



HAL
open science

Caractérisation de