.*, 1980 ; Siddiqui *et al.*, 1980 ; Laine et Hayem, 1981 ; Abdullah *et al.*, 1983).

Concernant notre protocole de purification (figure 24), il a été inspiré et développé à partir de celui décrit par Travis *et al.* (1978), où nous avons appliqué quatre étapes chromatographiques, tout en exploitant uniquement deux types de supports chromatographiques. Néanmoins, de nombreux essais préliminaires sur différents autres

supports chromatographiques, ont été réalisés afin de mettre au point un protocole adéquat pour la purification de l' α_1 -ACT contenue dans le sérum traité. Notre protocole de purification a débuté alors, par la préparation du sérum à partir du sang d'un donneur sain, détaillé dans la partie Matériel et Méthodes et illustré dans la figure 20.

Enfin, le schéma de purification retenu en final a été établi après avoir testé différents scénarios que nous détaillerons ci-après. Dans tous les cas, la première étape du fractionnement est l'obtention d'une fraction enrichie en SERPINA3 (α_1 -ACT) par précipitation au sulfate d'ammonium entre 50 et 80 % de saturation.

I.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

La première étape est la précipitation au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ du sérum humain total entre 50 et 80 % de saturation qui permet l'obtention d'une fraction enrichie en α_1 -ACT (Frost *et al.*, 1997). C'est un fractionnement qui permet d'éliminer toutes les protéines à faible pouvoir hydrophobe car elles précipitent à 50 % de sulfate d'ammonium mais aussi les protéines très hydrophobes qui ne s'agrègent pas à 80 % de sulfate d'ammonium. Cette première étape de précipitation au sulfate d'ammonium est décrite et utilisée dans plusieurs protocoles de purification des serpines du clade A (Travis *et al.*, 1978 ; Travis et Morii, 1981 ; Abdullah *et al.*, 1983 ; Sinha *et al.*, 1994 ; Christensen et Sottrup-Jensen, 1994 ; Frost *et al.*, 1997 ; Aranishi, 1999 ; Tassy *et al.*, 2005).

Le sérum saturé par le sulfate d'ammonium est centrifugé afin de récupérer uniquement le culot qui est un agrégat de protéines. Ce culot est remis en suspension dans le même tampon de dilution de NaH_2PO_4 30 mM, pH 7,0 (figure 20). Cette étape de solubilisation est importante. Dans notre cas, elle permet de garder notre échantillon dans les mêmes conditions opératoires de préparation du sérum, de dialyse et de purification (par la première colonne), en travaillant à pH constant de 7,0 qu'on vérifie à chaque étape.

La précipitation saline au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est très importante dans le cas de la purification des serpines d'une manière générale et dans le cas de la SERPINA3 humaine en particulier. Parce qu'elle permet de séparer d'une part, un certain nombre de contaminants protéiques uniquement en fonction de leur degré de solvatation, et d'autre part de concentrer l'inhibiteur contenu dans le faible volume du sérum traité (Englard et Seiffter, 1990). Il est à noter que lors de l'élaboration de ce protocole et de la réalisation des différentes purifications, nos résultats ne sont pas satisfaisants par le manque fort probable de cette étape de précipitation saline.

De plus, cette étape permet à forte concentration l'agrégation des protéines en neutralisant les charges libres mais surtout en accaparant et en désorganisant les couches d'eau qui séparent les protéines solubilisées. Ces deux effets augmentent l'importance des interactions hydrophobes et provoquent une précipitation des protéines (Harris, 2001). Ceci a permis de concentrer notre échantillon en inhibiteurs, en diminuant le volume totale avant d'effectuer la séparation des protéines par une colonne sur la base de leur affinité au support de la colonne HiTrap Blue 5 ml Sépharose.

Dans le but de suivre l'évolution de la préparation du sérum traité lors du fractionnement, nous avons réalisé un gel en SDS-PAGE englobant les différents aliquotes prélevés lors de la préparation du sérum (figure 20), à savoir, le premier culot (C1) et surnageant (S1) de la 1^{ère} saturation à 50 % d'AS, le deuxième culot (C2) et surnageant (S2) de la 2^{ème} saturation à 80 % d'AS, le sérum brut traité (Sbt) du C2 remis en suspension dans le tampon de dilution, le sérum traité dialysé (Std) et le Stdf (filtré). Ces différents aliquotes ont été analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel d'acrylamide de 12 %, auxquels, nous avons rajouté des échantillons témoins : un échantillon de la SERPINA3 humaine du commerce et un autre de la BSA (*Bovine Serum Albumin*). Deux autres gels ont été analysés par immunoblotting, en utilisant deux anticorps : un anticorps anti-albumine et un autre anti-SERPINA3 pour tenter, cependant, de mettre en évidence la présence des deux protéines dans l'ensemble des échantillons testés.

Sur la figure 24, sont illustrés l'électrophorégramme, et les deux films du Western blotting obtenus pour les différents aliquotes. A travers les résultats du gel réalisé à ce stade, illustrés sur la figure 24 (A), nous constatons que les différentes étapes utilisées pour la préparation du sérum, ont efficacement concentré le sérum en inhibiteur. Mais aussi, elles ont permis d'obtenir un sérum traité moins contaminé, ce qui est facilement décelable sur la figure 24 (B). Un tel résultat corrobore à ce qui a été obtenu par Travis et Morii (1981). Nous remarquons aussi, que l'intensité des bandes de l'albumine est en régression durant toutes les étapes, allant du C1 jusqu'à la fin de la dialyse (Stdf, pour sérum traité dialysé et filtré). Ainsi, nous concluons qu'une quantité non négligeable d'albumine a été éliminée durant cette étape.

A travers ces résultats, nous pouvons dire que le Stdf obtenu est propre et il contient peu de protéines contaminantes. Ces dernières, qui persistent encore seront éluées durant la première chromatographie d'affinité. La réalisation d'un Western blotting anti-SERPINA3 et anti-albumine respectivement (figure 24 B et C), nous ont permis de vérifier la présence de la

SERPINA3 et de la sérualbumine qui est jusqu'à maintenant présente en quantité considérable.

I.2. Purification par chromatographie d'affinité « HiTrap Blue HP 5 ml »

Afin de purifier certains composants du plasma, le ligand Cibacron Blue F3G-A a été initialement recommandé pour de simples séparations par groupe, ou il a été utilisé pour fixer l'albumine et collecter les protéines non retenues dans une seule fraction (Travis et Pannell, 1973 ; Travis *et al.*, 1976). En outre, plusieurs techniques ont été aussi décrites pour éliminer ou diminuer l'albumine du sérum, en utilisant le Cibacron Bleu ou des méthodes immunologiques (Sahab *et al.*, 2007). Le gel de la colonne possède des particularités de fixation basées sur la structure de la molécule en plus de l'affinité très forte du ligand pour l'albumine. Vu son importance pratique et théorique, cette technique a été par ailleurs, adoptée et exploitée par plusieurs chercheurs, en l'utilisant comme étape préliminaire dans leur protocoles de purification. Pour sa simplicité, nous avons alors opté à l'utilisation de cette méthode, décrite et utilisée auparavant par Travis et Morri (1981), tout en exploitant la HiTrap Blue Sépharose qui donne encore de très bons résultats, pour réaliser la première et principale étape chromatographique.

Néanmoins, cette méthode de chromatographie d'affinité, est basée sur une faible interaction entre la molécule de l'inhibiteur (α_1 -ACT) et le ligand du Cibacron Blue Sépharose (Ahmed *et al.*, 2003 ; Sahab *et al.*, 2007). Elle est difficile à contrôler vu qu'elle est dépendante d'autres facteurs tels que la température et le pH (Laine et Hayem, 1981 ; Gianazza et Arnaud, 1982) et la quantité de la résine en contact avec la protéine dialysée (pour éliminer l'éventuelle contamination saline) (Frost *et al.*, 1997). C'est les raisons pour lesquelles, nous avons été très prudents durant toutes les étapes de préparation et surtout en ce qui est du pH.

Dans le cadre de la chromatographie d'affinité sur le support Cibacron Blue Sépharose (phase stationnaire), la purification des serpins est importante. Bien qu'elle n'augmente pas la sélectivité des serpins, elle permet de se débarrasser d'un certain nombre de protéines sériques pouvant gêner les différentes interactions (Ahmed *et al.*, 2003). Nous constatons, que cette colonne, nous a plus ou moins permet de séparer l' α_1 -ACT des autres protéines sériques (contaminants) restantes dans la solution du Stdf (figure 25). Cette dernière est obtenue après fractionnement au sulfate d'ammonium et dialyse contre le tampon phosphate (NaH_2PO_4 30 mM, pH 7,0), afin d'éliminer le sel existant. Puis elle est injectée après filtration à

température ambiante sur la colonne d'affinité HiTrap Blue HP 5 ml (1,6 x 2,5 cm). Ceci a permis de séparer les protéines contenues dans le sérum traité en fonction de leur affinité à s'adsorber au ligand du Cibacron Blue F3G-A. Elle a permis aussi, la fixation momentanée d'un maximum de séralbumine à raison de ~ 20 mg/ml du gel (en ralentissant son élution). Un résultat qui corrobore à ce qui a été déjà rapporté par plusieurs auteurs (Gianazza et Arnaud, 1982 ; Sahab *et al.*, 2007).

Le lavage de la colonne, est effectué à la fin de l'injection du sérum par le même tampon phosphate (sans NaCl) et une fois la DO à 280 nm est de retour à la ligne de base, un gradient de NaCl croissant est lancé pour permettre l'élution des protéines. Le NaCl est rajouté au tampon phosphate de sodium, et le programme lancé (montré sur la figure 25) est comme suit : 0 – 0,3 M (20 min), puis 0,3 – 0,5 M (15 min), puis 0,5 – 1M (15 min), puis 1M (10 min), et enfin 3 M de NaCl (15 min). En sortie de la colonne HiTrap Blue HP 5 ml, 140 fractions de 2 ml, sont collectées.

La mesure de la DO à 280 nm a été réalisée sur l'ensemble des fractions. La détermination de l'activité inhibitrice testée contre la trypsine et la chymotrypsine sont réalisées sur 73 fractions collectées. Ces dernières, sont choisies d'une manière à couvrir l'ensemble du chromatogramme (profil d'élution), notamment celles se trouvant au voisinage des pics ayant une DO élevée (voir profil des activités inhibitrices obtenu sur la figure 25). Le test des activités enzymatiques est suivi par un contrôle de pureté des différents pics, en faisant une électrophorèse en présence de SDS sur gel de polyacrylamide. Nous l'avons réalisé sur 33 fractions, le gel illustrant le contenu en protéines est montré sur la figure 26 (A). Le gel coloré au bleu de Coomassie R250, a été réalisé par sélection d'une fraction chaque quatre sur l'ensemble des 127 fractions éluées, par le tampon (B) à 1 M de NaCl.

Sur la figure 25, on peut s'apercevoir sur le premier pic enregistré, qu'une quantité importante de protéines ne s'est pas fixée au ligand de la colonne. Parmi elles comme attendu, nous retrouvons l'ensemble des protéines sériques contaminantes qui n'ont pas été éliminées lors de la préparation du sérum. A cet ensemble de protéines éluées, s'ajoute une quantité de la SERPINA3 perdue (fractions 1 – 15) dans cet éluât comme rapportée déjà par Travis *et al.* (1978) et Travis et Morri. (1981). Ce constat, est confirmé par la forte activité antichymotrypsique obtenue dans le premier pic élué. En effet, un test d'inhibition est effectué sur les fractions issues de l'injection et de début de lavage de ce premier pic. Dans ce dernier où une importante activité antichymotrypsique est enregistrée, correspond aux fractions du

non retenu allant de l'injection jusqu'à la fin de la paume du pic (retour à la ligne de base). Il s'est avéré que les fractions de ce pic inhibent fortement l'activité de la chymotrypsine, mais pas celle de la trypsine. Ce qui nous laisse dire que la SERPINA1, une serpine pouvant inhiber la chymotrypsine et possédant une forte homologie à notre inhibiteur n'est pas éluee dans le sommet de ce premier pic, jusqu'à la 33^{ème} fraction à une très faible absorbance. Rappelons que la SERPINA3 présente une identité de 41 % à son homologue SERPINA1 humaine (Van Gent *et al.*, 2003) et cette dernière inhibe aussi faiblement la chymotrypsine comme rapporté par Beatty *et al.* (1980) et Lomas *et al.* (1995a).

A partir du profil d'élution, nous confirmons que certaines protéines interagissent bio-spécifiquement au ligand grâce à sa similarité structurelle aux cofacteurs nucléotidiques. Tandis que d'autres molécules s'attachent d'une manière peu spécifique par des interactions électrostatiques et/ou hydrophobes au ligand anionique. La procédure de purification décrite ici pour isoler l' α_1 -ACT, est primordialement dépendante de la faible interaction entre la molécule de l'inhibiteur et le Cibacron Blue F3G-A à pH 7,0 et à température ambiante (Travis *et al.*, 1978 ; Travis et Morii, 1981). Nous remarquons aussi de la figure 26 (B), que la quantité de l' α_1 -ACT la plus pure éluee se trouve entre les fractions 17 – 52. Ces fractions se situent dans la paume du 1^{er} pic du chromatogramme et elles sont montrées par une surface pleine colorée en rose illustrée sur la figure 26. La pureté de l'ensemble des fractions 17 – 76 montrée sur la figure 26 (A), est déterminée par SDS-PAGE, suivi d'un Western Blot anti-SERPINA3 et anti-albumine (figure 26 B et C). Les résultats des gels obtenus ont bien confirmé la pureté de ces fractions, confirmant ainsi le pourcentage d'inhibition moyen de 91% très élevé obtenu pour les fractions 17 – 52.

De plus, nous notons également l'élution de trois autres pics, après lancement du programme d'élution de 0 à 1 M de NaCl. Le premier petit pic d'activité englobant cinq fractions (48 – 52), d'une DO de 1,4 environ, apparaît dès le début du gradient (à 0,05 M exactement du gradient), ce qui signifie qu'une partie est sans doute éluee dans le non retenu. Un résultat déjà confirmé et détaillé ci-dessus sur le premier grand pic enregistré juste après l'injection du sérum et ayant une forte activité inhibitrice vis-à-vis de la chymotrypsine.

Le second pic d'activité sort à une concentration en NaCl de 0,1 M environ et s'étend jusqu'à 0,6 M. Enfin le dernier pic, le plus faible en terme d'activité, correspond aux fractions éluees à partir de 0,6 M et s'étend jusqu'à une forte concentration en sel (1 M). Il faut noter que le gradient de sel lancé, n'est pas appliqué par Travis *et al.* (1978). Dans le protocole de

ces derniers, l'élution est lancée directement à 0,1 M de NaCl après un long lavage avec le tampon d'équilibration s'étalant sur plus de 400 fractions. Néanmoins, notre chromatogramme est le même en ce qui concerne le premier grand pic obtenu juste après l'injection du sérum. Notre gradient a pu avoir provoqué peut être une élution graduelle entraînant la séparation de plusieurs formes. À la fin du programme nous avons lancé une élution complémentaire à 3 M de NaCl, ayant pour but de s'assurer que presque toutes les protéines présentes dans le sérum sont éluées à 1M. À partir du profil d'élution montré sur la figure 25, nous avons constaté qu'une faible quantité protéique résiduelle est présente. Néanmoins, nous avons perdu aussi à ce niveau une autre quantité de notre inhibiteur contaminé par la SERPINA1 identifiée par l'activité trypsique et probablement d'autres protéines sériques à faible concentration protéique.

Enfin, comme nous avons obtenu de l'activité antichymotrypsine sur tout le profil (dans le non retenu et l'éluât) un résultat qui n'est pas attendu, nous avons décidé de pooler le maximum de fractions s'étalant sur tout le chromatogramme afin de mieux séparer les protéines présentes en les fractionnant sur une colonne d'échanges anionique.

I.3. Fractionnement du « pool H1 » par chromatographie échangeuse d'anions

Afin de séparer contaminants et inhibiteurs selon leurs différences de charges, et de concentrer l'inhibiteur, le pool « H1 » obtenu par chromatographie d'affinité, est soumis à une chromatographie échangeuse d'anions de type Q-Sépharose. Nous avons donc pooler 86 fractions ayant le maximum d'inhibition antichymotrypsique et un minimum d'activité antitrypsique (< à 25 %), qu'on a met à dialyser contre un tampon Tris/HCl 30 mM, pH 8,0 à 4 °C pendant une nuit.

Le pool « H1 », dialysé et filtré sur un filtre de 0,80 µm, est chargé sur une colonne de Q-Sépharose FF (2.5 x 10 cm) préalablement équilibrée avec le même tampon. À la fin de l'injection du pool, un lavage avec 12 ml du tampon d'équilibration (fractions 18 – 21) est réalisé avant de lancer le programme d'élution des protéines avec un gradient de sel croissant. Le NaCl est additionné au tampon phosphate de sodium. Le programme d'élution réalisé (figure 27) est comme suit : 0 – 0,3 M (20 min) ; 0,3 – 0,5 M (10 min) ; 0,5 – 1 M (30 min), et enfin 1 M (5 min). En sortie de la colonne Q-Sépharose FF, 85 fractions de 3 ml, sont collectées, dont 64 constituent l'éluât. Les pourcentages d'inhibition des 73 fractions parmi 85 testées exprimées en pourcentage ont été consignés sur la figure 27.

Comme le montre la figure 27, quatre fractions non retenues (Q0) sur la colonne et inhibant la chymotrypsine à un taux $\leq 30\%$ sont éluées pendant le lavage. L'éluion réalisée en un gradient de 0 à 0,75 M de NaCl dans le même tampon a permis d'obtenir cinq pics d'une DO allant de 0,2 à 0,5 (figure 27). Le 1^{er} pic (Q1) est élué entre [0,05 - 0,12 M] ; le 2nd pic (Q2) ayant la plus faible DO que les autres est élué entre [0,12 - 0,18 M] présentant une activité contre la chymotrypsine supérieure au précédent ; le 3^{ème} pic (Q3) possédant l'activité antichymotrypsique la plus élevée est élué entre [0,18 - 0,27 M] ; l'avant dernier pic (Q4) le plus large, englobant plus de fractions et possédant une DO de 0,5 est élué entre [0,27 - 0,5M] et enfin, le dernier pic (Q5) se situant sur la paume du précédent pic est élué entre [0,5 - 0,75 M]. Au-delà de 0,75 M de NaCl, plusieurs artéfacts de faible concentration protéique ($< 0,08$ de DO) sont enregistrés. Ces derniers possèdent une faible activité inhibitrice ($< 30\%$), et ils ne sont pas pris en compte dans la suite de l'étude.

Les cinq pics obtenus délimitent 30 fractions s'étalant de la fraction 26 au 56 (pool H1Q1), ayant l'activité inhibitrice la plus élevée. Cette inhibition atteint une moyenne globale de 80 %, ce qui témoigne d'une forte activité inhibitrice et donc une quantité relativement importante en SERPINA3. Il n'empêche qu'une activité inhibitrice est présente aux cotés de ces fractions, d'une moyenne de 17 et 20 % en amont et en aval des pics respectivement. La DO à 280 nm montre une forte proportion de protéines dans les 30 fractions enregistrées par les cinq pics, qu'on a facilement visualisé par le gel d'électrophorèse réalisé et coloré au bleu de Coomassie R 250.

Cette étape d'électrophorèse en SDS-PAGE réalisée, nous a permis de connaître le contenu protéique et de vérifier la pureté de l'ensemble des fractions éluées du pool « H1Q1 » (figure 28). Le pool « H1Q1 » a servi au fait, à la réalisation du deuxième fractionnement, qu'on a passé sur une 2^{ème} colonne d'échange anionique ou une seconde chromatographie d'affinité. L'analyse par électrophorèse est complétée par confirmation de la présence de l'inhibiteur par analyse au Western blotting montrée sur la figure 28 (B) en utilisant l'anticorps dirigé contre la SERPINA3 bovine. Les résultats obtenus ont bien confirmé une hétérogénéité protéique entre les divers pics enregistrés, ce qui explique la présence de cinq pics distincts ayant des concentrations protéiques différentes (DO différentes). Le Western blotting réalisé a révélé la présence de l'inhibiteur presque dans toutes les fractions, sauf dans les quatre dernières, où l'intensité est trop faible, ce qui est dû probablement à la faible concentration protéique de ces fractions ($DO_{280\text{ nm}} < 0,15$). Par contre, l'utilisation d'un

anticorps anti-albumine n'a pas révélé cette protéine dans les quatre pics, sauf une faible quantité dans le pic Q4, un résultat qui n'est pas montré ici.

Concernant le premier et second pic élués, il semblerait que la colonne a séparé uniquement les différentes formes de la SERPINA3 présentes. En revanche, le 3^{ème} et 4^{ème} pic n'ont pas été débarrassés des contaminants de faible masse, ainsi que des contaminants au-delà de 100 kDa. Par contre, pour le troisième pic, très peu de bandes sont visibles, ce qui conforte la faible DO à 280 nm obtenue. Le fait de pooler les fractions 26 – 56, permet de concentrer l'inhibiteur mais une quantité de protéines contaminantes restent présentes.

Enfin, les fractions obtenues « H1Q1 », sont mises à dialyser pendant une nuit contre du tampon Tris/HCl 30 mM, pH 8,0 et NaH₂PO₄ 30 mM, pH 7,0 pour les chromatographies suivantes.

I.4. Fractionnement du « pool H1Q1 » par chromatographie échangeuse d'anions

Nous avons choisi cette chromatographie pour mieux fractionner notre inhibiteur, et pouvoir mieux séparer les différentes formes. Ainsi, si nous avons la forme native dans notre échantillon, elle pourra être séparée des autres contaminants mais aussi de la forme clivée ou dégradée.

Dans ce contexte, un volume de 50 ml du pool « H1Q1 » est soumis à une même chromatographie sur une colonne Q-Sépharose FF (1.0 x 7.0 cm), équilibrée dans un tampon Tris/HCl 30 mM, pH 8,0. Cette étape permet l'élimination d'une large partie de protéines contaminantes restantes et de concentrer notre inhibiteur dans un faible volume de fractions éluées lors du lavage de la colonne avec 1M de NaCl. L'élution se fait à un débit de 2 ml/min sans gradient de sel. Le volume des fractions collectées est de 4 ml pour le non retenu et 2 ml pour l'éluât.

La figure 29 illustre le profil d'élution obtenu et l'activité inhibitrice vis-à-vis de la chymotrypsine des 41 fractions collectées, dont 27 constituent l'éluât. L'élution réalisée avec le tampon d'élution contenant 1M NaCl a permis l'enregistrement de deux grands pics majoritaires ayant des DO maximales de 0,2. Le premier pic (H1Q2) englobe les fractions 16, 17 et 18 (pool à fractionner) présentant une moyenne d'inhibition contre la chymotrypsine de 78 % et le second pic (Q2) englobe cinq fractions (19 – 23), d'une moyenne inhibitrice de 82%. Par contre, ce second pic est contaminé avec d'autres protéines, notamment l' α_1 -antitrypsine, où une inhibition de 59 % est enregistrée pour les mêmes fractions. La

réalisation d'une électrophorèse en conditions dénaturantes (figure 30) confirme un tel résultat, qui dévoile la présence d'une quantité importante de protéines surtout dans les deux premières fractions (19 et 20).

En plus des pics enregistrés, deux autres pics minoritaires (Q3 et Q4) d'une DO $<$ à 0,05 ont été obtenues sur la paume du pic Q2. Ces deux derniers pics englobent de faibles concentration protéiques et activité inhibitrice. Sur la même figure 29, nous constatons que les deux pics, le maximum de DO à 280 nm et le maximum d'inhibition de la chymotrypsine se chevauchent et aucun décalage n'est décelé. Cela nous laisse dire que l'élution à 1 M NaCl permet la séparation des différentes espèces de l' α_1 -ACT selon leur pI. L' α_1 -ACT qui a été trouvé avoir un pH isoélectrique (pI) variant de 5,0 à 5,5 (Travis et Salvesen, 1983), devient négative au pH de la colonne qui est de 8,0. Ce qui aboutit à l'élution des différents isoformes présumées êtres présentes.

Néanmoins, en comparant ces résultats à la précédente Q-Sépharose, le profil d'élution obtenu est différent ou uniquement trois pics d'inhibition majoritaires ont été enregistrés. Ce qui est dû peut être à l'élution appliquée sans gradient de sel. Cependant, dans ce protocole, cette phase chromatographique a entraîné une perte de l'inhibiteur assez importante. Puisque le test d'inhibition réalisé montre la présence de notre inhibiteur sur tout le chromatogramme d'élution (pourcentage d'inhibition moyen d'environ 30 % dans le non retenu et les deux derniers pics Q3, Q4). Ceci est dû peut être à la trop forte teneur en sel du tampon. En effet, en présence de NaCl 1M, probablement le degré d'hydrophobicité des protéines augmente fortement, même pour les protéines hydrophiles comme la SERPINA3. Par conséquent, une partie d'entre elles s'accroche sur la colonne et son élution s'effectue au fur et à mesure. Pour éviter de fixer une trop grande quantité d'inhibiteur sur la colonne et l'éluer dans toutes les fractions collectées, une concentration en sel de 0,5 M serait peut être suffisante pour éviter de diminuer trop fortement l'hydrophobicité de l'inhibiteur qui sera alors élué dans des pics rapprochés une fois l'élution saline est lancée.

Le premier pic (Q1) englobe les fractions 16, 17 et 18 (pool H1Q2), ayant une activité inhibitrice importante $>$ 75 % (figure 29) et un profil électrophorétique propre, c'est-à-dire pas de contaminants de haut ou faible poids moléculaire (figure 30). En vue de réaliser les tests d'inhibition avec les différentes enzymes, jusqu'au là ces trois fractions obtenues contenant l'inhibiteur sont satisfaisantes. Nous avons alors décidé de les concentrer par la même Q-Sépharose, avant de réaliser les tests d'inhibition.

Pour cela nous avons exploité la petite colonne d'échange anionique, après avoir dialysé le pool toute la nuit dans le même tampon à pH 8,0. Le pool filtré à 0,2 μm , est injecté en circuit fermé (3x), avant de lancer l'élution directe sans gradient de sel avec le même tampon contenant 1M NaCl.

L'élution a donné lieu à 18 fractions, dont huit constituent le non retenu (NR) et les dix restantes l'éluat. Dans ce dernier, seulement quatre fractions inhibitrices (12 – 15), sont éluées. Elles se chevauchent sur l'unique pic de DO enregistré et possèdent une activité inhibitrice de 85 % (figure 31), une élévation de 7 % par rapport au pool « H1Q2 ». Ces fractions ont servi alors à la réalisation des différents tests d'inhibition.

Cependant, pour s'assurer de leur contenu en SERPINA3, des aliquotes de 25 μl ont été récupéré pour une analyse par immunoblotting. Le résultat obtenu illustré sur la figure 32, confirme la présence de l'inhibiteur dans les fractions collectées en accord avec les résultats des activités inhibitrices. Différentes bandes ont été révélées sur le film du Western blot réalisé. Dans la fraction 12 par exemple, on distingue 4 bandes allant de 25 à 75 kDa. En outre, dans la fraction 13, uniquement deux bandes se situant entre 50 et 75 kDa ont été révélées. Tandis que, dans les deux autres fractions restantes (14 et 15), une seule bande est révélée par l'anticorps.

I.5. La deuxième chromatographie d'affinité par la « HiTrap Blue HP 5 ml »

Les fractions [26 – 56] formant le pool « H1Q1 » ayant l'activité antichymotrypsique la plus élevée obtenues en sortie de la colonne d'échange anionique ont été poolées et traitées comme mentionné dans Matériel et Méthodes. Le pool préparé a été passé sur la seconde chromatographie d'affinité. Cette dernière a pour but de confirmer le résultat du taux élevé en SERPINA3 obtenu et illustré sur la figure 26 (B) par le passage sur le Cibacron Blue Sépharose. Mais aussi, de vérifier la possibilité d'appliquer une 2^{ème} colonne d'affinité derrière la Q-Sépharose pour avoir une quantité plus pure en inhibiteur.

Pour cela, un volume de 20 ml du pool « H1Q1 » récupéré, est injecté à température ambiante sur la 2^{ème} colonne d'affinité HiTrap Blue HP 5 ml (1,6 x 2,5 cm). L'injection est suivi d'un lavage par le même tampon phosphate (sans NaCl) jusqu'au retour de la DO $\lambda=280\text{nm}$ à la ligne de base. Puis un gradient de NaCl croissant est lancé pour permettre l'élution des protéines. Le NaCl est rajouté au tampon phosphate de sodium, et le programme lancé (montré sur la figure 33) est comme suit : 0 – 0,3 M (10 min), puis 0,3 – 0,5 M (10 min), puis

0,5 – 1M (15 min), et enfin 1M (10 min). En sortie de la colonne HiTrap Blue HP 5 ml, 92 fractions de 2 ml, sont collectées.

La mesure de la DO à 280 nm est réalisée sur l'ensemble des fractions et la détermination de l'activité inhibitrice testée contre la chymotrypsine sont réalisées sur 73 fractions collectées. Ces dernières, sont choisies d'une manière à couvrir l'ensemble du chromatogramme (profil d'élution), notamment celles se trouvant au voisinage du premier pic d'injection et du lavage avant lancement du gradient de sel.

A la lecture des résultats illustrés sur la figure 33 montrant l'inhibition de la chymotrypsine, deux principaux pics d'inhibition sont enregistrés. Le premier (pool « H2 », fractions 3 – 23) qui atteint 92 % d'inhibition se superpose sur le premier pic d'élution et possède une concentration protéique élevée et le second ayant une moyenne d'inhibition de 76 % englobe 12 fractions (57 – 69) éluées entre 0,3 et 0,5 M de NaCl. Comme le premier pic élué nous a marqué, par la réponse qu'il nous fournit par rapport à l'objectif fixé pour cette étape et par manque de temps (l'avant dernière journée de mon séjour), nous avons alors opté à pooler l'ensemble de ces fractions afin les concentrer sur une dernière colonne échangeuse d'anions.

Le pool « H2 » (figure 33) collecté juste après la réalisation des activités enzymatiques est dialysé contre le tampon Tris/HCl 30 mM, pH 8.0 avant de le fractionner (voir détails Matériel et Méthodes). Un volume de 34 ml est récupéré et filtré avant de l'injecter sur la colonne. L'élution réalisée directement sans gradient de sel avec le même tampon contenant 1M NaCl, a permis l'obtention de deux pics qui s'empiètent l'un sur l'autre (figure 34). Le fractionnement a donné lieu alors à cinq fractions inhibitrices, avec une moyenne de 83 %. Ces fractions nous ont servi à la réalisation des tests d'inhibitions avec les différentes serine et cystéine peptidases étudiées.

En plus de l'activité inhibitrice réalisée, les fractions ont été analysées par Western blot en utilisant l'anticorps dirigé contre la SERPINA3. Le résultat obtenu est illustré sur la figure 35. On voit bien que l' α_1 -ACT est identifiée dans toutes les fractions avec des intensités différentes, notamment pour les fractions 26, 27 et 28 où une forte inhibition est obtenue. Dans ces dernières, plusieurs formes se distinguent, avec des masses allant de 50 à 150 kDa. Tandis que pour les autres fractions, les bandes révélées sont faibles et on trouve une seule bande par fraction. Cependant, la fraction 30 n'a pas révélé la présence de l'inhibiteur.

I.6. Protocole final à prendre en considération ultérieurement pour la purification de la SERPINA3 sauvage du sérum humain

Le protocole de purification décrit ci-dessus pour isoler l' α_1 -ACT est dépendant de la faible interaction entre la molécule de l'inhibiteur et le ligand Cibacron Blue Sépharose à pH 7,0 et à température ambiante (Sahab *et al.*, 2007). Ainsi, l'ensemble des résultats présentés, concernant les deux voies de purification de l' α_1 -ACT nous ont permis d'arriver finalement à optimiser le protocole de purification final.

De plus, plusieurs réponses ont été apportées à l'ensemble des questions posées lors de la purification, notamment la gêne stérique engendrée par la sérumalbumine. Sa présence peut masquer la visualisation des pics des autres protéines visualisées par l'absorption UV à 280nm. Il s'est avéré enfin qu'une deuxième chromatographie d'affinité sur le ligand Cibacron Bleu Sépharose est nécessaire pour écarter la contamination persistante de l'albumine. Il est à signaler que dans le sérum humain, l'albumine sérique est une glycoprotéine majoritaire (> 50 %) dont il est difficile de s'affranchir en cours de purification. Au fait, cette difficulté est due à l' α_1 -ACT qui possède un poids moléculaire très proche de celui de l'albumine (Sviridov *et al.*, 2006).

On se référant par exemple au protocole de Travis et Morii (1981), nous apercevons qu'ils ont opté à une chromatographie d'affinité sur Cibacron Bleu Sépharose après concentration comme deuxième étape chromatographique pour se débarrasser de l'albumine et d'autres contaminants résiduels. Pour éviter au maximum la contamination par l'albumine, nous avons apporté quelques modifications au protocole testé et discuté ci-dessus. Le protocole définitif illustré sur la figure 36, est complété par une deuxième chromatographie d'affinité sur HiTrap Bleu Sépharose. Sur la même figure du protocole, quelques remarques concernant la démarche à suivre lors de la purification ont été mentionnées. Néanmoins, d'autres détails supplémentaires seront développés ci-dessous.

Après avoir préparé le sérum traité, dialysé et filtré (Stdf), l'injection et l'élution par la première chromatographie HiTrap Bleu Sépharose HP 2,5 ml (1.6 x 2.5 cm), s'opèrent de la même procédure déjà décrite. Ensuite, le pool que nous devons récupérer est celui obtenu après lavage au tampon d'équilibration. Nous réalisons alors le pool à partir de la 6^{ème} fraction suivant le lavage et nous s'arrêtons lorsque la concentration protéique (à 280 nm) est inférieure à 0,1 de DO.

Le pool « H1 » ainsi récupéré, est dialysé dans 5 litres (x 2) de Tris/HCl 30 mM, pH 8,0 toute une nuit à 4 °C et sous agitation. Après dialyse et filtration sur un filtre de 0,45 µm, le pool est injecté à travers la première colonne Q-Sépharose FF (2.5 x 10 cm). Un gradient de concentration est lancé pour éluer l'inhibiteur. Le programme d'élution est comme suit : 0 – 0,3 M (10 min), puis 0,3 – 0,5 M (10 min), puis 0,5 – 0.75 M (15 min), et enfin 0.75 – 1 M (10 min). Quant aux fractions à pooler, elles dépendent étroitement des activités enzymatiques contre la chymotrypsine et la trypsine et du Western blot réalisés afin de sélectionner les fractions les plus concentrées en α_1 -ACT.

Ainsi le pool « H1Q1 » récupéré, est dialysé dans le tampon NaH_2PO_4 30 mM, pH 7,0 pendant une nuit à 4 °C et sous agitation. Après filtration sur un filtre de 0,2 µm, l'échantillon est injecté sur la deuxième colonne d'affinité (HiTrap Bleu Sépharose). L'élution est effectuée après lavage de la colonne avec le même tampon d'équilibration. Puis, le même programme du gradient de sel (1M NaCl) cité ci-dessus est lancé. L'activité enzymatique contre la chymotrypsine et une électrophorèse en SDS-PAGE sont réalisées afin de choisir le pool à concentrer en final sur une colonne échangeuse d'anions. Le pool englobera les fractions éluées par lavage au tampon phosphate, vu qu'elles possèdent l'activité inhibitrice la plus élevée (voir figure 33). Toutefois, une électrophorèse suivie d'un Western blot sera intéressante pour mieux cibler les fractions les plus pures et concentrées en inhibiteur.

Enfin, la quatrième et dernière chromatographie consiste en une chromatographie échangeuse d'anions sur la petite colonne Q-Sépharose (1.0 x 7.0 cm) de fractionnement. Le pool dialysé contre le tampon de cette dernière, est filtré avant de l'injecter en boucle fermée par trois passages au minimum en utilisant une pompe péristaltique. L'élution directe sans gradient de sel s'effectue après un petit palier de lavage avec le tampon Tris/HCl 30 mM, pH 8,0. Les fractions inhibitrices éluées en un seul pic constituent le produit final (SERPINA3) et seront ainsi récupérées pour les tests enzymatiques et études biochimiques envisagées.

Les fractions inhibitrices formant le produit final peuvent être conservées telles quelles ou dialysées contre le tampon Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 pour les conserver à 4 °C pendant en moins un mois (Travis *et al.*, 1978) ou à - 60 ou - 70 °C pendant plusieurs mois (Aranishi, 1999). Le produit final peut être aussi lyophilisé après dialyse contre 10 mM Tris, 1% Saccharose, 2% Glycine, pH 7,5 (Hoffmann *et al.*, 2011).

II. Éléments en faveur d'un polymorphisme de cette serpine chez l'humain

De nos jours, peu de travaux se font pour démontrer l'existence d'un polymorphisme protéique chez la serpine du clade A3 humaine. Excepté, la recherche de quelques micro-hétérogénéités ou polymorphismes génomiques provoquant certaines serpinopathies dues à une ou plusieurs mutations, on ignore si non toutes connaissances sur les inhibiteurs du clade A3 qui ne comprendrait qu'un seul membre jusqu'à ce jour. De plus, nous avons constaté le manque de publications sur le polymorphisme protéique des inhibiteurs de sérine peptidases du clade A3 dans la littérature.

Néanmoins, le polymorphisme décrit pour cette protéine semble être tissu spécifique, et il apparaît en association à quelques résidus de la séquence peptidique. Les seuls polymorphismes décrits, sont ceux associés aux changements d'allèles dans les séquences de la région promotrice du peptide signal (Kamboh *et al.*, 1995 ; Dardiotis *et al.*, 2008 ; Somarajan *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, nous venons de mettre en évidence à travers cette étude que cet inhibiteur de sérine peptidase englobe possiblement toute une famille multi-génique. Dans ce qui suit, nous développerons alors un ensemble d'éléments et preuves en faveur d'un polymorphisme protéique de la famille de la SERPINA3 humaine.

II.1. Chromatographies sur HiTrap Bleu Sépharose et Q-Sépharose 1 et 2

La purification de l' α_1 -ACT a nécessité comme il a été déjà développé, l'utilisation de deux supports chromatographiques sur deux types de colonnes, une première colonne d'affinité et une seconde d'échange d'anions. Le sérum (Std) injecté sur la colonne HiTrap Bleu HP 5ml, est élué sur plusieurs pics montrés sur le profil d'éluion dans la figure 25. Les fractions collectées et analysées pour leur activité enzymatique ont montré une inhibition chymotrypsique s'étalant sur l'ensemble du chromatogramme. Un tel résultat n'est pas attendu si nous comparons notre profil d'éluion à celui de Travis *et al.* (1978), vu que l'inhibition dans notre cas s'étale sur l'ensemble des fractions et dans leur totalité $\geq 50\%$ d'inhibition.

Ce résultat n'est pas obtenu uniquement pendant cet essai, mais aussi dans les premiers tests chromatographiques réalisés sur la même colonne. De plus, chaque pic du chromatogramme (4 pics au minimum) se chevauche sur un pic d'inhibition correspondant. Un tel résultat n'a jamais été déjà mis en évidence également par d'autres études. Ceci nous a

incité à collecter alors le maximum des fractions inhibitrices collectées sur le chromatogramme (en contaminant notre pool certainement par l'albumine et d'autres protéines sériques), afin de les fractionner sur une colonne d'échange anionique. Les 86 fractions poolées, ont été injectées sur la première colonne Q-Sépharose FF (2.5 x 10 cm) pour mieux séparer les différents pics d'inhibitions. Mais aussi, afin de mettre en évidence l'existence de plusieurs formes inhibitrices de l' α_1 -ACT, pour appuyer l'hypothèse d'existence de plus d'un seul membre.

Après chromatographie, le résultat obtenu illustré sur la figure 27, était très original, vu que nous avons pu caractériser en moins cinq différents pics et chacun correspond à un pic d'inhibition spécifique. De plus, la superposition des pics d'inhibition sur les différents pics d'élution (Q_1 , Q_2 , Q_3 , Q_4 , et Q_5), montrent des pourcentages d'inhibition respectifs très élevés (>80 %). Cette étape chromatographique d'échange ionique, a permis de séparer les protéines en fonction de leurs points isoélectriques. En travaillant à un pH fixe, les protéines vont devenir plus ou moins anioniques. Puis, en jouant sur la teneur en sel, les protéines vont engendrer des interactions plus ou moins fortes qui conduisent soit à leurs rétentions, soit à leurs éluions. C'est cette dernière qui s'est produite fort probablement lors de la purification des différentes formes de la SERPINA3. Il a été déjà rapporté, que l' α_1 -ACT possède un pI variant de 5,0 à 5,5 (Travis et Salvesen, 1983). Dans une autre étude purifiant l' α_1 -ACT à partir du sérum d'autruche, Frost *et al.* (1997) ont montré l'existence de plusieurs isoformes à des plages de pH différents qui varient de 3.9 – 4.1 et plusieurs se distinguent à 4.2 – 4.4.

Enfin, le dernier fractionnement du pool « H1Q1 » issu de cette dernière chromatographie, sur la petite colonne Q-Sépharose FF (1.0 x 7.0 cm) illustré sur la figure 29, a révélé encore en moins trois pics d'élution avec leurs pics d'inhibition chymotrypsique respectifs.

II.2. Glycoformes de la SERPINA3

Rademacher *et al.* (1988) ont introduit le terme de « glycoformes » pour décrire des glycoprotéines ne différant les unes des autres que par leur structure glycanique. On parle alors de glycohétérogénéité (Rademacher *et al.*, 1988). Cette hétérogénéité peut être de deux ordres : l'hétérogénéité d'occupation des sites de glycosylation (macro-hétérogénéité) qui se caractérise par l'occupation plus ou moins partielle des sites de glycosylation ou l'hétérogénéité de structure des glycannes (micro-hétérogénéité) qui se traduit par la présence d'oligosaccharides différents sur un site de glycosylation donné d'une chaîne polypeptidique.

Par ailleurs, l'existence de différents points isoélectriques (pI) accompagne une hétérogénéité massique des protéines. Ce qui aboutit alors à une macro-hétérogénéité et l'existence de plusieurs formes (glycoformes) de la protéine. Il a été déjà rapporté depuis une vingtaine d'années que l' α_1 -ACT (une glycoprotéine), exprime un haut degré de micro-hétérogénéité (Lindmark *et al.*, 1989). Plusieurs autres chercheurs ont rapporté que son poids moléculaire est hétérogène, et varient de 55 000 à 68 000 Da (Travis et Johnson, 1978 ; Travis *et al.*, 1978 ; Laine et Hayem, 1981 ; Travis et Salvesen, 1983 ; Bao *et al.*, 1987 ; Kalsheker, 1996). En outre, l'ADNc (ADN complémentaire) de l' α_1 -ACT code pour un précurseur de 423 résidus d'acides aminés, possédant une masse calculée théorique avoisinant les 48 kDa. Ce dernier, inclut le peptide signal hydrophobe et la chaîne polypeptidique mature de l'inhibiteur (Chandra *et al.*, 1983). Par ailleurs, une focalisation isoélectrique (IEF, *isoelectric focusing*) a démontrée une hétérogénéité de charge, qui est due en partie à la variation du degré de sialylation (Gianazza et Arnaud, 1982). Deux séquences N-terminales de l' α_1 -ACT isolées du plasma humain ont été rapportées (Morri et Travis, 1983). De plus, deux autres isoformes de l' α_1 -ACT ont été démontré et qui diffèrent l'une sur l'autre et une d'elles a perdue deux résidus d'acides aminés dans sa séquence terminale (Lindmark *et al.*, 1989).

Quant à nous, nous avons fait recours selon Harcum (2006) à des techniques électrophorétiques et Western blotting pour la caractérisation de la macrohétérogénéité de la glycosylation. Les poids moléculaires calculés pour la protéine sur la base de leur profil électrophorétique et surtout les bandes de la SERPINA3 révélées par Western blotting (dans tous les gels et films réalisés figure 26, 28, 30, 32, 35 et 37), varient de 57 à 65 kDa.

Dans la figure 37, nous avons regroupé quelques fractions révélées par immunoblotting déjà illustrés sur les figures 28 (B) et 30. Nous constatons, que plusieurs formes sont reconnues par l'anticorps anti-SERPINA3, avec plusieurs variations de masses et d'intensité. Ces variations sont dues possiblement à la différence de glycosylation de la protéine (Tokes *et al.*, 1981 ; Gettins, 2002), dont 25 à 26 % de sa masse sont occupés par des hydrates de carbone de type N-glycannes. L'estimation du poids moléculaire par SDS-PAGE, est soumise néanmoins à des erreurs et une sous-estimation a été constatée. La valeur du poids moléculaire fiable et sûr est 65 kDa, elle a été déterminée par des mesures de sédimentation à l'équilibre (Travis et Morii, 1981). Cette masse est obtenue après la mise en cause de la première masse de 68 kDa décrite par Travis *et al.* (1978). Nonobstant, nos valeurs sont très proches de ce qui a été décrit par ces derniers.

D'autre part, Wei *et al.* (1994) rapportent que la SERPINA3 comporte six sites potentiels de N-glycosylation dans sa séquence primaire, mais aucune étude n'a toutefois encore déterminée la localisation, la structure ou la fonction des glycanes présents. De plus, les N-glycanes de l' α_1 -ACT humaine comportent des résidus d'acides sialiques terminaux, monosaccharides très importants pour assurer la demi-vie des protéines plasmatiques (Matsumoto *et al.*, 1995 ; Kelm et Schauer, 1997 ; Ni *et al.*, 2000). Les sites de glycosylation ne sont toutefois pas forcément conservés d'une isoforme protéique à l'autre (Gettins *et al.*, 1996). Rappelant, que la N-glycosylation, est un processus enzymatique conditionné par l'accessibilité de la protéine et du glycanne lui-même aux enzymes de maturation de la N-glycosylation (Lerouge *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces rapports, laissent certains penser que la micro ou macro-hétérogénéité électrophorétique est le résultat des différences en composition d'acides sialiques à la séquence terminale ou à des combinaisons des branches d'oligosaccharides, ou à des limites de protéolyse ou encore à une combinaison de l'ensemble de ces hypothèses (Pierce *et al.*, 1976 ; Koji *et al.*, 1978 ; Kuhn *et al.*, 1994 ; Frost *et al.*, 1997). Dans notre cas, il est fort probable que les poids moléculaires apparents de 57 kDa sont dus à la désialylation (Lindmark *et al.* (1982).

Enfin, le degré de la macro-hétérogénéité et de la micro-hétérogénéité des glycoprotéines est dépendant des sites de glycosylation, de la conformation de la protéine, de l'état physiologique, le cas échéant, de l'environnement d'isolement.

II.3. Polymorphisme conformationnel de la SERPINA3

La nature métastable des serpines les rend susceptibles à adopter des conformations qui peuvent affecter leur activité inhibitrice. Les serpines inhibitrices tel que la SERPINA3, sont capable de subir des polymérisations ou former un état latent, qui sont des conformations relaxées qui les rendent très stables. Elles possèdent aussi la capacité à adopter d'autres conformations (clivée ou delta) à partir de leur structure native. Ainsi, elles peuvent former des dimères résistants en SDS/PAGE.

Les serpines sont généralement des protéines très instables à l'état natif et ont tendance à s'assembler bout à bout, par insertion de la boucle du site réactif (RCL, *Reactive center Loop*) d'une molécule dans le feuillet β A de la suivante, et à former ainsi de longues chaînes polymériques insolubles et inactives (Gettins, 2002).

Les différents Westerns blotting réalisés, nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'un polymorphisme conformationnel de la SERPINA3, soit par la formation de dimères (D) ou polymères (P), soit par l'adoption probable de la conformation delta (δ) partiellement clivée ou fort possible la forme latente (L) caractérisée par l'insertion prématurée du RCL dans le feuillet β A (Chang et Lomas, 1998), son adoption de façon spontanée lui permet de prolonger ainsi sa demi-vie (Mushunje *et al.*, 2004). Sur la figure 38, la fraction 26 issue du pool « H1Q1 » fractionné par la 1^{ère} Q-Sépharose (2.5 x 10 cm) a révélée l'existence de plusieurs conformères.

Le changement de conformation, aboutissant à la formation de dimères est catalysée par chauffage et par la présence de substances dénaturantes tel que le SDS (Patston *et al.*, 1995 ; Devlin *et al.*, 2002 ; Chow *et al.*, 2004). Le SDS contribue à la déformation de la molécule en augmentant l'espace entre les feuillets β où le RCL est inséré. Quant au chauffage, beaucoup de serpinines humaines montrent une température de fusion (T_m) d'environ 58°C (Dafforn *et al.*, 1999 ; Pearce *et al.*, 2004 ; 2007).

D'après Chow *et al.* (2004), selon les conditions de formation des dimères, le complexe peut être réversible ou irréversible. La forme active de la SERPINA3 illustrée sur la figure 38 montre une masse de 61 kDa. Nous constatons qu'elle a subi probablement des changements structuraux provoqués par l'effet de son environnement lors des différentes manipulations. Le même phénomène de dimérisation est observé chez les bovSERPINA3-1 et bovSERPINA3-3 des homologues de la SERPINA3, ou il a été trouvé qu'ils établissent des formes dimériques de 140 kDa (Tassy *et al.*, 2005) et 150 kDa (Herrera-Mendez, 2006).

Lorsque la bande de 112 kDa de la forme dimérique ou polymérique montrée sur la figure 37 est évaluée par densitométrie (par le logiciel UN-SCAN-IT gel 6.1), nous remarquons qu'elle représente environ 69 % de la quantité totale des protéines (SERPINA3) présentes dans la fraction 26. Un résultat qui corrobore à ce qui a été déjà observé pour la SERPINA1 et SERPINA3 plasmatiques, qui migrent faiblement dans le maillage d'un gel d'acrylamide à 12 %, en formant des polymères de haut poids moléculaire (Dafforn *et al.*, 1999 ; Crowther *et al.*, 2003 ; Dafforn *et al.*, 2004). Ceci est vrai, lorsque la température de traitement thermique dépasse les 65 °C pour l' α_1 -ACT humaine recombinante (Dafforn *et al.*, 1999 ; Gooptu *et al.*, 2000).

Pour ce qui est des deux autres bandes révélées, elles représentent 13,6 et 17,5 % de la quantité totale des protéines. Ce déséquilibre formé entre les monomères et les différentes

formes peut facilement basculer lors de l'augmentation de la concentration en protéines ou lors d'un changement de pH. Ainsi, lorsque nous comparons les bandes révélées par d'autres fractions (figure 37), nous constatons qu'elles n'ont pas polymérisées. Ceci est du peut être à la quantité de protéines misent dans les puits du gel (Tassy *et al.*, 2005) ou bien à l'effet du traitement thermique ou encore à la concentration du détergent (SDS) et le 2-mercaptoéthanol qui n'ont pas été suffisants pour induire le phénomène de polymérisation (d'une manière générale l'agrégation protéique). Des études *in vitro* ont montré que le changement du pH provoque la polymérisation des serpinines (Devlin *et al.*, 2002). Enfin, la polymérisation des serpinines peut également entraîner une réduction de l'activité, voir une perte totale d'activité.

D'autre part, nous avons aussi constaté la formation d'un conformère de 56 kDa au-dessous de la bande de la SERPINA3 présumé être la forme latente (figure 37). Malgré que la SERPINA3 latente est déterminée comme composant mineur dans le plasma humain et un composant major dans le liquide de lavage des poumons chez des patients présentant certaines serpinopathies (Berman *et al.*, 1986 ; Pearce *et al.*, 2010). Par ailleurs, nous signalons, que les serpinines à leur état latent montrent une différence de masse lorsqu'elles sont comparées à la forme native, ou un faible poids moléculaire à cet état a été enregistré (Gooptu *et al.*, 2000 ; Carrell *et al.*, 2008). Ceci est démontré dans notre cas, cependant, nous optons beaucoup plus à la forme latente qu'au conformère δ , qui est difficile à distinguer sans l'utilisation de techniques de pointe tels que les méthodes cristallographiques.

II.4. Electrophorèse bidimensionnelle (2DE) du sérum humain

Dans le but de vérifier la présence des SERPINA3 chez l'humain, car le sérum contient un taux élevé de l' α_1 -ACT (Calvin et Price, 1986 ; Whicher *et al.*, 1991), nous avons réalisé une électrophorèse bidimensionnelle (2DE) du sérum humain. Cette dernière est ensuite analysée par Western blot en utilisant l'anticorps produit chez le lapin dirigé contre la SERPINA3. Le résultat original obtenu (figure 39) est un autre élément de preuve en notre possession montrant un polymorphisme d'inhibiteur dans le sérum humain, dans un intervalle de pH [4 – 7].

Le choix de l'intervalle de pH est justifié, vu qu'à ce jour, le gradient de pH le plus employé, immobilisé ou non, est le pH 4 à 7. Très reproductible et assez tolérant envers la présence d'impuretés, il couvre en général la majorité des besoins de séparation car la plupart des protéines d'un extrait brut s'y trouvent représentées. Ainsi beaucoup d'équipes travaillant

avec la 2DE se sont constituées des bases de données de gels bidimensionnels accessibles sur internet.

De plus, le gel d'électrophorèse obtenu dans World-2DE (figure 40), met en évidence plusieurs isoformes de l'inhibiteur ayant des masses moléculaires qui varient de 57 à 65 kDa. Un résultat proche de ce dernier a été déjà rapporté par Anderson et Anderson (1977) dans un gel 2DE montrant en moins cinq isoformes. Le gel 2DE de la figure 40, nous a permis notamment de confirmer l'hypothèse émise, qu'il existe plus d'un membre de cette serpène du clade A 3. Chaque groupe de même masse moléculaire se divise en un nombre variable de spots séparés sur la base de leur pI et correspondent très vraisemblablement à une même protéine avec des degrés de phosphorylation différents. Ceci démontre la très grande multiplicité des formes de la SERPINA3 qu'il est possible de rencontrer dans d'autres tissus ou fluides humains en particulier.

Nous sommes alors confronté à toute une nouvelle famille de SERPINA3 (probablement multi-génique) constituée d'en moins cinq membres (d'après nos chromatographies et le gel 2DE révélé par Western blot) et la liste n'est pas exhaustive. Mais, nous ignorons toute information sur leur structure, fonction et la capacité inhibitrice de chaque membre. Toutefois, l'amplification par PCR et un sous-clonage moléculaire (analyse génomique) sont suggérés pour pouvoir identifier l'organisation génomique des gènes de la SERPINA3 humaine.

En analysant le gel 2DE illustré sur la figure 39 et révélé par Western blotting du sérum humain, on s'aperçoit clairement qu'il existe plus d'un seul membre. Par contre, il montre l'existence de deux pools majoritaires de spots d'environ 70 kDa et même un peu plus. Quelques spots de faible poids moléculaire inférieur à 20 kDa ont été aussi observés. Nous constatons ainsi, une hétérogénéité (plusieurs espèces protéiques de la même famille) qui est due au sérum contenant des protéines plus au moins phosphorylées et glycosylées. De plus, d'autres protéines peuvent être distinguées aux bordures du gel, ce qui nous laisse suggérer l'expansion de l'intervalle du pH de la première dimension prochainement. Ceci est nécessaire, pour permettre une vue d'ensemble de toutes les espèces protéiques (glycoformes) du sérum révélées par l'anticorps anti-SERPINA3, notamment celles < 20 kDa ou celles se situant entre 30 et 50 kDa.

Par ailleurs, plusieurs rapports sur la structure primaire de l' α_1 -ACT déduite à partir des séquences de l'ADNc ont été très ambigus. La séquence de l'ADNc rapportée par Chandra *et*

al. (1983) a été modifiée deux fois (Hill *et al.*, 1984 ; Rubin *et al.*, 1990). Comparant les séquences obtenues par Chandra *et al.* (1983) et Bao *et al.* (1987) à celle de Rubin *et al.* (1990), quelques différences majeures se révèlent dans la région codante. Ces différences à l'échelle moléculaire reflètent ainsi la présence de plus d'un seul membre de cette protéine, confirmant l'hypothèse émise.

Ces résultats nous procurent une explication partielle aux difficultés rencontrés lors de la mise en place du protocole de purification (activité inhibitrice s'étalant sur tout le chromatogramme). Ils expliquent aussi en partie au moins le fait que diverses formes présentent dans le sérum sont éluées tout au long du gradient de sel y compris lors du lavage avec 1M, ou même à 3 M NaCl (Figure 25). Cette observation donne l'impression qu'il existe un continuum de différentes formes d' α_1 -ACT porteuses d'un nombre de groupements phosphoryles croissant. Ces données sont en outre, une preuve que les phosphorylations sont très probablement impliquées dans la régulation de l'activité de ces serpins.

Enfin, ces résultats laissent présager d'une manière ou d'une autre l'hypothèse émise, de l'existence de plus d'un seul membre de la SERPINA3 dans le sérum humain, mais fort probablement toute une famille multi-génique complexe. Toutefois, un polymorphisme protéique de l' α_1 -ACT vient d'être révélé, en se basant sur les résultats des immunoblotting, chromatogrammes et gels d'électrophorèse 2DE obtenus. Néanmoins, à l'heure actuelle, ces variations observées en fonction des techniques exploitées demeurent non comprises.

III. Identité et caractérisation des propriétés physicochimiques et inhibitrices de la SERPINA3 humaine purifiée

III.1. Détermination de la masse moléculaire

Les modifications chimiques covalentes par fixation de groupements glycosylés sur les résidus asparagine (*N-glycosylation*) le plus souvent ou sur les résidus sérine ou thréonine (*O-glycosylation*) (Haltiwanger et Lowe, 2004) ou encore de groupements phosphore sur des résidus tyrosine ou sérine sont appelées modifications post-traductionnelles (MPT). Les MPT incluent l'agrégation des protéines, l'oxydation des méthionines, la désamination de l'asparagine et dans une moindre mesure celle de la glutamine, l'ajout de lipides, la protéolyse, la glycosylation et la sulfatation des protéines (Walsh et Jefferis, 2006).

La glycosylation est alors l'une des MPT la plus répandue. Elle modifie les propriétés physico-chimiques des protéines (solubilité, stabilité et conformation). Les oligosaccharides sont fixés par liaison covalente sur la protéine. Certaines séquences peptidiques particulières sur la protéine semblent favoriser les glycosylations, elles sont appelées séquences consensus. Quant aux serpins, au niveau structural, leur majorité sont des glycoprotéines contenant un ou plusieurs oligosaccharides (Silverman *et al.*, 2001).

Nous avons déterminée la masse moléculaire de la SERPINA3 humaine par méthode électrophorétique en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide à 12 %. L'estimation est réalisée en utilisant des protéines recombinantes étalons dont les masses moléculaires varient de 10 kDa à 250 kDa (voir Matériel et Méthodes) et en comparant le déplacement relatif des inhibiteurs purifiés avec ces protéines de référence.

Nous pouvons ainsi tracer une courbe du déplacement relatif de chacune de ces protéines en fonction de leur masse moléculaire (figure 41). L'équation de la droite permet ensuite de calculer la masse moléculaire des inhibiteurs purifiés.

L'analyse électrophorétique en conditions dénaturantes des serpins A3 purifiées, a montrée la présence de plusieurs protéines qui migrent différemment même qu'elles sont présumées avoir des masses proches. Nous révélons par exemple une bande à 63 kDa et une bande à 51 kDa respectivement pour les deux fractions 12 et 13 (figure 32). Nous avons choisis à titre d'exemple ces deux fractions, et les valeurs obtenues indiquent que les inhibiteurs purifiés sont des serpins glycosylées. Cette constatation est vraie, si nous les comparons au poids moléculaire théorique calculé ou à celui de l' α_1 -ACT recombinante du

commerce (produite chez les procaryotes) de ~48kDa, qu'il soit par certaines études (Chandra *et al.*, 1983 ; Rubin *et al.*, 1990) ou par l'interrogation des bases de données protéiques (Uniprot par exemple).

L'analyse par SDS/PAGE a aussi montrée pour certaines fractions (26, 28, 30 et α_1 -ACT) chargées dans les puits, un poids moléculaire de 112 kDa (figure 28). En revanche, seulement deux bandes ont été obtenues dans des conditions non dénaturantes pour d'autres fractions. De plus, d'autres bandes de faibles poids moléculaires sont déterminées aussi dans d'autres gels, pour les fractions 43 et 12 révélées par Western blot (figure 37). Enfin, le poids moléculaire moyen déterminé pour la SERPINA3 native dans l'ensemble des gels et Western blot réalisés au cours de notre étude est de 61 ± 4 kDa.

III.2. Identité de l'inhibiteur par Western blot avec l'anticorps polyclonal dirigé contre la serpine bovine présentant 75 % d'identité

Afin de visualiser les différentes formes de la SERPINA3 humaine purifiées du sérum Stdf, nous avons utilisé la technique d'immunodétection par Western blotting après une SDS-PAGE. En utilisant cette technique, nous avons testé quelques fractions ayant des activités inhibitrices importantes et éluées durant les différentes étapes chromatographiques.

Cette technique, plus lourde à mettre en œuvre que la précédente, permet de caractériser plus précisément la spécificité des anticorps. La séparation des protéines sur gel de polyacrylamide, suivie du transfert de celles-ci sur une membrane PVDF permet de détecter des quantités très faibles de protéines, de l'ordre du nanogramme. A la différence de la précédente technique, celle-ci est basée sur la spécificité (reconnaissance) d'un anticorps dirigé contre la protéine cible ou d'intérêt.

L'anticorps anti-BovSERPINA3 utilisé, fait chez le lapin a été produit contre certaines isoformes de la famille des serpinines A3 bovines et présentant 75 % d'identité contre la SERPINA3 humaine comme décrit par Dutaud *et al.* (2002). La spécificité de l'anticorps polyclonal dirigé contre la SERPINA3 bovine et exploité dans le cadre de ce travail, a été analysé en utilisant les différentes fractions inhibitrices purifiées. L'anticorps a été utilisé à une dilution de 1: 500 dans l'ensemble des tests.

Les résultats des analyses avec l'anticorps anti-SERPINA3 bovine sont présentés sur les figures 24C, 26B, 28B, 32 et 35. Les résultats obtenus par Western-blot montrent que l'anticorps révèle différentes bandes, suggérant de grandes similitudes de séquences avec les

serpines A3 bovines. Il semble que la protéine majoritaire (SERPINA3) qui est reconnue dans certaines fractions n'est plus présente dans d'autres fractions puisqu'on ne retrouve pas les mêmes protéines avec les mêmes masses. C'est grâce à ces analyses d'immunodétection que nous avons montré l'existence de plusieurs formes de l'inhibiteur purifié. Ceci a été déjà discuté ci-dessus, notamment dans la partie du polymorphisme protéique et conformationnel.

Les protéines du sérum humain ont été aussi séparées, premièrement en fonction de leur potentiel isoélectrique puis en fonction de leur masse moléculaire puis une immunodétection a été réalisée en utilisant le même anticorps polyclonal dirigé contre la SERPINA3 bovine. L'analyse avec cet anticorps a été représentée à la figure 39.

L'anticorps a révélé plusieurs groupes de spots avec des pI compris entre 4,8 et 7,0. Sur la base de la masse moléculaire nous distinguons clairement quatre groupes de spot. Chaque groupe de même masse moléculaire se divise en un nombre variable de spots séparés sur la base de leur pI et correspondant très vraisemblablement à une même protéine avec des degrés de phosphorylation, de glycosylation, ou de sialylation différents.

Ceci démontre la très grande multiplicité des formes de serpines A3 qu'il est possible de rencontrer dans les tissus humains et dans le sérum en particulier. Ces résultats nous élucident en partie au moins le fait que diverses formes présentent dans le sérum sont éluées tout au long du chromatogramme et notamment au gradient de sel y compris lors du lavage avec 1 M NaCl.

III.3. Identité par spectrométrie de masse

Pour connaître l'identité d'une protéine donnée, plusieurs possibilités s'offrent à nous. Si nous excluons les protocoles de purification biochimiques, longs et fastidieux, et que nous nous intéressons à des protéines issues simplement d'une séparation sur gel d'acrylamide, deux techniques principales sont disponibles. Le micro-séquençage selon la méthode d'Edman et la recherche d'empreinte peptidique par spectrométrie de masse.

La première méthode permet de séquencer une protéine entière mais elle est très gourmande en échantillon et en réactif. La seconde, est très largement utilisée dans divers domaines. Elle autorise la mesure précise de masses moléculaires, c'est donc l'orientation que nous avons choisie car plus appropriée dans le cadre de l'identification de protéines.

Pour confirmer l'identité de la SERPINA3 purifiée et identifiée dans certaines bandes par immunoblotting, la bande protéique est excisée du gel coloré au nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie R250, puis soumise à la digestion trypsique et le mélange a été analysé ensuite par MALDI-TOF/MS. L'empreinte peptidique massique illustrée sur la figure 42 (A) de l'une des bandes identifiée, montre que les peptides produits se sont assortis intensivement avec la séquence de l' α_1 -ACT. Les 12 peptides identifiés couvrent environ 37 % de la séquence totale et 39 % de la protéine mature. De ces derniers, sept peptides identifiés se sont assortis avec la région C-terminale de la protéine, y compris une grande partie de la boucle réactive (RCL) et le site de clivage P1-P1' (entre Leu³⁸³ et Ser³⁸⁴) indiqué sur la figure 42 (B) par une flèche dans la séquence soulignée (P15-P15') du RCL (Gettins, 2002). Le reste des peptides ont été localisés dans le second tiers de la séquence (centre de la séquence) et un seul peptide dans le premier tiers (séquence N-terminale) (Figure 42 A).

En outre, la glycosylation, la phosphorylation ou la sialylation de la protéine expliquent probablement la différence de la masse moléculaire indiquée pour la protéine purifiée sur le gel SDS/PAGE de 61 kDa (masse moyenne) par rapport à celle de la séquence d'acides aminés calculé de 47,621 kDa. Ceci, a impliqué un changement structural de la protéine en apportant probablement des modifications en termes de solubilité, charge électrique, masse, taille et viscosité. Par exemple, l'addition d'acide sialique n'augmente pas seulement la taille et la masse de la protéine mais modifie également sa charge et sa solubilité.

Après avoir identifié la séquence de la SERPINA3 humaine, nous avons réalisé un algorithme d'alignement multiple (figure 43) des séquences protéiques de la famille des serpins A3 bovines (bovSERPINA3-1 – A3-8) (Pélissier *et al.*, 2008) et humaine par l'algorithme de ClustalW2. Nous constatons à partir de l'arbre phylogénétique (figure 44) déduit du précédent alignement, que la SERPINA3 humaine présente une identité élevée avec les deux serpins homologues bovSERPINA3-7 et A3-8, tout en formant un clade à part possédant les mêmes distances. Nous avons trouvé que l' α_1 -ACT possède une homologie de séquence de 62 et 64 % d'identité avec les deux serpins bovines bovSERPINA3-7 et A3-8 respectivement. De plus, elle possède des caractéristiques qui la laissent figurer parmi les endopines 1B, ancienne nomenclature utilisée pour désigner les SERPINA3 isolé du muscle bovin (Tassy *et al.*, 2005 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006a). Par ailleurs, les valeurs d'identité les plus basses ont été trouvées avec les bovSERPINA3-4 et A3-3 avec 56,7 % et 56,9 % d'identité respectivement.

Des différences principales (31 % de similitude) entre les séquences primaires ont été trouvées dans la boucle réactive (RCL) contenant l'emplacement réactif P1-P1' responsable de la spécificité de la serpine. En outre, nous avons réalisé un alignement de quelques boucles réactives (figure 45), en choisissant la SERPINA3 humaine, les deux serpines bovines les plus homologues (bovSERPINA3-7 et A3-8), ainsi que la SERPINA1 et SERPINA8. Ceci a été réalisé pour pouvoir indiquer l'identité inhibitrice de notre inhibiteur. Mais aussi pour montrer la différence qui peut exister entre les serpines inhibitrices (notre inhibiteur) et les serpines non inhibitrices d'une part, et de caractériser la similitude avec les deux serpines bovines. D'après la figure 45, notre inhibiteur détient une fonction inhibitrice en possédant un résidu caractéristique de thréonine (T) conservé à la position P14 dans la partie C-terminale du RCL. Naturellement, les serpines non inhibitrices tel que la SERPINA8 (Angiotensinogène) qui a été rajoutée à titre comparatif possèdent un arginine (R) à cette position. Le même alignement réalisé (figure 45) entre la SERPINA3 humaine et bovSERPINA3-7 et A3-8 montre 36,66 % de similitude dans leur RCL.

III.4. Propriétés inhibitrices de la serpine purifiée vs certaines peptidases à sérine

En raison des contraintes de temps et de l'impossibilité de purifier et de caractériser correctement l'ensemble des différentes glycoformes de la famille des SERPINA3 humaines évoquées ci-dessus, l'étude de la relation entre le profil de glycosylation de ces serpines et leur efficacité inhibitrice demeure encore inconnue. Pour cela, nous avons considéré durant cette étude et comme seule forme, la SERPINA3 humaine identifiée en interrogeant les bases de données. Même qu'il a été déjà rapporté que la glycosylation pour l' α_1 -ACT recombinante produite chez les procaryotes, n'est pas essentielle pour son activité inhibitrice (Rubin *et al.*, 1990). Cependant, nous ne possédons pas assez d'informations sur les autres membres constituant cette famille complexe d'inhibiteurs.

Pour tester si l' α_1 -ACT purifiée conserve son activité inhibitrice, elle a été testée pour sa capacité inhibitrice contre la chymotrypsine. Différentes quantités de la serpine purifiée ont été alors incubées avec 5 nM de la chymotrypsine bovine. Ainsi, la caractérisation inhibitrice vis-à-vis d'autres peptidases à sérine a été réalisée, en ciblant deux autres enzymes à savoir, la trypsine pancréatique bovine et l'élastase du leucocyte humain (HLE, pour *Human Leucocyte Elastase*). Pour l'affinité enzymatique de l'inhibiteur purifié, des fractions seules ou en mélange contenant la SERPINA3 humaine ont été testées. Le test d'inhibition est effectué selon une gamme de concentration, en incubant une quantité d'enzyme constante [E] avec

différentes quantités (volume) d'inhibiteur [I] (voir détails dans la partie Matériel et Méthodes). L'activité résiduelle de l'enzyme est ensuite exprimée en pourcentage par rapport à un témoin incubé dans les mêmes conditions, mais dans lequel le volume de la solution inhibitrice à tester est remplacé par la même quantité du tampon respectif à l'enzyme testée. Les résultats illustrés sous forme de courbes d'activités résiduelles sont rapportés dans des figures séparées (figure 46). Les résultats sont exprimés en moyennes pour l'ensemble des fractions testées avec les différentes peptidases testées.

Signalons que les peptidases à sérine catalysent le clivage des liaisons peptidiques après le résidu « Ser ou S » (Hedstrom, 2002) et utilisent différentes stratégies pour générer une attaque nucléophile dans le site du clivage du peptide cible (Chapman *et al.*, 1997). Le site du clivage de la peptidase est généralement utilisé pour prédire le profil d'inhibition d'une serpine. Ainsi, les peptidases à sérine peuvent être subdivisées en groupes basés sur leur spécificité au substrat. Les chymotrypsine-like qui clivent après des résidus non polaire et aromatique comme la Leu ou Phe. Les trypsine-like ont une préférence aux résidus chargés et basiques tel que l'Arg et Lys, alors que l'élastase a une affinité aux petits résidus non polaire comme l'Ala et Val et peut notamment cliver après des résidus polaire de Met et Cys (Perona et Craik, 1995 ; Hedstrom, 2002).

Les différents résultats obtenus concernant les tests d'inhibitions des différentes peptidases à sérine testées, ont montré une forte et unique inhibition pour la chymotrypsine. Alors que les deux autres peptidases : la trypsine et l'élastase n'ont pas été inhibées. Ces résultats corroborent à ceux rapportés par certains auteurs. Ces derniers ont trouvé que l' α_1 -ACT humaine inhibe et forme des complexes stables avec la chymotrypsine pancréatique et la chymotrypsine des cellules mastocytes (Travis *et al.*, 1978 ; Beatty *et al.*, 1980 ; Mast *et al.*, 1991 ; Lomas *et al.*, 1995b). Tandis que, aucune inhibition de la trypsine pancréatique ou de l'élastase ne peut être démontrée (Lomas *et al.*, 1995b ; Travis et Salvesen, 1983).

Sur la figure 46 (A), nous constatons que la courbe d'inhibition de la chymotrypsine forme une ligne de régression droite jusqu'à 4 μ l de SERPINA3 rajoutée. A ce même volume de SERPINA3, environ 75 % de l'activité de la chymotrypsine est perdue. Ce résultat se compare favorablement à ceux obtenus par différents auteurs en utilisant des protocoles de purification (cités dans Matériel et Méthodes) différents au notre (Abdullah *et al.*, 1983 ; Frost *et al.*, 1997 ; Manolov *et al.* 2008). Puis la courbe continue à chuter progressivement pour former un palier qui se stabilise à 20 % de l'activité résiduelle, représentant 81 % d'inhibition

pour un volume de 40 μ l (figure 47-E). Tandis que, nous n'avons pas enregistré une perte d'activité $> 81\%$. Cela est du probablement à la dissociation spontanée (vu que nous avons travaillé à température ambiante) du complexe SERPINA3/chymotrypsine (voir détails sur la figure 15) lorsque le mélange est réalisé en présence d'un excès d'inhibiteur (Laine *et al.*, 1984). Probablement, l'enzyme se recycle après dissociation, puis elle devient capable à s'attacher de nouveau sur une autre molécule de l'inhibiteur libre (voir schéma illustré sur la figure 15). Ce même phénomène de dissociation avec un recyclage de l'enzyme, a été déjà décrit pour le complexe SERPINC1 (AT-III)-trypsine (Wong *et al.*, 1982). Par ailleurs, si nous comparons nos résultats aux bovSERPINA3, nous constatons que ces dernières affectent modérément l'activité de la chymotrypsine (Tassy *et al.*, 2005). Quoique peu d'informations soient aujourd'hui connues sur ses fonctions physiologiques, l' α_1 -ACT humaine est reconnue être un inhibiteur des peptidases de type chymotrypsine-like, spécifiquement la cathepsine G et la chymase (Beatty *et al.*, 1980 ; Reilly *et al.*, 1982 ; Travis et Salvesen, 1983). Néanmoins, le mécanisme d'action est similaire à celui des autres serpinés déjà décrit, et l' α_1 -ACT forme en principe des complexes équimolaires avec ses peptidases cibles.

En outre, les résultats obtenus pour la trypsine et l'élastase confirment ce qui a été déjà rapporté (Travis *et al.*, 1978). Nous n'avons pas obtenu d'inhibition pour la trypsine (figure 46 B et E), un résultat attendu, sauf une légère perte d'activité qui est dû probablement à une infime contamination par l' α_1 -AT. Quant à l'élastase du leucocyte humain, une faible inhibition ou perte d'activité de 20 % est enregistrée (figure 46-C). Un tel résultat n'est pas vraiment représentatif, mais, il nous oriente aussi à penser au rapport enzyme/inhibiteur (E/I), qui peut dans de ce cas influencer probablement l'effet d'inhibition. Signalons qu'il a été déjà rapporté dans plusieurs travaux pour certains couples de peptidases/serpinés, que le rapport E/I doit être très élevé (largement > 3) pour avoir une inhibition (Björk et Fish, 1982 ; Rubin *et al.*, 1990). Néanmoins, une légère inhibition de l'élastase du neutrophile humain et pancréatique porcine est enregistrée en augmentant les rapports E/I (Rubin *et al.*, 1990, Frost *et al.*, 1997). Cependant, une autre étude réalisée par Davril *et al.*, (1987), a montrée que l'inhibiteur est capable d'inhiber l'élastase 2 du pancréas humain par un rapport équimolaire (1 :1, entre E/I). Un tel résultat n'est pas supporté par plusieurs auteurs, ou nous ne trouvons presque pas des articles confirmant cette fonction anti-élastase chez l' α_1 -ACT

Enfin, lorsqu'on se compare aux résultats obtenus pour les bovSERPINA3 (leur homologues isolés du muscle bovin), ces dernières par contre inhibent fortement la trypsine et l'élastase du leucocyte humain (Tassy *et al.*, 2005).

IV. Implication probable de la SERPINA3 dans la régulation de l'apoptose et conséquences

IV.1. Inhibition de la peptidase apoptogène « caspase 3 »

Les peptidases à cystéine peuvent être regroupées en deux groupes, la famille des caspases et la famille des papain-like (Chapman *et al.*, 1997). Celles du premier clivent leurs substrats après le résidu « Asp ou D » et participent à une des distinctes voies : l'activation des cytokines proinflammatoires et l'initiation de la mort cellulaire par apoptose (Salvesen et Dixit, 1997). Bien que les serpins soient, en premier lieu, des inhibiteurs de peptidases à sérine, certaines sont également capables d'inhiber les peptidases à cystéine. Ce phénomène est décrit sous le terme d'inhibition croisée ou « *cross-class inhibition* », qui a été déjà élucidé par plusieurs études (Schick *et al.*, 1998a ; Hwang *et al.*, 2002 ; Hwang *et al.*, 2005 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2009).

L' α_1 -ACT a été largement étudiée pour ses propriétés biochimiques comme étant un inhibiteur de sérine peptidases, néanmoins certaines autres fonctions au niveau de l'organisme peuvent être rencontrées. Il est aussi connu qu'elle est impliquée dans plusieurs autres processus, quoique son rôle et importance dans certaines circonstances particulières n'est pas tout à fait claire. En ce qui est de sa capacité inhibitrice des peptidases à cystéine, peu de peptidases cibles sont connues. A l'exception de l'inhibition de la Prohormone Thiol Protéase (PTP) (Hook *et al.*, 1993) et de la staphopaine C (Wladyka *et al.*, 2011), notre étude est la première à démontrer une inhibition croisée exprimée pour la caspase 3 (cystéine peptidase) par la SERPINA3 humaine (figure 46 D et E). Tandis que, l'inhibition des caspases initiatrices et exécutrices par les SERPINA3 bovines (A3-1 et A3-3) a été très récemment démontrée (Herrera-Mendez *et al.*, 2009). Cette dernière étude s'ajoute à la seule serpine connue pour sa capacité à inhiber spécifiquement les caspases et qui est une serpine d'origine virale dénommée CrmA pour *Cytokine Response Modifier A* (Ray *et al.*, 1992). Nonobstant, peu de serpins ont été rapportées à inhiber les caspases jusqu'à ce jour.

Quant aux cellules de mammifères, les seuls inhibiteurs connus des caspases font tous partie de la famille des inhibiteurs d'apoptose ou IAP pour *Inhibitor of Apoptosis Proteins*. En fait, il ne s'agit pas de véritables inhibiteurs puisqu'ils n'interagissent pas, comme le font tous les inhibiteurs de peptidases connus à ce jour, avec les acides aminés responsables de la catalyse de l'hydrolyse des liaisons peptidiques et situées dans le site actif des enzymes (figure 47).

De plus, au cours du processus apoptotique, les mitochondries vont subir des altérations profondes et libérer dans le cytosol, des IAP qui vont dissocier les complexes caspases/IAP déjà formés. Ceci rend peut-être le système IAP moins efficace dans l'inhibition de l'apoptose ou d'une inflammation déclarée. Tandis que, l'inhibition irréversible et le changement de conformation des protéines associées dans le complexe (peptidase/serpine) permet une régulation très fine des peptidases et de ce fait pourrait offrir un avantage sélectif aux serpines (Huntington, 2006). Ainsi, ceci nous incite à chercher d'autres inhibiteurs (de type serpine) potentiels et efficaces *in vivo* des caspases.

Si nous nous intéressons au processus de mort cellulaire par apoptose, nous pouvons ainsi essayer de préciser le rôle potentiel de ces dernières dans l'apoptose, en testant l'évolution de leur activité enzymatique en présence de notre inhibiteur. Les résultats illustrés sur les figures 46 D et E montrent bien une perte d'activité de la caspase 3, une peptidase apoptogène exécutive d'apoptose. La courbe de l'activité résiduelle (figure 46 D) chute en suivant une ligne droite dès l'ajout de 10 μ l de la fraction inhibitrice de la SERPINA3, en gardant près de 70 % de son activité, puis trois arcs de régression (I, II et III) se distinguent sur la courbe, chacun caractérisé par une inhibition progressive jusqu'à la fin de la courbe. Au dernier point de la gamme, 220 μ l de l'inhibiteur sont additionnés et on constate que l'inhibiteur ne conserve que 42 % de son activité. D'après l'allure de la courbe, on conclut que la balance SERPINA3/caspase 3 n'est pas suffisante pour induire une inhibition totale de la caspase 3. De plus, pour atteindre une inhibition de 50 %, un volume de 200 μ l en inhibiteur est nécessaire. Probablement, la molarité de la caspase 3 préparée (5 nM) était très élevée, et une concentration de 2 nM sera peut être plus adéquate pour mieux vérifier l'efficacité inhibitrice par la SERPINA3 en utilisant la même gamme. Par ailleurs, sur la figure 46 (E) nous distinguons deux histogrammes montrant l'inhibition de la caspase 3 à deux différents volumes. Le premier volume à 40 μ l de SERPINA3 comparable à la même gamme des peptidases à sérine testées et le second à 220 μ l, représentant le volume maximal que nous pouvons rajouter dans le puits de la microplaque de 96 puits pour mesurer l'activité enzymatique de la caspase3.

En outre, il est connu que la boucle d'inhibition (RCL) joue un rôle central dans les interactions serpine-peptidases. En plus, la longueur de la séquence du RCL est critique pour produire la tension correcte pour enlever le résidu cystéine actif dans la triade catalytique de la peptidase apoptogène. Cependant, la longueur accrue du RCL diminue la force exercée sur

le résidu actif et une perte d'inhibition de cette dernière (Zhou *et al.*, 2001 ; Gettins, 2002a). Cette constatation peut être la raison de la faible inhibition caspasiqne obtenue.

En plus de ce que nous avons développé, il a été rapporté que la séquence du RCL englobe environ 17 résidus d'acides aminés (Gettins, 2002a) à partir du pont de clivage (figure 42-B). Tandis que, nous constatons quelques exceptions, en comparant la séquence du RCL de l' α_1 -ACT à ce qui a été décrit pour les serpinines pour inhiber la caspase 3 dans notre cas. Ainsi, la question qui se pose, quel est le résidu P1 cible de cette peptidase ? Alors qu'en regardant dans la partie C-terminale du RCL de la SERPINA3 (figure 42-B), uniquement un seul résidu d'aspartate « Asp ou D » (en vert et souligné en noir) situé à P24' selon Schechter et Berger (1967) est distingué. Pour répondre à la loi des serpinines, il doit être accepté que les caspases puissent cliver après d'autres résidus que celui d'Asp, une propriété qui n'a jamais été démontrée pour les caspases. La même question a été déjà posée et rapportée pour les bovSERPINA3-1 et A3-3 (Herrera-Mendez *et al.*, 2009). De plus, le résidu D se situe dans la même position que les bovSERPINA3 lorsque un alignement multiple est réalisé (figure 43), à l'exception de la bovSERPINA3-7 qui possède un résidu « Glu ou E ». Toutefois, une clarification de ce résultat inhabituel exige d'autres investigations plus détaillées, et probablement l'analyse cristallographique aux rayons X (*X-ray analysis*) de la structure native de la serpine et en complexe avec la caspase éclaircira le problème.

IV.2. Implication des SERPINA3 humaines dans le processus apoptotique

Selon la nature du stimulus qui déclenche la mort cellulaire par apoptose, on distingue deux voies d'activation de ce processus : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (figure 05 et 47). Dans la première voie, le stimulus déclencheur de l'apoptose est d'origine extracellulaire. Il s'agit d'un ligand qui va venir se fixer sur le récepteur de mort (*Death Receptor*). La fixation de ce ligand au récepteur va déclencher l'activation des complexes transmembranaires capables d'activer les procaspases initiatrices (caspases 8 et 10) en caspases actives qui vont, à leur tour, activer, par protéolyse ménagée, les procaspases effectrices (caspase 3, 6 et 7) en caspases actives. Ces dernières vont ensuite initier la dégradation des structures cellulaires et la mort de la cellule (Ouali *et al.*, 2006a).

Alors que la seconde voie est déclenchée par la cellule elle-même lorsque celle-ci se trouve dans des conditions difficiles de survie et où la mort cellulaire est la seule échappatoire. L'initiation du processus est le résultat d'une altération profonde des mitochondries qui vont libérer des activateurs d'apoptose similaires à ceux qui interviennent

dans la voie extrinsèque. C'est le cas en particulier du cytochrome c qui est indispensable à la formation de l'apoptosome (complexe impliquant le Cyt C, l'Apaf-1 (*Apoptose Activating Factor-1*) et la procaspase 9) et d'autres constituants à activité proapoptotique. Une fois activée, la caspase 9 va à son tour activer les procaspases exécutrices en caspases actives (Ouali *et al.*, 2006a).

Comme cela est indiqué sur la figure 47, la SERPINA3 va s'intercaler probablement à tous les stades du processus en participant au contrôle des activités des caspases initiatrices (caspases 8, 9 et 10) et des caspases exécutrices (caspases 3 en particulier, 6 et 7). Leur aptitude à inhiber de façon pseudo-irréversible les caspases va en faire des acteurs de tout premier plan pour bloquer le processus apoptotique et, par voie de conséquence, elles peuvent jouer un rôle important dans les processus de cancérisation qui ont en commun, l'immortalisation et la prolifération rapide des cellules malignes. Même si l'inhibition de toutes les caspases par les SERPINA3s ne soit pas encore démontrée, il est probable que, du fait du polymorphisme observé au sein de ce groupe de serpinines (résultats présentés ci-dessus), l'un ou l'autre des différents membres de cette famille auront la possibilité d'inactiver l'une ou l'autre des caspases.

CONCLUSION

Ce travail avait pour objectif la purification et la caractérisation d'un inhibiteur de sérine et cystéine peptidases du clade A3 des serpinines, la SERPINA3, présumée être un inhibiteur spécifique de la peptidase apoptogène, la caspase 3, en comparaison à son homologue bovin, bovSERPINA3. Pour ce faire, nous avons développé un nouveau protocole de purification à partir du sérum humain. Le protocole débute par une première étape de fractionnement afin d'obtenir une fraction enrichie en SERPINA3 (α_1 -ACT) par précipitation au sulfate d'ammonium entre 50 et 80 % de saturation, suivi d'une série de quatre étapes chromatographiques. Ces dernières ont été réalisées sur deux supports chromatographiques, le Cibacron Blue F3G-A et un ammonium quaternaire fixés sur deux colonnes respectives, la HiTrap Bleu 5 ml HP et la Q-Sépharose FF. Enfin, le protocole de purification décrit, nous a permis d'obtenir notre inhibiteur sous sa forme active, révélant ainsi des bandes variable de 61 ± 4 kDa par une SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide à 12%.

De plus, nous avons montré pour la première fois, l'existence de plusieurs isoformes ou glycoformes de la SERPINA3 dans le sérum humain. Ceci est obtenu, même que le polymorphisme protéique de la SERPINA3 semble être tissu spécifique pour certains auteurs ou en association à quelques résidus de sa séquence peptidique pour d'autres. Aujourd'hui, nous venons de mettre en évidence à travers cette étude que l'inhibiteur englobe possiblement toute une famille multi-génique. En outre, le profil des activités inhibitrices obtenu après une chromatographie d'affinité montre que l'effet inhibiteur des différentes formes éluées est variable et s'étalent sur l'ensemble du chromatogramme. Ainsi, la réalisation d'une chromatographie échangeuse d'anions, a permis de confirmer et de caractériser en moins cinq isoformes inhibitrices de la protéine.

Pour mieux caractériser ces différentes isoformes, nous avons fait recours à des techniques électrophorétique et immunochimique par western blot. Les poids moléculaires calculés pour les protéines sur la base de leur profil électrophorétique et surtout celles révélées par immunoblotting, varient de 57 à 65 kDa. Ces variations se confirment fort possiblement par la différence de glycosylation de la protéine, dont 25 à 26% de sa masse sont occupés par des hydrates de carbone de type N-glycannes. Les différents Westerns blotting réalisés, nous ont aussi permis de mettre en évidence l'existence d'un polymorphisme conformationnel de la SERPINA3, soit par la formation de dimères ou polymères, soit par l'adoption probable de la conformation delta ou fort probable la forme latente (composant mineur dans le sérum humain) caractérisée par l'insertion prématurée du RCL dans le feuillet β A.

Le gel 2DE révélé par l'anticorps anti-bovSERPINA3, nous a permis notamment de confirmer l'hypothèse émise, qu'il existe plus d'un membre de cette serpine du clade A3. Chaque groupe de même masse moléculaire se divise en un nombre variable de spots séparés sur la base de leur pI et correspondent très vraisemblablement à une même protéine avec des degrés de phosphorylation et/ou de glycosylation différents. Tandis que, nous ignorons toute information sur leur structure, fonction et la capacité inhibitrice de chaque membre. Toutefois, l'amplification par PCR et un sous-clonage moléculaire sont suggérés pour pouvoir identifier l'organisation génomique des gènes de la SERPINA3 humaine. Néanmoins, à l'heure actuelle, ces variations observées en fonction des techniques exploitées demeurent non comprises. Alors que, la spécificité de l'anticorps polyclonal dirigé contre les bovSERPINA3 et testé contre les différentes fractions inhibitrices purifiées confirme l'identité des inhibiteurs et leur appartenance aux serpines du clade A3.

Nous avons aussi réalisé une spectrométrie de masse sur MALDI-TOF et LC-MS/MS et l'empreinte peptidique massique montre que les peptides produits se sont assortis intensivement avec la séquence de l' α_1 -ACT. Les 12 peptides identifiés couvrent environ 37% de la séquence totale et 39 % de la protéine mature. Ainsi, l'arbre phylogénétique obtenu après un alignement multiple sur ClustalW2 montre que la SERPINA3 humaine présente une identité élevée (62 et 64 %) avec les deux serpines homologues bovSERPINA3-7 et A3-8 respectivement, et qui sont englobées dans un même clade.

L'activité inhibitrice de nos inhibiteurs contre les peptidases à sérine, ont montré une forte et unique inhibition pour la chymotrypsine. Alors que les deux autres peptidases testées, la trypsine et l'élastase n'ont pas été inhibées. Ces résultats corroborent à ceux rapportés par plusieurs auteurs. Cependant, lorsque nos résultats sont comparés aux résultats obtenus sur leur homologues bovin (bovSERPINA3), ces dernières en revanche inhibent fortement la trypsine et l'élastase du leucocyte humain (Tassy *et al.*, 2005).

En ce qui est de sa capacité inhibitrice des peptidases à cystéine, peu de peptidases cibles sont connues. A l'exception de l'inhibition de la Prohormone Thiol Protéase (PTP) (Hook *et al.*, 1993) et de la staphopaine C (Wladyka *et al.*, 2011), notre étude est la seule à démontrer une inhibition croisée exprimée pour la caspase 3 par la SERPINA3 humaine. Tandis que, l'inhibition des caspases initiatrices et exécutrices par leur homologues bovin (bovSERPINA3-1 et A3-3) a été très récemment démontrée (Herrera-Mendez *et al.*, 2009). Cette dernière étude s'ajoute à la seule serpine connue pour sa capacité à inhiber

spécifiquement les caspases et qui est une serpine d'origine virale dénommée CrmA pour *Cytokine Response Modifier A* (Ray *et al.*, 1992).

Pour conclure, même si les résultats obtenus lors de cette étude suggèrent que la SERPINA3 humaine peut inhiber la caspase 3, il apparaît qu'elle ne semble pas aussi efficace que les SERPINA3 bovines à inhiber la caspase 3 où ces dernières l'inhibent très fortement (> 90 %). Néanmoins, l'hypothèse de l'implication de la SERPINA3 humaine dans la mort cellulaire programmée n'est pas à exclure et comme il a été indiqué, la SERPINA3 va s'insérer probablement à tous les stades du processus en participant au contrôle des activités caspasiques.

Cette étude ouvre la porte à d'autres études complémentaires visant la recherche d'autres serpines inhibitrices des caspases chez l'homme et leur identification. Des serpines pouvant être du clade A3 (des isoformes de la SERPINA3 fortement inhibitrices de la caspase 3) ou non, notamment avec les récents résultats obtenus au laboratoire lors de mon dernier séjour ou les activités inhibitrices anti-caspase 3 et anti-chymotrypsine testées ont l'air d'être très opposantes après un fractionnement sur une colonne échangeuse d'anions (figure 48). Nous remarquons bien, qu'après l'élution du grand pic ayant l'activité antichymotrypsine, c'est l'activité anti-caspase 3 qui s'installe. Concernant l'identité de l'inhibiteur incriminé des études en cours sont mises en place. En outre, la réalisation des constantes d'associations et la formation des complexes avec les différentes peptidases déjà testées (sérine et cystéine peptidases) est l'une des priorités que nous envisageons dans l'avenir.

Enfin, la nécessité de produire cette protéine par génie génétique chez un microorganisme eucaryote afin de comprendre son mécanisme d'action sur les caspases, enzymes polymérique est envisageable dans l'avenir. De plus, la production de la SERPINA3 humaine recombinante est indispensable pour servir d'étalon à un dosage sanguin ou tissulaire par un test ELISA. Cette dernière constituera un étalon de choix indispensable pour ces dosages.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

« A »

Abdullah, M. Siddiqui, A.A. Hill, J.A. et Davies, R.J.H. (1983). The purification of α_1 -antichymotrypsin from human serum using DNA-cellulose chromatography. *Archives Biochem Biophys* **225** (1) : 306 – 312.

Abraham, C.R. (2001). Reactive astrocytes and alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **22**, 931.

Adams, V., Gielen, S., Hambrecht, R. et Schuler, G. (2001). Apoptosis in skeletal muscle. *Front Biosci.*, 6, D1-D11.

Adrian, C. et Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 390 – 397.

Ahmed, N., Barker, G., Oliva, K., Garfin, D., Talmadge, K., Georgiou, H., Quinn, M., et Rice, G. (2003). An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum, *Proteomics*, **3** : 1980–1987.

Akaaboune, M., Hantai, D., Smirnova, I., Lachkar, S., Kapsimeli, M., Verdere-Sahuque, M. & Festoff, B. W. (1998). Developmental regulation of the serpin protease nexin I, localisation during activity dependent polyneuronal synapse elimination in mouse skeletal muscle. *J. Comp. Neurol.*, **397**, 572 – 579.

Akaaboune, M., Verdere-Sahuque, M., Lachkar, S., Festoff, B. W. & Hantai, D. (1995). Serine proteinase inhibitors in human skeletal muscle: expression of beta-amyloid protein precursor and alpha1-antichymotrypsin *in vivo* and during myogenesis *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, **165**, 503 – 511.

Allgayer, H., R. Babic, K. U. Grutzner, B. C. Beyer, A. Tarabichi, F. W. Schildberg et M. M. Heiss (1998). Tumorassociated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns. *Clin Exp Metastasis*, **16**, 62 – 73.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., et al. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.

Anderson, L. et Anderson, N.G. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins (genetic variants/polymorphism/genetic screening). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, (12) : 5421 – 5425.

Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223 – 230.

Annand, R. R., Dahlen, J. R., Sprecher, C. A., de Dreu, P., Foster, D. C., Mankovich, J. A., Talanian, R. V., Kisiel, W. et Giegel, D. (1999). Caspase-1 (interleukin-1 β -converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *Biochem. J.*, 342, 655-665.

Aranishi, F. (1999). Purification and characterization of serum serpin from carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Biotechnol.* 1, 81 – 88.

Archibald, A.L., Couperwhite, S., Mellink, C.H.M., Lahbib-Mansais, Y., et Gellin, J., (1996). Porcine α_1 -antitrypsin (PI) : cDNA sequence, polymorphism and assignment to chromosome 7q2.4–q2.6. *Anim. Genet.* 27, 85 – 89.

Arnoys, E.J., and Wang, J.L. (2007). Dual localization: Proteins in extracellular and intracellular compartments. *Acta Histochem* 109, 89 – 110.

Aronsen, K. F., Ekelud, G., Kindmark, C. O., et Laurell, C.B. (1972). Sequential changes of plasma proteins after surgical trauma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29 : 127 – 136.

Asumendi, A., Andollo, N., Boyano, M.D., Hilario, E., Perez-Yarza, G., Atencia, R., Arechaga, J., Garcia-Sanz, M., (2000). The role of cleavage of cell structures during apoptosis. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 46, 1 – 11.

Atchley W.R., Lokot T., Wollenberg K., Dress A. et Ragg H. (2001). Phylogenetic analyses of amino acid variation in the serpin proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (8) : 1502 – 1511.

Atencia, R., Asumendi, A., et Garcia-Sanz, M., (2000). Role of cytoskeleton in apoptosis. *Vitam. Horm.* 58, 267 – 297.

« B »

Baker, C., Belbin, O., Kalsheker, N., et Morgan, K. (2007). SERPINA3 (aka alpha-1-antichymotrypsin). *Frontiers in Bioscience* 12, 2821 – 2835.

Bao Q. et Shi Y. (2007). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death and Differentiation*, 14 (1) : 56 – 65.

Bao, J.J., Sifers, R.N., Kidd, V.J., Ledley, F.D. et Woo, S.L. (1987). Molecular evolution of serpins: homologous structure of the human alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-antitrypsin genes. *Biochemistry*, 26, 7755 – 7759.

Barret A.J. (1980). Fluorimetric assay for cathepsin B and cathepsin H. *Biochem. J.*, 187 : 909-12.

- Baumann, U., Huber, R., Bode, W., Grosse, D., Lesjak, M. et Laurell, C. B. (1991).** Crystal structure of cleaved human α_1 -antichymotrypsin at 2.7 Å resolution and its comparison with other serpins. *J. Mol. Biol.* **218** : 595 – 606.
- Beatty, K., Bieth, J. et Travis, J. (1980).** Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J Biol Chem* **255** (9) : 3931 – 3934.
- Becila, S., Herrera-Mendez, C.H., Coulis, G., Labas, R., Astruc, T., Picard, B., Boudjellal, A., Pelissier, P., Bremaud, L., et Ouali, A. (2010).** Postmortem muscle cells die through apoptosis. *Eur Food Res Technol*, **231**:485–493.
- Beere, H. M. (2004).** The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*, 117, 2641–2651.
- Benchabane, M., Saint-Jore-Dupas, C., Bardor, M., Faye, L., Michaud, D., et Gomord, V. (2009).** Targeting and post-translational processing of human α_1 -antichymotrypsin in BY-2 tobacco cultured cells. *Plant Biotechnology Journal* **7**: 146–160.
- Bendixen, E., (2005).** The use of proteomics in meat science. *Meat Sci.* **71** (1): 138 – 149.
- Benning, L.N., Whisstock, J.C., Sun, J., Bird, P.I., et Bottomley, S.P. (2004).** The human serpin proteinase inhibitor-9 self-associates at physiological temperatures. *Protein Sci* **13**, 1859-1864.
- Berman G, Afford SC, Burnett D, et Stockley RA (1986).** alpha 1-Antichymotrypsin in lung secretions is not an effective proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **261** : 14095 – 14099.
- Bernard, C., Cassar-Malek, I., LeCunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G. et Hocquette, J. F., (2007).** New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55** (13) : 5229 – 5237.
- Berninger, R. W. (1985).** *J.Med.* **16**, 101 – 127.
- Bijnens AP, Gils A, Stassen JM, Komissarov AA, Knockaert I, Brouwers E, Shore JD et Declerck PJ (2001).** The distal hinge of the reactive site loop and its proximity: a target to modulate plasminogen activator inhibitor-1 activity. *J Biol Chem* **276** : 44912 – 44918.
- Billingsley, G.D., Walter, M.A., Hammond, G.L. et Cox, D.W. (1993).** Physical mapping of four serpin genes: alpha 1-antitrypsin, alpha 1-antichymotrypsin, corticosteroid-binding globulin, and protein C inhibitor, within a 280-kb region on chromosome I4q32.1. *Am J Hum Genet*, **52**, 343 – 353.
- Bode W, et Huber R. (1992).** Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem*; 204 : 433 – 451.

Bode, W. et Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 433 – 451.

Bottomley, S.P, Lawrenson, I.D, Tew, D., Dai, W., Whisstock, J.C. et Pike, R.N. (2001). The role of strand 1 of the C beta-sheet in the structure and function of alpha-1-antitrypsin. *Protein Sci* **10** : 2518 – 2524.

Boudier C, et Bieth JG. (2001). The reaction of serpins with proteinases involves important enthalpy changes. *Biochemistry*; **40** : 9962 – 9967.

Bouley J., (2004). Analyse protéomique du muscle de bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande. *Renc. Rech. Rum.*, 87-89.

Bozhkov P.V., Suarez M.F., Filonova L.H., Daniel G., Zamyatnin A.A. Jr, Rodriguez-Nieto S., Zhivotovsky B. et Smertenko A. (2005). Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (40) : 14463 – 14468.

Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., et Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip–flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 26159–26165.

Brown, S. B., K. Bailey, et J. Savill. (1997). Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem. J.* **323** : 233 – 237.

Bruce, D., Perry, D. J., Borg, J. Y., Carrell, R. W. et Wardell, M. R. (1994). Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen-VI (187 Asn-Asp). *J. Clin. Invest.*, **94**, 2265 – 2274.

Bruch M., Weiss V., et Engel J. (1988). Plasma serine proteinase inhibitors (serpins) exhibit major conformational changes and a large increase in conformational stability upon cleavage at their reactive sites. *J Biol Chem* **263** : 16626 – 16630.

Buchman, T.G., Cabin, D.E., Vickers, S., Deutschman, C.S., Delgado, E., Sussman, M.M., et Bulkley, G.B., (1990). Molecular biology of circulatory shock. Part II. Expression of four groups of hepatic genes is enhanced after resuscitation from cardiogenic shock. *Surgery* **108**, 559 – 566.

Buja, L. M., Eigenbrodt, M. L., et Eigenbrodt, E. H. (1993). Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, **117**, 1208-14.

Bursch, W., Hohegger, K., Torok, L., Marian, B., Ellinger, A., et Hermann, R.S., (2000). Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J. Cell Sci.* **113**, 1189 – 1198.

« C »

Calvin, J., et Price, C.P. (1986). Measurement of serum alpha 1-antichymotrypsin by immunoturbidimetry. *Ann Clin Biochem.* **23** : 206 – 209.

Camussi, G., Tetta, C., Bussolino, F., Baglioni, C. (1988). Synthesis and release of platelet-activating factor is inhibited by plasma alpha1-proteinase inhibitor or alpha 1-antichymotrypsin and is stimulated by proteinases. *J. Exp. Med.* **168**, **1293**.

Carlier, M.M, et Pantaloni, D. (2010). From Molecules to Movement : In Vitro Reconstitution of Self-Organized Actin-based Motile Processes. Pp : 237 – 254. In “Actin-based Motility Cellular, Molecular and Physical Aspects by Marie-France Carlier, N.Y., Eds Springer. 243p.

Carrell RW, et Travis J. (1985). α_1 -Antitrypsin and the serpins : variation and countervariation. *Trends Biochem Sci*; **10** : 20–24.

Carrell, R.W, Stein, P.E, Fermi, G. et Wardell, M.R. (1994). Biological implications of a 3 A structure of dimeric antithrombin. *Structure* **2** : 257 – 270.

Carrell, R.W., et Stein, P.E. (1996). The biostructural pathology of the serpins: critical function of sheet opening mechanism. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377** : 1 – 17.

Carrell, R.W., Mushunje, A. et Zhou, A. (2008). Serpins show structural basis for oligomer toxicity and amyloid ubiquity. *FEBS Lett.* **582** (17) : 2537 – 2541.

Carrell, R.W., Pamberton, P.A., et Boswell D.R. (1987). Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* **52**: 527 – 535

Cerreti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A., Huebner, K. et Black, R. A. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1-Beta-converting enzyme. *Science*, **256**, 97-100.

Chaillan-Huntington, C. E., Gettins, P.G.W., Huntington, J. A. et Patston, P. A. (1997). The P6-P2 region of serpins is critical for proteinase inhibition and complex stability. *FASEBJ* **11** : 2149.

Chandra, T., R. Stackhouse, V. J. Kidd, K. J. Robson et S. L. Woo (1983). Sequence homology between human alpha1-antichymotrypsin, alpha 1-antitrypsin, and antithrombin III. *Biochemistry*, **22**, 5055 – 61.

Chang WS, et Lomas DA (1998). Latent alpha 1-antichymotrypsin. A molecular explanation for the inactivation of alphas-antichymotrypsin in chronic bronchitis and emphysema. *J Biol Chem* **273** : 3695 – 3701.

Chapman, H. A., Riese, R. J. et Shi, G. P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual Review of Physiology*, **59** : 63 – 88.

Chase, T. et Shaw, E. (1970). Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-nitrophenyl-p-guanidinobenzoate HCl. *Methods Enzymol*, **19**, 20 – 27.

Chelbi, S.T., Mondon, F., Jammes, H., et al. (2007). Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors : SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia. *Hypertension*; **49** : 76-83.

Chen F., Chang R., Trivedi M., Capetanaki Y., et Cryns V.L. (2003). Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **278**, 6848 – 6853.

Chhabra, E. S., Ramabhadran, V., Gerber, S. A., and Higgs, H. N. (2009) INF2 is an endoplasmic reticulum-associated formin protein. *J Cell Sci* **122**, 1430–1440.

Chow, M. K., Lomas, D. A. et Bottomley, S. P. (2004). Promiscuous β -strand interactions and the conformational diseases. *Curr. Med. Chem.*, **11**, 491 – 499.

Christensen, S. et Sottrup-Jensen, L. (1994). Characterization of two serpins from bovine plasma and milk. *Biochem. J.* **303**, 383 – 390.

Cichy, J., Potempa, J., Chawala, R. K. et Travis, J. (1995). Stimulatory effect of inflammatory cytokines on alpha 1-antichymotrypsin expression in human lung-derived epithelial cells. *J Clin Invest* **95** : 2729 – 2733.

Cizova, D., Gabrisova, E., Stratil, A., et Hojny, J., (1993). An additional locus (PI4) in the protease inhibitor (PI) gene cluster of pigs. *Anim. Genet.* **24**, 315 – 318.

Clarke EP, Gates GA, Ball EH, et Sanwal BD (1991). A collagen-binding protein in the endoplasmic reticulum of myoblasts exhibits relationship with serine protease inhibitors. *J Biol Chem* **266** : 17230-17235.

Clarke, P.G., Posada, A., Primi, M.P., et Castagne, V. (1998). Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother.* **52** : 356 – 62.

Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* **326** : 1 – 16.

Confort, C, Rochefort, H. et Vignon, F. (1995). Insulin-like growth factors (IGFs) stimulate the release of alpha 1-antichymotrypsin and soluble IGF-M/mannose 6-phosphate receptor from MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* **136** (9) : 3759 – 66.

Crowther, D. C, Serpell, L. C, Dafforn, T. R., Gooptu, B. et Lomas, D. A. (2003). Nucleation of alpha 1-antichymotrypsin polymerization. *Biochemistry*. **42** (8) : 2355 – 63.

« D »

Dafforn T.R., Pike R.N. et Bottomley S.P. (2004). Physical characterization of serpin conformations. *Methods*, **32** (2) : 150 – 158.

Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, Sivasothy P et Lomas DA (1999). A kinetic mechanism for the polymerization of alpha1-antitrypsin. *J Biol Chem* **274**: 9548 – 9555.

Dalhmnn, B., Khuen, L., Rutschmann, M., Block, J., et Reinauer, H. (1981). Characterization of the alkaline proteinases from rat skeletal muscle. In : *Proteinases and their inhibitors*. Turk V. et Vitale L. J. (Eds). 163 – 171.

Dardiotis E, Hadjigeorgiou GM, Dardioti M, Scarmeas N, Paterakis K, Aggelakis K, Komnos A, Tasiou A, Xiromerisiou G, Gabranis I, Zintzaras E, Papadimitriou A, Karantanis A. (2008). Alpha-1antichymotrypsin gene signal peptide a/t polymorphism and primary intracerebral hemorrhage. *Eur Neurol.* **59** (6) : 307 – 14.

Davis, R. L., Shrimpton, A. E., Holohan, P. D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G. H., et al. (1999). Familial dementia caused by polymerisation of mutant neuroserpin. *Nature*, **401**, 376 – 379.

Davril, M., Laine, A., et Hayem, A. (1987). Studies of the interactions of human pancreatic elastase 2 with human a1-antiproteinase inhibitor and a1-antichymotrypsin. *Biochem J*; **245** : 699-704.

Dementiev, A., Dobo, J., et Gettins, P.G. (2006). Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins : Structure of the covalent complex of alpha-1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase. *J Biol Chem* **281**, 3452 – 3457.

Derechin, V. M., Blinder, M. A. et Tollefsen, D. M. (1990). Substitution of arginine for Leu444 in the reactive site of heparin cofactor II enhances the rate of thrombin inhibition. *J Biol Chem* **265** (10) : 5623 – 8.

Deveaux S, Filipe A, Lemarchandel V, Ghysdael J, Romeo PH, et Mignotte V. (1996). Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes. *Blood*. **87** : 4678 – 85.

- Devlin, G. L., Chow, M. K. M., Howlett, G. J. et Bottomley, S. P. (2002).** Acid denaturation of alpha1-antitrypsin: characterisation of a novel mechanism of serpin polymerization. *J. Mol. Biol.*, **324**, 859 – 870.
- Dingová, H., Fukalová, J., Maninová, M., Philimonenko, V.V., et Hozák, P. (2009).** Ultrastructural localization of actin and actin-binding proteins in the nucleus. *Cell Biol* **131** : 425-434.
- Dirks, A. J., et Leeuwenburgh, C. (2005).** The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy. *Sports Medicine*, **35**, 473–483.
- Disanza, A., Steffenc, A., Hertzoga, M., Frittoli, K. Rottnerd et Scitaa, G. (2005).** Actin polymerization machinery : the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell. Mol. Life Sci.* **62** : 955–970.
- Djie, M. Z., Le Bonniec, B. F., Hopkins, P. C, Hipler, K. et Stone, S. R. (1996).** Role of the P2 residue in determining the specificity of serpins. *Biochemistry* **35** (35) : 11461-9.
- Djie, ML Z., Stone, S. R. et LeBonniec, B. F. (1997).** Intrinsic specificity of the reactive site loop of alpha(1)- antitrypsin, alpha(1)-antichymotrypsin, antithrombin III, and protease nexin I. *J Biol Chem* **272** : 16268 – 16273.
- Dlamini Z., Mbita Z. et Zungu M. (2004).** Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics*, **101** (1) : 1 – 15.
- Dobó J., Swanson R., Salvesen G.S., Olson S.T. et Gettins P.G. (2006).** Cytokine response modifier a inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *J Biol Chem*, **281** (50) : 38781 – 38790.
- Dunstone, M. A., Dai, W., Whisstock, J. C, Rossjohn, J., Pike, R. N, Feil, S. C, LeBonniec, B. F., Parker, M. W. et Bottomley, S. P. (2000).** Cleaved antitrypsin polymers at atomic resolution. *Protein Sci* **9** (2) : 417 – 20.
- Duranton, J., Boudier, C, Belorgey, D., Mellet, P., et Bieth, J.G. (2000).** DNA strongly impairs the inhibition of cathepsin G by alpha(1)- antichymotrypsin and alpha(1)-proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **275**, 3787 – 3792.
- Dutaud, D., Aubry, L., Henry, L., Levieux, D., Hendil, K.B., Huehn, L., Bureau, J.P., et Ouali, A. (2002).** Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *Journal of Immunological Methods*, **260** : 183–193.

« E »

Eldering, E., Verpy, E., Roem, D., Meo, T. et Tosi, M. (1995). COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2579 – 2587.

Elliott P.R., Pei, X.Y., Dafforn, T.R., et Lomas D.A. (2000). Topography of a 2.0 Å structure of alpha1-antitrypsin reveals targets for rational drug design to prevent conformational disease. *Protein Sci* **9** : 1274 – 1281.

Engh, R. A., Schulze, A. J., Huber, R., et Bode, W., (1993). *Behring. Inst. Mitt.* **93**: 41 – 62.

Englard, S., et Seifter, S. (1990). Precipitation techniques. *Meth. Enzymol.* **182**, 287–300.

« F »

Faber, J. P., Poller, W., Olek, K., Baumann, U., Carlson, J., Lindmark, B. et Eriksson, S. (1993). The molecular basis of alpha 1-antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease. *J. Hepatol.*, **18**, 313 - 321.

Festoff, B. W., Rao, J. S. & Hantai, D. (1991). Plasminogen activators and inhibitors in the neurovascular system: III. The serpin protease nexin 1 is synthesized by muscle and localized at neuromuscular synapses. *J. Cell Physiol.*, **147**, 76 – 86.

Fibbi, G., Barletta, E., Dini, G., Del Rosso, A., Pucci, M., Cerletti, M. et Del Rosso, M. (2001). Cell invasion is affected by differential expression of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system in muscle satellite cells from normal and dystrophic patients. *Lab. Invest.*, **81**, 27 – 39.

Fidzianska, A., Kaminska, A., et Glinka, Z. (1991). Muscle cell death. Ultrastructural differences between muscle cell necrosis and apoptosis. *Neuropatologia Polska*, **29**, 19–28.

Forsyth, S., Horvath, A. et Coughlin, P. (2003). A review and comparison of the murine alpha(1)-antitrypsin and alpha(1)-antichymotrypsin multigene clusters with the human clade A serpins. *Genomics* **81** (3) : 336 – 45.

Frazer, J. K., Jackson, D. G., Gaillard, J. P., Lutter, M., Liu, Y. J., Banchereau, J., Capra, J. D. et Pascua, V. (2000). Identification of centerin : a novel human germinal center B cell-restricted serpin. *Eur J Immunol* **30** (10) : 3039 – 48.

Frost, C.L., Naudé, R.J., Oelofsen, W. et Muramoto, K. (1997). Purification and partial characterization of an Ostrich α_1 -Antichymotrypsin-like serum inhibitor. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **29** (4) : 595 – 603.

Fuentes-Prior, P., et Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochemical Journal*, **384**, 201–232.

« G »

Gahne, B., et Juneja, R.K., (1985). Close genetic linkage between four plasma α -protease inhibitor loci (Pi1, Po1A, Po1B, Pi2) in pigs. *Prot. Biol. Fluids* **33**, 119 – 122.

Gahne, B., et Juneja, R.K., (1986). Extensive genetic polymorphism of four plasma a-protease inhibitors in pig and evidence for tight linkage between the structural loci of these inhibitors. *Anim. Genet.* **17**, 135 – 157.

Gao F, Shi HY, Daughty C, Cella N, et Zhang M. (2004). Maspin plays an essential role in early embryonic development. *Development*; **131** : 1479 – 89.

Garfin, D.E., (2003). Two-dimensional gel electrophoresis : an overview, *Trends in Analytical Chemistry*, **22** (5), 263 – 272.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., et Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, **119**, 493–501.

Gettins, P.G.W (2000). Keeping the serpin machine running smoothly. *Genome Research*, **10**: 1833 – 1835.

Gettins, P.G.W (2002a). Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* **102**:4751–4804.

Gettins, P.G.W. (2002b). The F-helix of serpins plays an essential, active role in the proteinase inhibition mechanism. *FEBS Letters*, **523** (1-3) :2 – 6.

Gettins, P.G.W. (2007). Mechanisms of serpin Inhibition, pp : 67 – 100. In” Molecular and Cellular Aspects of the Serpinopathies and Disorders in Serpin Activity (Silverman, G. A., & Lomas, D. A. 2007), World Scientific, Publishing Co., Singapore. 639 p.

Gettins, P.G.W., Patston, P.A., et Olson, S.T. (1996). Serpins: Structure, fonction and biology. R.G. Landes Texas.

Gianazza, E. et Arnaud, P. (1982). Chromatography of plasma proteins on immobilized Cibacron Blue F3-GA. Mechanism of the molecular interaction. *Biochem. J.* **203**, 637 – 641.

Gils, A., Pedersen, K.E., Skottrup, P., Christensen, A., Naessens, D., Deinum, J., Enghild, J.J., Declerck, P.J., et Andreasen, P.A. (2003). Biochemical importance of glycosylation of plasminogen activator inhibitor-1. *Thromb Haemost* **90**, 206 – 217.

Giometti C.S., Khare T., Tollaksen S.L., Tsapin A., Zhu W., Yates J.R. et Nealson K.H., (2003). Analysis of the *Shewanella oneidensis* proteome by two-dimensional gel electrophoresis under non denaturing conditions, *Proteomics*, **3**, 777 – 785.

Goodwin, R.L., Barbour, K.W., et Berger, F.G. (1997). Expression of the $\alpha 1$ -proteinase inhibitor gene family during evolution of the genus *Mus*. *Mol Biol Evol*, **14** : 420 – 427.

Gooptu B et Lomas DA. (2009). Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem*; **78** : 147 – 76.

Gooptu, B., Hazes, B., Chang, W.S., Oafforn, T.R., Carrell, R.W., Read, R.J., et Lomas, D.A. (2000). Inactive conformation of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: Implications for inhibitory function and conformational disease. *Proc Natl Acad Sci*, **97** : 67 – 72.

Gordon, A.M., (2000). Regulation of muscle contraction in striated muscle, *Physiol. Revs.*, **80**, 853-924.

Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S., & Mori, M. (2004). *Hsp70-DNAJA* chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differentiation*, **11**, 390–402.

Green et Hughes (1955). *Methods Enzymol*, **1** : 67 – 90.

Grigoryev, S.A., Bednar, J., et Woodcock, CL. (1999). MENT, a heterochromatin protein that mediates higher order chromatin folding, is a new serpin family member. *J Biol Chem* **274**, 5626-36.

Guillemin, N. (2010). Marqueurs protéiques de la tendreté de la viande bovine : étude prédictive et fonctionnelle. Thèse doctorat de l'université Blaise Pascal Clermont-Ferrand.

Guillemin, N., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.-F., Jurie, C., Micol, D., Listrat, A., Leveziel, H., Renand, G., et Picard, B., (2009). La maîtrise de la tendreté de la viande bovine : identification de marqueurs biologiques. *Inra Prod. Anim.*, **22**, 331 – 344.

Guillemin, N., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Renan, G. et Picard, B., (2010). Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal (In Press)*.

« H »

Haltiwanger, T. et Lowe, P. (2004). Role of glycosylation in development. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 491 – 537.

- Hara, K. et Ishihara, T. (1986).** Purification and characterization of serine proteinase inhibitor from carp ordinary muscle. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1226 – 1228.
- Harcum, S.W. (2006).** Protein Glycosylation cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. Ozturk, S.S. et Hu, W.S. Taylor and Francis, New-York.
- Harris, E.L.V. (2001).** Chapter 6 : Concentration of the extract. *In: Protein purification techniques : a practical approach.* Edited by Simon Roe. 2nd Edition, Oxford University Press. Pp 111 – 153.
- Hedstrom, L. (2002).** Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* **102** (12) : 4501 – 24.
- Heimburger, N., et Haupt, H. (1965).** *Clin. Chim. Acta* **12**, 116.
- Hejgaard, J. (1982).** Purification and properties of protein Z - A major albumin of barley endosperm. *Physiol Plant* **54**, 174 – 182.
- Hejgaard, J. (2001).** Inhibitory serpins from rye with glutamine as P1 and P2 residues in the reactive center. *FEBS Lett* **488**, 149 – 153.
- Hejgaard, J., et Hauge, S. (2002).** Serpins of oat (*Avena sativa*) grain with distinct reactive centres and inhibitory specificity. *Physiol Plant* **116**, 155 – 163.
- Hekman C.M, et Loskutoff D.J (1985).** Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants. *J Biol Chem* **260** :11581 – 11587.
- Helmersson A., von Arnold S. et Bozhkov P.V. (2008).** The level of free intracellular zinc mediates programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos. *Plant Physiology*, **147** (3) : 1158 – 1167.
- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Blanchet X., Pelissier P., Delourme D., Coulis G., Sentandreu M.A., Boudjellal A., Bremaud L. et Ouali A. (2009).** Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3. *FEBS Letters*, **583** (17) : 2743 – 2748.
- Herrera-Mendez CH, Bremaud L, Coulis G, Pelissier P, Sentandreu MA, Aubry L, Delourme D, Chambon C, Maftah A, Leveziel H, et Ouali A (2006a).** Purification of the skeletal muscle protein Endopin 1B and characterization of the genes encoding Endopin 1A and 1B isoforms. *FEBS Lett*, **580** : 3477 – 3484.
- Herrera-Mendez, C.H. (2006).** Marqueurs biologiques de la qualité de la viande bovine: purification, caractérisation et quantification de trois serpinines musculaires. Thèse de docteur d'université en sciences des aliments. Université Blaise Pascal et d'Auvergne. 236 p.
- Herrera-Mendez, C.H., Becila, S., Boudjellal, A., et Ouali, A. (2006b).** Meat ageing : Reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci. Technol.*, **17**, 394 – 405.

Herve M et Ghelis C (1990). Conformational changes in intact and papain modified alpha 1-proteinase inhibitor induced by guanidinium chloride. *Eur J Biochem* **191** : 653 – 658.

Higashiyama, M., O. Doi, H. Yokouchi, K. Kodama, S. Nakamori et R. Tateishi (1995). Alpha-1-antichymotrypsin expression in lung adenocarcinoma and its possible association with tumor progression. *Cancer*, **76**, 1368 – 76.

Hill, R. E., Shaw, P. H, Boyd, P. A., Baumann, H. et Hastie, N. D. (1984). Plasma protease inhibitors in mouse and man: divergence within the reactive centre regions. *Nature* **311** (5982) : 175.

Hill, R. E., Shaw, P. H., Barth, R. K. et Hastie, N. D. (1985). A genetic locus closely linked to a protease inhibitor gene complex controls the level of multiple RNA transcripts. *Mol. Cell. Biol.* **5** (8) : 2114 – 22.

Hillier L.W., Miller W., Birney E., Warren W., Hardison R.C., et al. (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* **432** : 695 – 716.

Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Nakai, A., Iwamatsu, A., Yamada, K. M. et Nagata, K. (1991). "HSP47: a tissue-specific, transformation-sensitive, collagenbinding heat shock protein of chicken embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **11** (8) : 4036 – 4044.

Hocquette J.F., Bernard C., Cassar-Malek I., Lepetit J., Micol D., Jurie C., Meunier B., Renand G., et Picard B., (2007b). Mise en évidence de marqueurs de tendreté de la viande bovine par des approches de génomique fonctionnelle (projet MUGENE). *Renc. Rech. Rum.*, 117-120.

Hocquette, J. F., Lehnert, S. A., Barendse, W., Cassar-Malek, I. et Picard, B., (2007a). Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal*, **1** : 159 – 173.

Hocquette, J.-F., Ortigues-Marty, I., Picard B., Doreau, M., Bauchart, D., et Micol, D. (2005). La viande des ruminants. De nouvelles approches pour améliorer et maîtriser la qualité. *Viandes Prod. Carnés* Vol **24** (1) : 7 – 18.

Hoffmann, D.C., Textoris, C., Oehme, F., Klaassen, T., Goppelt, A., Römer, A., Fugmann, B., Davidson, J.M., Werner, S., Krieg, T., et Eming, S.A. (2011). A pivotal role for alpha-1-antichymotrypsin in skin repair. Article in Press. *J. Biol. Chem.*

Hook, V. Y. H., Purviance, R. T., Azaryan, A. V., Hubbard, G. et Krieger, T. J. (1993). Purification and characterization of alpha 1-antichymotrypsin-like protease inhibitor that regulates prohormone thiol protease involved in enkephalin precursor processing. *J. Biol. Chem.*, **268** :20570-77

Hook, V.Y.H., Yasothornsrikul, S., et Hwang, S.R. (2002). Novel chromaffine granule serpins, Endopin 1 and Endopin 2. Endogenous protease inhibitors with distinct target protease specificities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **971** : 426 – 444.

Hopkins, P.C, Carrell, R.W et Stone, S.R. (1993). Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry* **32** : 7650 – 7657.

Horvath, A.J., Forsyth, S.L., et Coughlin, P.B. (2004). Expression patterns of murine antichymotrypsin-like genes reflect evolutionary divergence at the Serpina3 locus. *J Mol Evol.* **59** (4) : 488 – 97.

Hu, Z.H., Liu, Q., Shang, Q., Zheng, M., Yang, J., et Zhang, Y.L. (2002). Identification and characterization of a new member of serpin family-HongrES1 in rat epididymis. *Cell Res* **12** : 407-10.

Huber, R. et Carrell, R. W. (1989). Implications of the three-dimensional structure of α 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* **28**(23) : 8951 – 8966.

Hunt, L.T., et Dayhoff, M. O., (1980). A Surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* ;**95**:864–71.

Huntington JA, Read RJ, et Carrell RW. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*; **407** : 923– 926.

Huntington, J. A., Pannu, N. S., Hazes, B., Read, R. J., Lomas, D. A. et Carrell, R.W. (1999). A 2.6 Å structure of a serpin polymer and implications for conformational disease. *J Mol Biol* **293**(3) : 449 – 55.

Huntington, J.A. (2006). Shape-shifting serpins-Advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci* **31**, 427 – 435.

Hwang S.R., Steineckert B., Toneff T., Bunday R., Logvinova A.V., Goldsmith P. et Hook V.Y. (2002). The novel serpin endopin 2 demonstrates cross-class inhibition of papain and elastase: localization of endopin 2 to regulated secretory vesicles of neuroendocrine chromaffin cells. *Biochemistry*, **41** (33) : 10397 – 10405.

Hwang S.R., Steineckert B., Yasothornsrikul S., Sei C.A., Toneff T., Rattan J. et Hook V.Y. (1999a). Molecular cloning of endopin 1, a novel serpin localized to neurosecretory vesicles of chromaffin cells. Inhibition of basic residue-cleaving proteases by endopin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (48) : 34164 – 34173.

Hwang, S. R., B. Steineckert, A. Kohn, M. Palkovits et V. Y. Hook (1999b). Molecular studies define the primary structure of alpha1-antichymotrypsin (ACT) protease inhibitor in

Alzheimer's disease brains. Comparison of act in hippocampus and liver. *J Biol Chem*, **274**, 1821 – 7.

Hwang, S. R., Stoka, V., Turk, V. et Hook, V. Y. (2005). The novel bovine serpin endopin 2C demonstrates selective inhibition of the cysteine protease cathepsin L compared to the serine protease elastase, in cross-class inhibition. *Biochemistry* **44**, 7757 – 7767.

« I »

Im H, Woo MS, Hwang KY, et Yu MH (2002). Interactions Causing the Kinetic Trap in Serpin Protein Folding. *J Biol Chem* **277** : 46347 – 46354.

Im H., Ahn H.Y. et Yu M.H. (2000). Bypassing the kinetic trap of serpin protein folding by loop extension. *Protein Science*, **9** (8) : 1497 – 1502.

Inglis JD, et Hill RE (1991). The murine Spi-2 proteinase inhibitor locus : a multigene family with a hypervariable reactive site domain. *EMBO J*, **10** : 255 – 261.

Irving JA, Cabrita LD, Rossjohn J, Pike RN, Bottomley SP, et Whisstock JC. (2003). The 1.5 Å crystal structure of a prokaryote serpin : controlling conformational change in a heated environment. *Structure*; **11**: 387 – 397.

Irving JA, Pike RN, Lesk AM, et Whisstock JC. (2000). Phylogeny of the serpin superfamily : implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res*; **10** : 1845– 1864.

Irving, J.A, Cabrita, D.L., Kaiserman, D., Worrall M.M. et Whisstock J.C., (2007). Evolution and Classification of the Serpin Superfamily, pp : 1 – 33. *In*” Molecular and Cellular Aspects of the Serpinopathies and Disorders in Serpin Activity (Silverman, G. A., et Lomas, D. A. 2007), World Scientific, Publishing Co., Singapore. 639 p.

Irving, J.A., Shushanov, S.S., Pike, R.N., Popova, E.Y., Bromme, D., Coetzer, T.H., Bottomley, S.P., Boulyenko, L.A., Grigoryev, S.A., et Whisstock, J.C. (2002). Inhibitory activity of a heterochromatin-associated serpin (MENT) against papain-like cysteine proteinases affects chromatin structure and blocks cell proliferation. *J Biol Chem* **277**, 13192-13201.

Isa, M. N., Boyd, E., Morrison, N., Harrap, S., Clauser, E. et Connor, J. M. (1990). Assignment of the human angiotensinogen gene to chromosome 1q42-q43 by nonisotopic *in situ* hybridization. *Genomics* **8** (3) : 598 – 600.

« J »

Jallat, S., Tessier, L. H., Benavente, A., Crystal, R. G. et Courtney, M. (1986). Antiprotease targeting: altered specificity of alpha 1-antitrypsin by amino acid replacement at the reactive centre. *Rev Fran de Transfus Immunohematol* **29** (4) : 287 – 98.

Janciauskiene S. (2001). Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1535** (3) :221 – 235.

Jeffery, C.J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**, 8 – 11.

Jeong S.Y. et Seol D.W. (2008) The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports*, **41** (1) : 11 – 22.

Jia, X., Hollung, K., Therkildsen, M., Hildrum, K. I. et Bendixen, E., (2006). Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. *Longissimus dorsi* and m. *Semitendinosus*. *Proteomics* **6** (3) : 936 – 944.

« K »

Kabsch W, Mannherz G, Suck D, Pai EF, et Holmes KC. (1980). Atomic structure of the actin : DNA I complex. *Nature*; **347** : 37 – 45.

Kaiserman Dion, Whisstock J.C et Bird P.I (2006). Mechanisms of serpin dysfunction in disease. *Expert Rev Mol Med* **8** 1-19.

Kalsheker, N.A. (1996). Alpha 1-antichymotrypsin. *Int J Biochem Cell Biol*, **28**, 961-964.

Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. (1995). APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1-antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet.* **10** : 486 – 488.

Katsunuma, T., Tsuda, M., Kusumi, T., Ohkubo, T., Mitomi, T., Nakasaki, H., Tajima, T., Yokoyama, S., Kamiguchi, H., Kobayashi, K., et Shinoda, H. (1980). Purification of a serum DNA binding protein (64DP) with a molecular weight of 64,000 and its diagnostic significance in malignant diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**, 552 – 557.

Kelly, C.A., Laskowski, M., Jr., et Qasim, M.A. (2005). The rôle of scaffolding in standard mechanism serine proteinase inhibitors. *Protein Pept Lett* **12**, 465 – 471.

Kelm, S., et Schauer, R. (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cyto* **175**, 137 – 240.

Kemp C.M., Bardsley R.G. et Parr T. (2006). Changes in caspase activity during the postmortem conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, **84** (10) : 2841 – 2846.

Kemp C.M., Sensky P.L., Bardsley R.G., Buttery P.J. et Parr T. (2010) Tenderness-An enzymatic view. *Meat Science*, **84** (2) : 248 – 256.

Kemp, C. M., King, D. A., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., et Koohmaraie, M. (2009). The caspase proteolytic system in callipyge and normal lambs in *longissimus*, *semimembranosus*, and *infraspinatus* muscles during postmortem storage. *Journal of Animal Science*, **87**, 2943–2951.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., et Currie, A.R. (1972). Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.*; **26** : 239 – 57.

Khalkhali-Ellis, Z. (2006). Maspin: The new frontier. *Clin Cancer Res* **12**, 7279-7283.

Kim, O., Chung, S. S., Woo, K. M., Ha, D. B. et Chung, C. H. (1992). Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor from chicken skeletal muscle. *Biochem. International*, **27**, 963 – 972.

King D.A., Schuehle Pfeiffer C.E., Randel R.D., Welsh Jr. T.H., Oliphint R.A., Baird B.E., Curley Jr. K.O., Vann R.C., Hale D.S. and Savell J.W. (2006). Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, **74** (3) : 546 – 556.

Koji, A., Hatton, M.W. C., Wong, K.C. et Regoeczi, E. (1978). Isolation and partial characterization of rabbit plasma α_1 -antitrypsin. *Biochem. J.* **169**, 589 – 596.

Komiyama, T., Gron, H., Pemberton, P. A. et Salvesen, G. S. (1996). Interaction of subtilisins with serpins. *Protein Sci* **5** (5) : 874 – 882.

Koohmaraie, M. (1992). The role of Ca^{2+} -dependent proteases (calpains) in *postmortem* proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, **74** (3) : 239 – 245.

Koomen, J. M., L. N. Shih, K. R. Coombes, D. Li, L. C. Xiao, I. J. et Fidler, J. L. (2005). Abbruzzese & R. Kobayashi: Plasma protein profiling for diagnosis of pancreatic cancer reveals the presence of host response proteins. *Clin Cancer Res*, **11**, 1110 – 8.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*; **278** : 294 – 6.

Krebs, M., Uhrin, P., Vales, A., Prendes-Garcia, M. J., Wojta, J., Geiger, M. et Binder, B. R. (1999). Protein C inhibitor is expressed in keratinocytes of human skin. *J Invest Dermatol* **113** (1): 32.

Kuehn, L., Rutschmann, M., Dahlmann, B. & Reinauer, H. (1984). Identification of four distinct serine proteinase inhibitor in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 96 – 102.

Kuhn, C.R., Naudé, R.J., Travis, J. et Oelefsen, W. (1994). The isolation and partial characterization of α_1 -proteinase inhibitor from the serum of ostrich (*Struthio camelus*). *Int. J. Biochem.* **26**, 843 – 853.

Kwon, K.S., et Yu, M.H. (1997). Effect of glycosylation on the stability of alpha-1-antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation. *Biochim Biophys Acta* **1335**, 265 – 272.

Kwon, K.S., Song, M., et Yu, M.H. (1995). Purification and characterization of alpha 1-antitrypsin secreted by recombinant yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J Biotechnol* **42**, 191 – 195.

« L »

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Laine, A., Davril, M., et Hayem, A. (1984). Interaction of human α_1 -antichymotrypsin with chymotrypsin. *Eur. J. Biochem.* **140**, 105 – 111.

Laine, A., et Hayem, A. (1981). Purification and characterization of alpha-1-antichymotrypsin from human pleural fluid and human serum. *Biochim. Biophys. Acta* **668** : 429 – 38.

Lamark, T., Ingebrigtsen, M., Bjornstad, C, Melkko, T., Mollnes, T.E., et Nielsen, E.W. (2001). Expression of active human C1 inhibitor serpin domain in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **22**, 349 – 358.

Laskowski, M., et Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, **49**, 593 – 626.

Laurell CBE, S. (1963) The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* **15** : 132 – 140.

Laursen, I. et Lykkesfeldt, A. E. (1992). Purification and characterization of an alpha 1-antichymotrypsin-like 66 kDa protein from the human breast cancer cell line, MCF-7. *Biochim Biophys Acta* **1121** : 119 – 29.

Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., Rosado, C. J., Langendorf, C. G., Pike, R. N., Bird, P. I., et Whisstock, J. C. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* **7**, 216–226.

Lawrence, D.A., Ginsberg, D., Day, D.E., Berkenpas, M.B., Verhamme, I.M., J-O., K., et Shore, J.D. (1995). Serpin-protease complexes are trapped as stable acyl-enzyme intermediates. *J Biol Chem* **270**, 25309 – 25312.

Lawrence, D.A., Oison, S.T., Muhammad, S., Day, D.E., Kvassman, J.O., Ginsburg, D., et Shore, J.D. (2000). Partitioning of serpin-proteinase reactions between stable inhibition and substrate cleavage is regulated by the rate of serpin reactive center loop insertion into beta-sheet A. *J Biol Chem* **275**, 5839 – 5844.

Lawrence, D.A., Olson, S.T., Palaniappan, S., et Ginsburg, D. (1994). Serpin Reactive Center Loop Mobility Is Required For Inhibitor Function But Not For Enzyme Recognition. *J Biol Chem* **269** : 27657 – 27662.

Le Cam A., Pages G., Auberger P., le Cam G., Leopold P., Benarous R., et Glaichenhaus N (1987). Study of a growth hormone-regulated protein secreted by rat hepatocytes: cDNA cloning, anti-protease activity and regulation of its synthesis by various hormones. *EMBO J.* **6** : 1225 – 1232.

Lee, C., Park, S. H., Lee, M. Y. et Yu, M. H. (2000). Regulation of protein function by native metastability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 7727 – 7731.

Lerouge, P., Cabance-Macheteau, M., Rayon, C, Fischette-Lainé, A.-C, Gomord, V., et Faye, L. (1998). N-glycoprotein biosynthesis in plants: Récent developments and future trends. *Plant Mol Biol* **38**, 31 – 48.

Licastro F, Pedrini S, Ferri C, Casadei V, Govoni M, Pession A, Sciacca FL, Veglia F, Annoni G, Bonafe M, Olivieri F, Franceschi C, Grimaldi LM. (2000). Gene polymorphism affecting alpha1-antichymotrypsin and interleukin-1 plasma levels increases Alzheimer's disease risk. *Ann Neurol.* **48** : 388 – 391.

Licastro, F., Chiappelli, M., Grimaldi, L.M., Morgan, K., N. Kalsheker, E. Calabrese, A. Ritchie, E. Porcellini, G. Salani, M. Franceschi et Canal N. (2005). A new promoter polymorphism in the alpha-1-antichymotrypsin gene is a disease modifier of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **26**, 449 – 53.

Lillis AP, van Duyn LB, Murphy-Ullrich et Strickland DK (2008). LDL-Receptor-related protein 1: unique tissue specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* **88** 887 – 918.

Lindmark B., Hilja H., Alan R., Eriksson S. (1989). The microheterogeneity of desialylated alpha1-antichymotrypsin: the occurrence of two amino-terminal isoforms, one lacking a His-Pro dipeptide. *Biochim. Biophys. Acta* **997** : 90 – 95.

Liu, C. C. et Ahearn, J. M. (2001). Apoptosis of skeletal muscle cells and the pathogenesis of myositis : a perspective. *Curr. Rheumatol. Rep.*, **3**, 325 – 333.

Loebermann, H.f Tokuoka, R., Deisenhofer, J. et Huber, R. (1984). Human α -1-proteinase inhibitor. *J. Mol. Biol.* **177** : 531 – 556.

Lomas D.A et Mahadeva R. (2002). Alpha 1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies : pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest*; **110** : 1585 – 1590.

Lomas, D. A., Elliott, P. R., Chang, W., Wardell, M. R. et Carrell, R. W. (1995a). Preparation and characterization of latent alpha(1)-antitrypsin. *J Biol Chem* **270** : 5282 – 5288.

Lomas, D. A., Stone, S. R., Llewellyn-Jones, C, Keogan, M.-T., Wang, Z.-m., Rubin, H., Carrell, R. W. et Stockley, R. A. (1995b). The Control of Neutrophil Chemotaxis by Inhibitors of Cathepsin G and Chymotrypsin. *J Biol Chem.* **270** (40) : 23437 - 23443.

Lomas, D.A., et Carrell, R.W. (2002). Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat Rev Genet* **3**, 759 – 768.

« M »

Ma, J., Yea, A., Brewer, H., Das., S., et Potter., H. (1994). Amyloid-associated proteins alpha-1antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* **372** : 92 – 94.

Majino, G., et Jons, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, **146**, 3–15.

Mangan, M. S. J. Kaiserman, D., et Bird P. I (2008). The role of serpins in vertebrate immunity. *Tissue Antigens* **72**, 1 – 10.

Manolov, T., Tan, T.T., Forsgren, A., et Riesbeck, K., (2008). Moraxella-dependent alpha1-antichymotrypsin neutralization : a unique virulence mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **38** (5) : 609 – 17.

Marsden, M. D. et Fournier, R. E. K. (2003). Chromosomal Elements Regulate Gene Activity and Chromatin Structure of the Human Serpin Gene Cluster at 14q32.1. *Mol. Cell. Biol.* **23** (10) : 3516 – 3526.

Marszal E. et Shrake A. (2006). Serpin crystal structure and serpin polymer structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **453** (1) : 123 – 129.

Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., et al. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is

a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of Experimental Medicine*, **182**, 1545–1556.

Martinez, M., F. Espana, M. Royo, J. M. Alapont, S. Navarro, A. Estelles, J. Aznar, C. D. Vera et J. F. Jimenez-Cruz (2002). The proportion of prostate-specific antigen (PSA) complexed to alpha (1)-antichymotrypsin improves the discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in men with a total PSA of 10 to 30 microg/L. *Clin Chem*, **48**, 1251 – 1256.

Maruyama, W., Irie, S., et Sato, T.A., (2000). Morphological changes in the nucleus and actin cytoskeleton in the process of Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Histochem. J.* **32**, 495 – 503.

Mashima T, Naito M, et Tsuruo T (1999). Caspase mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* **18** : 2423 – 2430.

Mashima T, Naito M, Fujita N, Noguchi K, et Tsuruo T (1995). Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **217** : 1185 – 1192.

Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D.K., Nicholson, D.W., et Tsuruo, T., (1997). Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* **14**, 1007 – 1012.

Mast, A. E., J. J. Enghild, S. V. Pizzo et G. Salvesen (1991). Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed, and reactive site cleaved serpins: comparison of alpha 1-proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, antithrombin III, alpha 2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. *Biochemistry*, **30**, 1723 – 30.

Matsumoto, M., Tsuda, M., Kusumi, T., Takada, S., Shimamura, T., et Katsunuma, T., (1981). Enhancement by alpha-1-antichymotrypsin of antibody response *in vivo*. *Molec. Cell Biol. Res. Commun.* **100**, 478.

Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M., et Sasaki, R. (1995). Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol* **27**, 1163 – 1172.

Matsura, T., Togawa, A., Kai, M., Nishida, T., Nakada, J., Ishibe, Y., et al. (2005). The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas-mediated apoptotic cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1736**, 181–188.

Meier, P., Finch, A., et Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, **407**, 796–801.

Miele G, Seeger H, Marino D, Eberhard R, Heikenwalder M, et al. (2008). Urinary a1-Antichymotrypsin: A Biomarker of Prion Infection. *PLoS ONE* **3** (12) : e3870.

Mikolajczyk, S. D., Marks, L. S., Partin, A. W. et Rittenhouse, H. G. (2002). Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex. *Urology* **59** (6) : 797 – 802.

Miyauchi Y., Hasegawa J., Teramura T., et Ikeuchi T. (2010). Molecular cloning of serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3 in *Plecoglossus altivelis*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. (<http://www.uniprot.org/uniprot/E0D8K1>).

Morgan K, Licastro F, Tilley L, Ritchie A, Morgan L, Pedrini S, Kalsheker N. (2001). Polymorphism in the alpha(1)-antichymotrypsin (ACT) gene promoter: effect on expression in transfected glial and liver cell lines and plasma ACT concentrations. *Hum Genet.* **109** : 303 – 310.

Mori, Y., Miura, Y., Oiso, Y., Hisao, S. et Takazumi, K. (1995). Precise localization of the human thyroxine-binding globulin gene to chromosome Xq22.2 by fluorescence *in situ* hybridization. *Human Genetics* **96** (4) : 481 – 2.

Morii, M. et Travis, J. (1983). Structural alterations in alpha-antichymotrypsin from normal and acute phase human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 438 – 443.

Morzel M., Terlouw C., Chambon C., Micol D., et Picard B., (2008). Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of «Blonde d'Aquitaine» young bulls: Acentral role of HSP27 isoforms. *Meat Sci.*, **78**, 297 – 304.

Mottonen J, Strand A, Symersky J, Sweet RM, Danley DE, Geoghegan KF, Gerard RD et Goldsmith EJ (1992). Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* **355** : 270 – 273.

Mushunje A., Evans G., Brennan S.O., Carrell R.W. et Zhou A. (2004). Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation. *Journal of thrombosis and haemostasis*, **2** (12) : 2170 – 2177.

Musilova, P., Lahbib-Mansais, Y., Yerle, M., Cepica, S., Stratil, A., Coppieters, W., et Rubes, J., (1995). Assignment of pig alpha-1-antichymotrypsin (AACT or PI2) gene to chromosome region 7q23–q26. *Mamm. Genome* **6**, 445.

« N »

Nagareda T, Takeda M, Kojima K, Tanaka A, Terada N et al. (1991). Alpha-1-antichymotrypsin is increased in human alveolar macrophages by phorbol myristate acetate or lipopolysaccharide and released from these activated macrophages by glucocorticoid. *J Pathol*; **165** : 319 – 323.

Naidoo, N., Cooperman, B.S., Wang, Z.M., Liu, X.Z., et Rubin, H. (1995). Identification of lysines within alpha 1-antichymotrypsin important for DNA binding. An unusual combination of DNA-binding elements. *J Biol Chem* **270**, 14548 – 14555.

Nakanishi K., Maruyama M., Shibata T., et Morishima N. (2001). Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41237 – 41244.

Nar H, Bauer M, Stassen JM, Lang D, Gils A et Declerck PJ (2000). Plasminogen activator inhibitor 1. Structure of the native serpin, comparison to its other conformers and implications for serpin inactivation. *J Mol Biol* **297** : 683 – 695.

Ni, H., Blajchman, M.A., Ananthanarayanan, V.S., Smith, I.J., et Sheffield, W.P. (2000). Mutation of any site of N-linked glycosylation accelerates the in vivo clearance of recombinant rabbit antithrombin. *Thromb Res* **99**, 407 – 415.

Nogushi, T. et Kandatsu, M. (1969). Inhibition of autolytic breakdown of muscle proteins by the sarcoplasm and the serum of rat. *Agric. Biol. Chem. Short Communication*, **33**, 1226 – 1228.

« O »

O'Farrell, P.H., (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250** (10), 4007 – 4021.

O'Brien M.A. et Kirby R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, **18** (6) : 572 – 585.

Ohkubo K., Ogata S., Misumi Y., Takami N., Ikehara Y. (1991). Molecular cloning and characterization of rat contrapsin-like protease inhibitor and related proteins. *J. Biochem.* **109** : 243 – 250.

Olson S.T., et Gettins P.G.W. (2011). Regulation of Proteases by Protein Inhibitors of the Serpin Superfamily. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 99. Elsevier Inc. 185.

Ostergaard, H., Rasmussen, S.K., Roberts, T.H., et Hejgaard, J. (2000). Inhibitory serpins from wheat grain with reactive centers resembling glutamine-rich repeats of prolamin storage proteins. *J Biol Chem*, **275**, 33272 – 33279.

Ostergaard, O., Finnie, C, Laugesen, S., Roepstorff, P., et Svensson, B. (2004). Proteome analysis of barley seeds: Identification of major proteins from two-dimensional gels. *Proteomics* **4**, 2437 – 2447.

Otiewski, J., Jelen, F., Zakrzewska, M., et Oleksy, A. (2005). The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *Embo J* **24**, 1303 – 1310.

Ouali A, Rouchon P, Zabari M, Berri M, Zamora F, et Tassy C (1995). Natural serine and cysteine proteinase inhibitors in bovine skeletal muscle. *In* Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality Edited by: Ouali A, Demeyer D, Smulders FJM. Utrecht (NL): ECCEAMST; 173 – 198.

Ouali A. et Talmant A. (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, **28** (4) : 331 – 348.

Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Becila S., et Boudjellal A. (2006b). Maturation des viandes : Une nouvelle donne pour la compréhension de la maturation des viandes. *Viandes et Prod. Carnés*, **24** (6), 205 – 213.

Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L. et Sentandreu M.A. (2006a). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, **74** (1) : 44 – 58.

Ouali, A. (1990a). La maturation des viandes : facteurs biologiques et technologiques de variation ; *Viande Prod. Carnés*, **11**, 281 – 290.

Ouali, A. (1990b). Meat tenderisation : possible causes and mechanisms. A review. *J. Muscle Foods*, **1**, 129 – 165.

Ouali, A. (1991). Sensory quality of meat as affected by muscle biochemistry and modern technologies. *In* *Animal biotechnology and the quality of meat production*. Pp. 85-185. Edited by L. O. Fiems; B. G. Cottyn & D. I. Demeyer. Amsterdam: Elsevier Science.

Ouali, A. (1999). Structure and biochemistry of muscle as related to meat texture. Proc. 14th European Symposium of the Quality of Poultry Meat. *Bologna*, **1**, 91 – 121.

Ouali, A., Bige, L., Obled, A., Lacourt, A., et Valin, C. (1986). Small and high molecular weight proteinase inhibitors from bovine muscle. *In* : Cysteine proteinases and their inhibitors. Turk V. (ed.), Walter de Gruyter and co., New-York, USA, 545 – 554.

« P »

Padmanabhan J, Levy M, Dickson DW, Potter H (2006). Alpha1-antichymotrypsin, an inflammatory protein over expressed in Alzheimer's disease brain, induces tau phosphorylation in neurons. *Brain*, **129** : 3020 – 3034.

Pages G, Rouayrenc JF, Le Cam G, Mariller M, et Le Cam A. (1990). Molecular characterization of three rat liver serine-protease inhibitors affected by inflammation and hypophysectomy. Protein and mRNA analysis and cDNA cloning. *Eur J Biochem.* **190** (2) : 385 – 91.

Pak S.C., Kumar V., Tsu C., Luke C.J., Askew Y.S., Askew D.J., Mills D.R., Brömme D. et Silverman G.A. (2004). SRP-2 is a cross-class inhibitor that participates in postembryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: initial characterization of the clade L serpins, *J Biol Chem*, **279** (15) : 15448 – 15459.

Pak S.C., Tsu C., Luke C.J., Askew Y.S. et Silverman G.A. (2006). The *Caenorhabditis elegans* muscle specific serpin, SRP-3, neutralizes chymotrypsin-like serine peptidases. *Biochemistry*, **45** (14) : 4474 – 4480.

Pak, C.W, Flynn, K.C, et Bamberg J.R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Rev Neurosci* **9** : 136–147.

Parmar J, et Lomas D.A. (2000). Alpha-1-antitrypsin deficiency, the serpinopathies and conformational disease. *J R Coll Physicians Lond* **34** : 295 – 300.

Patston, P. A., Gettins, P., Beechem, J. et Schapira, M. (1991). Mechanism of serpin action: evidence that C1 inhibitor functions as a suicide substrate. *Biochemistry*, **30**, 8876 – 8882.

Patston, P. A., Hauert, J., Michaud, M. et Schapira, M. (1995). Formation and properties of C1-inhibitor polymers. *FEBS Letters* **368** (3) : 401 – 4.

Pearce MC, Cabrera LD, Rubin H, Gore MG et Bottomley SP (2004). Identification of residual structure within denatured antichymotrypsin : implications for serpin folding and misfolding. *Biochem Biophys Res Commun* **324** : 729 – 735.

Pearce, M. C., Powers, G. A., Feil, S. C., Hansen, G. M., Parker, W., et Bottomley, S. P. (2010). Identification and Characterization of a Misfolded Monomeric Serpin Formed at Physiological Temperature. *J. Mol. Biol.* **403**, 459 – 467.

Pearce, M.C., Pike, R.N., Lesk, A.M., et Bottomley, S.P. (2007). Serpin Conformations, pp : 35 – 66. In "Molecular and Cellular Aspects of the Serpinopathies and Disorders in

Serpin Activity (Silverman, G. A., & Lomas, D. A. 2007), World Scientific, Publishing Co., Singapore. 639 p.

Pelissier P., Delourme D., Germot A., Blanchet X., Becila S., Maftah A., Leveziel H., Ouali A. et Bremaud L. (2008). An original SERPINA3 gene cluster: elucidation of genomic organization and gene expression in the *Bos taurus* 21q24 region. *BMC Genomics*, **9** : 151.

Pérez-Borla O., Martone C.B. et Sánchez J.J. (1998). Protease I Inhibitor System in Fish Muscle : A Comparative Study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **119** (1) : 101 – 105.

Perlmutter, D. H., J. Travis et Punsal P. I. (1988). Elastase regulates the synthesis of its inhibitor, alpha 1-proteinase inhibitor, and exaggerates the defect in homozygous PiZZ alpha 1 PI deficiency. *J Clin Invest*, **81**, 1774 – 80.

Perona, J. J. et Craik, C. S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci* **4** (3) : 337 – 60.

Peterson, F.C. et Gettins, P.G.W. (2001). Insight into the mechanism of serpin-proteinase inhibition from 2D [1H-15N] NMR studies of the 69 kDa alpha 1-proteinase inhibitor Pittsburgh-trypsin covalent complex. *Biochemistry* **40**, 6284 – 6292.

Pierce, J. A., Jeppson, J.O. et Laurell, C.B. (1976). α_1 -antitrypsin phenotypes determined by isoelectric focusing of the cystein-antitrypsin mixed disulfide in serum. *Anal. Biochem.* **74**, 227 – 241.

Pizzo, S. V., A. E. Mast, S. R. Feldman et G. Salvesen (1988). In vivo catabolism of alpha 1-antichymotrypsin is mediated by the Serpin receptor which binds alpha 1-proteinase inhibitor, antithrombin III and heparin cofactor II. *Biochim Biophys Acta*, **967**, 158 – 62.

Plotnick, M. I., H. Rubin et N. M. Schechter (2002). The effects of reactive site location on the inhibitory properties of the serpin alpha-1-antichymotrypsin. *J Biol Chem*, **277**, 29927 – 29935.

Poirier, J., Ribadeau, J. L., Catila, M., Andre, J. M., Gherardi, R. et Bernaudin, J. F. (1999). *Histologie Moléculaire*. Eds, Masson, Paris. 430 pp.

Poller W, Faber J-P, Weidinger S, Tief K, Scholz S et al. (1993). A leucine-to-proline substitution causes a defective alpha-1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease. *Genomics*; **17** : 740 – 743.

Poller W, Willnow TE, Hilpert J et Herz J (1995). Differential recognition of α_1 -antitrypsin-elastase and α_1 -antichymotrypsin-cathepsin G complexes by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **270** 2841 – 2845.

Potempa, J., Enghild, T.J., et Travis, J. (1995). The primary elastase inhibitor (elastasin) and trypsin inhibitor (contrapsin) in the goat are serpins related to human α_1 -antichymotrypsin. *Biochem. J.* **306**, 191 – 197.

Potempa, J., Fedak, D., Dubin A., Mast, A., et Travis, J. (1991). Proteolytic inactivation of α_1 -antichymotrypsin. Sites of cleavage and generation of chemotactic activity. *J. Biol. Chem.* **226** : 21482 – 21487.

Potempa, J., Korzus, E., et Travis, J. (1994). The serpin superfamily of proteinases inhibitors : structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 15957 – 15960.

Powers, J., Gupton, B., Harley, B., Nishing, N., et Whitley, R. (1977). Specificity of porcine pancreatic elastase. Human leukocyte elastase and cathepsin G. *Biochim. Biophys. Acta.* **485** : 156-66.

« \mathcal{R} »

Rademacher, T.W., Parekh, R.B. et Dwek R.A. (1988). Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 785 – 838.

Ragg H., Lokot T., Kamp P.B., Atchley W.R. et Dress A. (2001). Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses. *Molecular Biology and Evolution*, **18** (4) : 577 – 584.

Ragg, H. (2007). The role of serpins in the surveillance of the secretory pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **64** : 2763 – 2770.

Rao, J.Y., Jin, Y.S., Zheng, Q., Cheng, J., Tai, J., et Hemstreet, G.P., (1999). Alterations of the actin polymerization status as an apoptotic morphological effector in HL-60 cells. *J. Cell Biochem.* **75**, 686 – 697.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P., et Barrett, A.J. (2004a). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue) : D160 – 164.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P., et Barrett, A.J. (2004b). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *The Biochemical Journal*, **378** : 705-716.

Ray C.A, Black R.A, Kronheim S.R, Greenstreet T.A, Sleath P.R, Salvesen GS, et al. (1992). Viral inhibition of inflammation : cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1beta converting enzyme. *Cell* ; **69** : 597 – 604.

Rehault S, Brillard-Bourdet M, Juliano MA, Juliano L, Gauthier F, et Moreau T. (1999). New, sensitive fluorogenic substrates for human cathepsin G based on the sequence of serpin reactive site loops. *J Biol Chem*; **274** (20) : 13810 – 13817.

- Reilly, C.F., Tewksbury, D.A., Schechter, N.M., et Travis, J. (1982).** Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem*; **257** : 8619-8622.
- Renatus M, Zhou Q, Stennicke HR, Snipas SJ, Turk D, et al. (2000).** Crystal structure of the apoptotic suppressor CrmA in its cleaved form. *Structure*. **8** : 789 – 797.
- Rennerre, M. (1999).** Biochemical basis of fresh meat color. *Proc. 45th ICoMST*, Tokyo, 344 - 53.
- Rheume, C. Goodwin, R.L. Latimer, J.J. Baumann, H. et Berger, F.G. (1994).** Evolution of murine α 1-proteinase inhibitors: gene amplification and reactive center divergence. *J. Mol. Evol.* **38** 121 – 131.
- Richards, G. P., Chao, L. et Chao, J. (1997).** Distribution of tissue kallikreins in lower vertebrates: potential physiological roles for fish kallikreins. *Comp. Biochem. Physiol.-C-Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **118**, 49 – 58.
- Riedl, S.J, et Shi Y. (2004).** Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5** : 897 – 907.
- Roberts T.H., Hejgaard J., Saunders N.F., Cavicchioli R. et Curmi P.M. (2004).** Serpins in unicellular Eukarya, Archaea, and Bacteria: sequence analysis and evolution. *Journal of molecular evolution*, **59** (4) : 437 – 447.
- Roberts, T.H., et Hejgaard, J. (2008).** Serpins in plants and green algae. *Funct Integr Genomics*. **8** (1) : 1 – 27.
- Roberts, T.H., Marttila, S., Rasmussen, S.K., et Hejgaard, J. (2003).** Differential gene expression for suicide-substrate serine proteinase inhibitors (serpins) in vegetative and grain tissues of barley. *J Exp Bot* **54**, 2251 – 2263.
- Roepstorff, P. et Fohlman, J. (1984).** Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601-609.
- Rouchon, P. (1995).** Inhibiteurs de masse moléculaire élevée des cystéine et des sérine protéinases du muscle squelettique: purification et caractérisation physico-chimique et cinétique. PhD Thesis, Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.
- Rubin, H., Wang, Z.M., Nickbarg, E.B., McLarney, S., Naidoo, N., Schoenberger, O.L., Johnson, J.L., et Cooperman, B.S. (1990).** Cloning, expression, purification, and biological activity of recombinant native and variant human α 1-antichymotrypsins. *J Biol Chem* **265**, 1199 – 1207.
- Rupinder S.K., Gurpreet A.K. et Manjeet S. (2007).** Cell suicide and caspases. *Vascular Pharmacology*, **46** (6) : 383 – 393.

« S »

Sabourin, L.A., Tamai, K., Seale, P., Wagner, J., et Rudnicki, M.A., (2000). Caspase 3 cleavage of the Ste20-related kinase SLK releases and activates an apoptosis-inducing kinase domain and an actindisassembling region. *Mol. Cell Biol.* **20**, 684 – 696.

Sahab, Z.G., Iczkowski, K.A. et Sang, Q.X.A. (2007). Anion exchange fractionation of serum proteins versus albumin elimination. *Analytical Biochemistry.* **368** : 24 – 32.

Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M, et Venkatachalam, M.A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med.* **107** : 489 – 506.

Sakamaki K. et Satou Y. (2009). Caspases : evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology,* **74** (4) : 727 – 753.

Salvesen, G. S. et Dixit, V. M. (1997). Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91** : 443 – 446.

Sanmart, N.M., Jaroszewski, L., Raikhel, N.V., et Rojo, E. (2005). Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiology.* **137**, 841 – 847.

Sawdy, J. C., Kaiser, S. A., St-Pierre, N. R. et Wick, M. P., (2004). Myofibrillar 1-d fingerprints and myosin heavy chain ms analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Science* **67** (3) : 421 – 426.

Schechter, I. et Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27** (2) : 157 – 62.

Schechter, N. M., Jordan, L. M., James, A. M., Cooperman, B. S., Wang, Z. M., et Rubin, H. (1993). Reaction of human chymase with reactive site variants of alpha1-antichymotrypsin. Modulation of inhibitor versus substrate properties. *J. Biol. Chem.* **268**, 23626 – 23633.

Schibler, L., Vaiman, D. et Cribiu, E. P., (2000). Origine du polymorphisme de l'ADN. *INRA Productions Animales Hors-série Génétique moléculaire* **37** – 43.

Schick, C, Pemberton, P.A., Shi, G.-P., Kamachi, Y., Çataltepe, S., Bartuski, A.J., Gornstein, E.R., Brômme, D., Chapman, H.A., et Silverman, G.A. (1998a). Cross-class inhibition of the cystein proteinase cathepsins K, L and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: A kinetic analysis. *Biochemistry* **37**, 5258 – 5266.

Schick, C., Bromme, D., Bartuski, A. J., Uemura, Y., Schechter, N. M. et Silverman, G.A. (1998b). The reactive site loop of the serpin SCCA1 is essential for cysteine proteinase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95** : 13465-13470.

Schmid, H.P., Engeler, D.S., Pummer, K., Schmitz-Drager, B.J. (2007). Prevention of prostate cancer : more questions than data. *Recent Results Cancer Res.* **174**, 101.

Schreuder, H. A., de Boer, B., Dijkema, R., Mulders, J., Theunissen, H. J., Grootenhuis, P. D. et Hoi, W. G. (1994). The intact and cleaved human antithrombin III complex as a model for serpin-proteinase interactions. *Nat Struct Biol* **1**(1) : 48 – 54.

Schulze, A. J., Baumann, U., Knof, S., Jaeger, E., Huber, R. et Laurell, C.-B. (1990). Structural transition of α_1 -antitrypsin by a peptide sequentially similar to B-strand s4A. *Eur. J. Biochem.* **194** : 51 – 56.

Schuster, M., Enriquez, P., Curran, P., Cooperman, B. et Rubin, H. (1992). Regulation of neutrophil superoxide by antichymotrypsin-chymotrypsin complexes. *J Biol Chem* **267** (8) :5056 – 5059.

Schwartzberg, S. J., Yoon, J. B., Sharp, H. L., et Seelig, S. (1989). Homologous rat hepatic protease inhibitor genes show divergent functional responses to inflammation. *Am. J. Physiol.*, **256**, C413.

Scott, F.L., Coughlin, P.B., Bird, C, Cerruti, L., Hayman, J.A., et Bird, P. (1996). Proteinase inhibitor 6 cannot be secreted, which suggests it is a new type of cellular serpin. *J Biol Chem* **271**, 1605 – 1612.

Sentandreu, M. A., Coulis, G. et Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.*, **13**, 400 – 421.

Sentandreu, M.A., Aubry, L. et Ouali, A. (2003). Purification of bovine cathepsin B : proteomic characterization of the different forms and production of specific antibodies. *Biochem. Cell. Biol.* **81**, 317 – 326.

Seyama K., Nukiwa T., Takabe K., Takahashi H., Miyake K. et Kira S. (1991). A new alpha 1-antitrypsin-deficient variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone. *Journal of Biological Chemistry*, **266** (19) : 12627 – 12632.

Sgorbissa A, Benetti R, Marzinotto S, Schneider C, et Brancolini C. (1999). Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro : implications for microfilament reorganization during apoptosis. *Journal of Cell Science*; **112** : 4475 – 82.

Siddiqui, A.A., Hughes, A.E., Davies, R.J.H., et Hill, J.A. (1980). The isolation and identification of α_1 -antichymotrypsin as a DNA-binding protein from human serum. *Bioch. Bioph. Res. Com* **95** (4) 1737 – 1742.

Silverman GA, Whisstock JC, Askew DJ, Pak SC, Luke CJ, Cataltepe S, et al. (2004). Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed

intracellular proteinases inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol Life Sci*; **61** : 301 – 325.

Silverman GA, Whisstock JC, Bottomley SP, Huntington JA, Kaiserman D, Luke CJ, Stephen C. Pak, Jean-Marc Reichhart, et Phillip I. Bird. (2010). Serpins flex their muscle : putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *J Biol Chem* ; **285** : 24299 – 24305.

Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J., et Whisstock, J. C. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem*; **276** : 33293 – 33296.

Silverman, G. A., et Lomas, D. A. (2007). Molecular and Cellular Aspects of the Serpinopathies and Disorders in Serpin Activity. World Scientific, Publishing Co., Singapore. 639 p.

Simonovic M, Gettins, P.G.W., et Volz, K. (2000). Crystal structure of viral serpin crmA provides insights into its mechanism of cysteine proteinase inhibition. *Protein Sci*; **9** : 1423 – 7.

Sinha, D., Yang, X., Emig, F. et Kirby, E.P. (1994). Isolation and characterization of two protease inhibitors from bovine plasma. *J. Biochem*, **115**, 387 – 391.

Sivasothy, P., Dafforn, T. R., Gettins, P. G. et Lomas, D. A. (2000). Pathogenic alpha 1-antitrypsin polymers are formed by reactive loop-beta -sheet A linkage. *J Biol Chem* **275** (43) : 33663.

Slowik, A., Borratynska, A., Turaj, W., Pera, J., Dziedzic, T., Figlewicz, D.A., Betlej, M., Krzyszkowski, T., Czepko, R., Szczudlik, A. (2005). α -1-Antichymotrypsin Gene (SERPINA3) A/T Polymorphism as a Risk Factor for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*, **36** : 737 – 740.

Smith, H.J., et Simons, C. (2005). Enzymes and their inhibition : drug development. (Eds). CRC Press.

Somarajan, B.I. Kalita, J., Misra, U.K., et Mittal, B. (2010). A study of α 1 antichymotrypsin gene polymorphism in Indian stroke patients. *Journal of the Neurological Sciences*, **290** : 57 – 59.

- Song Q, Wei T, Lees-Miller S, Alnemri E, Watters D, et Lavin MF (1997).** Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ;**94** : 157 – 62.
- Stein, P. E., Tewkesbury, D. A. et Carrell, R. W. (1989).** Ovalbumin and angiotensinogen lack serpin S-R conformational change. *Biochem J.* **262** : 103 – 107.
- Stein, P.E, et Carrell, R.W. (1995).** What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat Struct Biol*, **2** : 96 – 113.
- Stein, P.E, Leslie, A.G, Finch, J.T, et Carrell, R.W. (1991).** Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol* **221** : 941 – 959.
- Stennicke H.R. et Salvesen G.S. (1997).** Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *The Journal of Biological Chemistry*, **272** (41) : 25719 – 25723.
- Stennicke, H. R. et Salvesen, G. S. (1999).** Caspases: Preparation and characterization. *Methods*, **17**, 313.
- Stephan C, Jung K, Diamandis EP, Rittenhouse HG, Lein M, et Loening SA (2002).** Prostate-specific antigen, its molecular forms, and other kallikrein markers for detection of prostate cancer. *Urology* **59** : 2-8.
- Stratikos, E., et Gettins, P.G.W. (1999).** Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 4808 – 4813.
- Stratil A, Peelman LJ, Mattheeuws M, Van Poucke M, Reiner G, et Geldermann H (2002).** A novel porcine gene, alpha-1-antichymotrypsin 2 (SERPINA3-2) : sequence, genomic organization, polymorphism and mapping. *Gene*, **292** : 113 – 119.
- Stratil, A., Cizova, D., Gabrisova, E., Pavlik, M., Coppieters, W., Peelman, L., Van de Weghe, A., et Bouquet, Y., (1995).** Pig plasma α -protease inhibitors PI2, PI3 and PI4 are members of the antichymotrypsine family. *Comp. Biochem. Physiol.* **111B**, 53 – 60.
- Stratil, A., Cizova, D., Hojny, J., et Hradecky, J., (1990).** Polymorphism of pig serum α -protease inhibitor-3 (PI3) and assignment of the locus to the Pi1, Po1A, Po1B, Pi2, Igh linkage group. *Anim. Genet.* **21**, 267 – 276.
- Stratil, A., Gahne, B., Juneja, R.K., Hjerten, S., et Spik, G., (1988).** Pig plasma protease inhibitor gene complex: isolation and partial characterization of three inhibitors. *Comp. Biochem. Physiol.* **90B**, 409 – 418.
- Suarez-Huerta N, Mosselmans R, Dumont JE, et Robaye B. (2000).** Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*; **184** : 239 – 45.

Sviridov, D., Meilinger, B., Drake, S.K., Hoehn, G.T., et Hortin, G.L. (2006). Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC : Implications for Analysis of urinary albumin. *Clinical Chemistry*, **52** : (3) 389 – 397.

Swanson R, Raghavendra MP, Zhang W, Froelich C, Gettins PG, et Olson ST. (2007). Serine and cysteine proteases are translocated to similar extents upon formation of covalent complexes with serpins. Fluorescence perturbation and fluorescence resonance energy transfer mapping of the protease binding site in CrmA complexes with granzyme B and caspase-1. *J. Biol. Chem.* **282** : 2305–2313.

« T »

Takada, S., Tsuda, M., Matsumoto, M., Fujinami, S., Yamamura, M., et Katsunuma, T. (1988b). Incorporation of alpha-1-antichymotrypsin into human stomach adenocarcinoma cell nuclei and inhibition of DNA primase activity. *Tokai J Exp Clin Med* **13** : 321 – 327.

Takada, S., Tsuda, M., Yamamura, M., et Katsunuma, T. (1988a). Effect of alpha-1-antichymotrypsin on activity of DNA primase isolated from human stomach adenocarcinoma cells. *Biochem Int* **16** : 949 – 954.

Takahara, H. et Sinohara, H. (1982). Mouse plasma trypsin inhibitors : Isolation and characterization of alpha-1-antitrypsin and contrapsin, a novel trypsin inhibitor. *J Biol Chem* **257** : 2438 – 2446.

Tassy C., Herrera-Mendez C.H., Sentandreu M.A., Aubry L., Brémaud L., Péliissier P., Delourme D., Brillard M., Gauthier F., Levéziel H. et Ouali A. (2005). Muscle endopin 1, a muscle intracellular serpin which strongly inhibits elastase : purification, characterization, cellular localization and tissue distribution. *The Biochemical Journal*, **388** :273-280.

Tassy, C. (1998). Purification et caractérisation d'un inhibiteur de sérine protéinases à partir de muscle squelettique de bovin. PhD Thesis, EPHE, Paris.

Taylor, R.C. et Coorsen, J.R., (2006). Proteome resolution by two-dimensional gel electrophoresis varies with the commercial source of the IPG strips. *Journal of Proteome Research*, **5**, 2919 – 2927.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. **267** : 1456 – 62.

Tokes, Z. A., Gendler, S. J., et Dermer, G. B. (1981). *J. Supramol. Struc. Cell. Biochem.* **17**, 69 – 77.

Toyohara, H., Makinodan, Y., Tanaka, K. et Ikeda, S. (1983). Detection of calpastatin and a trypsin inhibitor in carp muscle. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1151 – 1154.

Travis, J., et Salvesen, G.S. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev. Biochem*, **52** : 655 – 709.

Travis, J. et Morii, M. (1981). Human α_1 -antichymotrypsin. *Meth. Enzymol.* **80**, 765 – 781.

Travis, J. et Pannell, R. (1973) *Clin. Chim. Acta* **49**, 49 – 52.

Travis, J., Bowden, J., Tewksbury, D., Johnson, D. et Pannell, R. (1976). *Biochem. J.* **157**, 301 – 306.

Travis, J., et Johnson, D. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84** : 219 – 24.

Travis, J., Gamer, D., et Bowen, J., (1978). Human alpha-1-antichymotrypsin : purification and properties. *Biochemistry* **17**: 5647 – 5651

Travis, J., Owen, M., George, P., Carrell, R., Rosenberg, S., Hallewell, R. A. et Barr, P. J. (1985). Isolation and properties of recombinant DNA produced variants of human alpha 1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **260** (7) : 4384 – 9.

Tsuda, M., Masuyama, M., et Katsunuma, T. (1986). Inhibition of human DNA polymerase alpha by alpha 1-antichymotrypsin. *Cancer Res* **46** : 6139 – 6142.

« U »

Uhrin, P., Dewerchin, M.(Hilpert, M., Chrenek, P., Schofer, C, Zechmeister-Machhart, M., Kronke, G., Vales, A., Carmeliet, P., Binder, B. R. et Geiger, M. (2000). Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility. *J Clin Invest* **106** (12) : 1531 – 1539.

« V »

Valin, C. (1982). Electrical stimulation in France. In *Meat science and technology*. Pp. 107-124. Edited by K. R. Franklin & H. R. Cross. Chicago: National Live Stock and Meat Board.

Valin, C. (1995). Animal and muscle variability in tenderisation: possible causes. In *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat*

quality. Pp. 435-442. Edited by A. Ouali; D. I. Demeyer & F. J. M. Smulders. Utrecht (NL): ECCEAMST.

Van De Water B, Kruidering M, et Nagelkerke JF. (1996). F-actin disorganization in apoptotic cell death of cultured rat renal proximal tubular cells. *American Journal of Physiology*; **70** : F593-603.

van Engeland, M., Kuijpers, H. J. H., Ramaekers, F. C. S., Reutelingsperger, C. P. M., et Schutte, M. (1997). Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp. Cell Res.* **235**, 421 – 430.

Van Gent D., Sharp P., Morgan K. et Kalsheker N. (2003). Serpins : structure, function and molecular evolution. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **35** (11) : 1536-47.

Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B, Treisman R (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* **316** : 1749–1752.

Vender, R.L. (1996). Therapeutic potential of neutrophil-elastase inhibition in pulmonary disease. *J Invest Med.* **44** : 531 – 539.

Vercammen, D., Belenghi, B., van de Cotte, B., Beunens, T., Gavigan, J.A., De Rycke, R., Brackenier, A., Inze, D., Harris, J.L., et Van Breusegem, F. (2006). Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *J Mol Biol.* **364**, 625 – 636.

Verdiere-Sahuque, M., Akaaboune, M., Lachkar, S., Festoff, B. W., Jandrot-Perrus, M., Garcia, L., Barlovatz-Meimon, G. & Hantai, D. (1996). Myoblast fusion promotes the appearance of active protease nexin 1 on human muscle cell surfaces. *Exp. Cell Res.*, **222**, 70 – 76.

Vleugels, N., Gils, A., Bijmens, A., Knockaert, I., et Declerck, P.J. (2000). The importance of helix F in plasminogen activator inhibitor-1. *Biochim Biophys Acta* 1476 : 20 – 26.

Voisinet B.D., Grandin T., O'Connor S.F., Tatum J.D. et Deesing M.J. (1997). *Bos indicus*-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. *Meat Science*, **46** (4) : 367 – 377.

« W »

Walsh, G. et Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1241 – 1252.

Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian RV, Keegan M, Herzog L, et Allen H. (1998). Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys.*, **356** (2) : 187 – 96.

Wang, Q. et Shaltiel, S. (2003). Distal hinge of plasminogen activator inhibitor-1 involves its latency transition and specificities toward serine proteases. *BMC Biochem* **4** : 5.

Wardell M.R, Chang W.S, Bruce D, Skinner R, Lesk A.M, et Carrell R.W. (1997). Preparative induction and characterization of L-antithrombin: a structural homologue of latent plasminogen activator inhibitor-1. *Biochemistry* **36** : 13133 – 13142.

Wei A, Rubin H, Cooperman BS, et Christianson DW. (1994). Crystal structure of an uncleaved serpin reveals the conformation of an inhibitory reactive loop. *Nat Struct Biol* **1**, 251 – 258.

Weil M, Raff, M.C., et Braga, V.M. (1999). Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol.* **9** : 361 – 4.

Whicher, T., Bienvenu, J., et Price, C.P. (1991). Molecular biology, measurement and clinical utility of the acute phase proteins. *Pure & App Chem.*, **63**, (8) : 1111 – 1116.

Whisstock J, Skinner R, et Lesk AM. (1998). An atlas of serpin conformations. *Trends Biochem Sci* **23** : 63 – 67.

Whisstock J.C, Skinner R, Carrell R.W et Lesk A.M. (2000). Conformational changes in serpins: I. The native and cleaved conformations of alpha(1)-antitrypsin. *J Mol Biol* **296** : 685 – 699.

Whisstock, J. C., Silverman, G. A., Bird, P. I., Bottomley, S. P., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pak, S. C., Reichhart, J. M., et Huntington, J. A. (2010). Serpins Flex Their Muscle : II. Structural Insights into target Peptidase Recognition Polymerization, and Transport Functions. *J. Biol. Chem.* **285**, 24307–24312.

Whisstock, J.C., et Bottomley, S.P. (2006). Molecular gymnastics: Serpin structure, folding and misfolding. *Curr Opin Struct Biol* **16** : 761 – 768.

Wilcox, P.E., Segal, D.M., Powers, J.C., Cohen, G.H., et Davies, D.R. (1971). Substrate binding site in bovine chymotrypsin A γ . Crystallographic study using peptide chloromethyl ketones as site-specific inhibitors. *Biochemistry* **10**, 3728–3737.

Wladyka, B., Kozik, A.J., Bukowski, M., Rojowska, A., Kantyka, T., Dubin, G., et Dubin, A. (2011). α_1 -antichymotrypsin inactivates staphylococcal cysteine protease in cross-class inhibition. *Biochimie.* **93** (5) : 948 – 953.

Wong, R. F., Chang, T. et Feinman, R. D. (1982). *Biochemistry.* **21**, 6 – 12.

Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, et Martin P. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*. **127** : 5245 – 52.

Wyllie A.H., Kerr J.F.K et Currie A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251 – 306.

« Y »

Yamamura, J., Y. Miyoshi, Y. Tamaki, T. Taguchi, K. Iwao, M. Monden, K. Kato & S. Noguchi. (2004) mRNA expression level of estrogen-inducible gene, alpha 1-antichymotrypsin, is a predictor of early tumor recurrence in patients with invasive breast cancers. *Cancer Sci*, **95**, 887 – 92.

Yamazaki Y, Tsuruga M, Zhou D, Fujita Y, Shang X, Dang Y, et al. (2000). Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damageinduced apoptosis. *Experimental Cell Research*; **259** : 64 – 78.

Yan, J.X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R.A., Westbrook, J.A., Wheeler, C.H. et Dunn, M.J. (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization- mass spectrometry. *Electrophoresis*, **21** : 3666 – 3672.

Ye J, Zhao J, HoVmann-Rohrer U, Grummt I (2008). Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* **22** : 322–330.

Yoo, B.-C, Aoki, K., Xiang, Y., Campbell, L.R., Hull, R.J., Xoconostle-Cazares, B., Monzer, J., Lee, J.-Y., Ullman, D.E., et Lucas, W.J. (2000). Characterization of *Cucurbita maxima* phloem serpin-1 (CmPS-1). *J Biol Chem* **275**, 35122 – 35128.

Yoon, D., Kueppers, F., Genta, R.M., Klintmalm, G.B., Khaoustov, V.I., et Yoffe, B. (2002). Rôle of alpha-1-antichymotrypsin deficiency in promoting cirrhosis in two siblings with heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency phenotype SZ. *Gut* **50**, 730 – 732.

Youle, R. J., et Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**, 657–663.

« Z »

Zamora, F. (1997). Variabilité biologique de l'attendrissage de la viande bovine : prédiction en fonction du facteur animal et du facteur type de muscle. PhD thesis, Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.

Zamora, F., Aubry, L., Sayd, T., Lepetit, J., Lebert, A., Sentandreu, M. A. et Ouali, A. (2005). Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Sci.*, **71**, 730 – 742.

Zamora, F., Debiton, E., Lepetit, J., Lebert, A., Dransfield, E. et Ouali, A. (1996). Predicting variability of ageing and toughness in beef M. *Longissimus lumborum et thoracis*. *Meat Sci.*, **43**, 321 – 333.

Zhou, A., Carrell, R. W. et Huntington, J. A. (2001). The serpin inhibitory mechanism is critically dependent on the length of the reactive center loop. *J Biol Chem* **276** (29) : 27541 – 7.

Zhou, A., Stein, P. E., Huntington, J. A. et Carrell, R. W. (2003). Serpin polymerization is prevented by a hydrogen bond network. That is centered on His-334 and stabilized by glycerol. *J. Biol. Chem.*, **278**, 15116-15122.

Zhou, A., Wei, Z., Read, R.J., et Carrell, R.W. (2006). Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood. *Proc Natl Acad Sci*, **103**, 13321-13326.

Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. (1994). Maspin, a serpin with tumor suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* **263** (5146) : 526 – 529.

La SERPINA3 ou l' α_1 -antichymotrypsine, est une glycoprotéine de la superfamille des serpines du groupe fonctionnel des inhibiteurs de peptidases de type sérine et cystéine. *In vivo*, la SERPINA3 humaine est une protéine plasmatique inhibant la cathepsine G, la chymotrypsine et la chymase. Mon travail avait pour objectif, la purification et la caractérisation de la SERPINA3 présumée être un inhibiteur spécifique de la caspase 3. La purification de l'inhibiteur est suivie d'une étude structure-fonction afin d'appréhender son rôle biologique.

Pour ce faire, un protocole de purification a été développé. La SERPINA3 a été ainsi purifiée du sérum humain par fractionnement au sulfate d'ammonium entre 50 et 80 % de saturation, suivi d'une série de chromatographies, la première est une chromatographie d'affinité sur HiTrap Bleu Sépharose 5 ml (1.6 x 2.5 cm) et la seconde d'échange anionique sur Q-Sépharose Fast Flow (2,5 x 10 cm), et enfin le pool fractionné ayant une inhibition antichymotrypsique élevée est réinjecté une seconde fois sur les mêmes supports chromatographiques suivant le même ordre.

Puis, l'identification de la masse moléculaire de l'inhibiteur purifié, par SDS-PAGE, l'identité avec un anticorps dirigé contre les bovSERPINA3 par western blot, l'identification de la protéine par spectrométrie de masse au MALDI-TOF et LC-MS/MS, le polymorphisme protéique par une focalisation isoélectrique (IEF) sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) et les activités enzymatiques contre la trypsine pancréatique bovine, la chymotrypsine du plasma bovin, l'élastase du neutrophile humain et la caspase 3 humaine ont été déterminés.

Enfin, les résultats obtenus par l'ensemble des techniques réalisées ont été très intéressants. Le poids moléculaire calculé pour la protéine est de 61 ± 4 kDa. L'étude nous a permis de mettre en évidence pour la première fois un polymorphisme protéique d'au moins cinq membres chez la SERPINA3 humaine et une inhibition croisée exprimée pour la caspase 3 d'environ 50 %. Cependant, il semblait qu'elle ne l'inhibait pas si efficacement que les SERPINA3 bovines. Quant à la trypsine et l'élastase, aucune inhibition n'a été enregistrée.

Mots clés : SERPINA3 humaine, serpines, purification, structure-fonction, chromatographies, activités enzymatiques, caspase 3, peptidases.

The SERPINA3 or α_1 -antichymotrypsin is a glycoprotein of the serpins superfamily, a functional inhibitors group of serine and cysteine peptidase-like. *In vivo*, human SERPINA3 is a plasma protein inhibiting cathepsin G, chymotrypsin and chymase. The aim of my study, is the purification and characterization of SERPINA3 presumed to be a specific inhibitor of caspase 3. The purification of the inhibitor is followed by a structure-function study to understand its biological role.

To do this, a purification protocol was developed. The SERPINA3 was thus purified from human serum by ammonium sulfate fractionation between 50 and 80 % saturation, followed by a series of chromatography, the first is an affinity chromatography on a HiTrap Blue Sepharose 5 ml (1.6 x 2.5 cm) and the second is an anion exchange chromatography on a Q-Sepharose Fast Flow (2.5 x 10 cm), and finally the fractionated pool with a high antichymotrypsin inhibition is re-injected a second time on the same chromatographic supports with the same order as upper.

Then, the identification of the molecular weight by SDS-PAGE of the inhibitor purified, the identity with an antibody directed against bovSERPINA3 by Western blot, identification of the protein by mass spectrometry by MALDI-TOF and LC-MS/MS, the protein polymorphism by isoelectric focusing (IEF) on a two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and enzyme activity against bovine pancreatic trypsin, bovine chymotrypsin, human neutrophil elastase and human caspase 3 were determined.

Finally, the results obtained by all techniques performed were very interesting. The molecular weight calculated for the protein is 61 ± 4 kDa. The study allows us to demonstrate for the first time a polymorphism of at least five members in the human SERPINA3 and a cross-class inhibition for caspase 3 which is approximately 50 %. However, it seemed that it didn't inhibited so effectively like the bovSERPINA3. As for trypsin and elastase, no inhibition was recorded.

Keywords : human SERPINA3, serpins, purification, structure-function, chromatography, enzyme activity, caspase 3, peptidase.

ال SERPINA3 أو α_1 - antichymotrypsine ،بروتين سكري من عائلة مثبطات ال SERPIN ذات الثبط من نوع سيرين و سيستين بيتداز . في الجسم الحي (*in vivo*) ، ال SERPINA3 الإنساني يعتبر بروتين بلازمي مثبط الكاتبسين G ، الكيموتريبسين و الكيماز . يهدف عملي هذا ، تنقية و تشخي ص وظيفة ال SERPINA3 التي يفترض أن تكون مثبط حقيقي ل Caspase3. تتبع عملية تنقية المثبط بدراسة بنية وظيفية لفهم دوره البيولوجي.

للقيام بذلك، تم وضع بروتوكول للتنقية . تنقية ال SERPINA3 من مصل دم الإنسان تمت بالتجزئيء بكيبرينات الامونيوم بين 50 - 80 % تشبع ، ثم تليها سلسلة من Chromatographies ، الأولى هي التقارب عبر HiTrap Bleu Sépharose 5 مل (2,5×1,6 سم) و الثانية هي تبادل الايون عبر Q-Sépharose ذو التدفق السريع (2,5 × 10 سم) ، و في الأخير ، أعيد حقن الحجم المصفى ذو التثبيط العالي للكيموتريبسين مرة ثانية على نفس Chromatographie بنفس الترتيب.

ثم ، تحديد الوزن الجزيئي للمثبط النقي ب SDS-PAGE ، الهوية بالجسام المضادة الموجهة ضد SERPINA3 البقري بطريقة الوسترن بلوت ، تحديد البروتين النقي بواسطة مطياف الكتلة MALDI-TOF و LC-MS/MS ، تعدد أشكال البروتين من خلال التركيز ال كهروساوي (IEF) فوق معقد استشراد ثنائي الابعاد (2DE) والأنشطة الانزيمية ضد تريپسين البنكرياس البقري ،كيموتريبسين البلازما البقري ، الالستاز الإنساني و ال Caspase3 تم تحديدهم خلال هذه الدراسة.

أخيرا، كانت النتائج التي تم الحصول عليها بواسطة جميع التقنيات المستعملة مثيرة جدا للاهتمام. الوزن الجزيئي المحسوب للبروتين هو 61 ± 4 كيلودالتون. هذه الدراسة سمحت لنا بإثبات لأول مرة أنتعد أشكال البروتين في ال ANIPRES3 الإنساني يصل إلى خمسة أعضاء على الأقل و قيمة تثبيط ثانوية مقابل Caspase3 تقارب 50 % ، لكن ، يبدو أنه لم تكن فعالة مقارنة ب SERPINA3 البقري . أما التريبسين و الالستاز، فلم يسجل لهما أي تثبيط.

الكلمات المفاتيح : SERPINA3 الانسان ، SERPIN ، التنقية ، بنية وظيفية ، Chromatographies ، الانشطة الانزيمية ، CASPASE3 ، بيتداز.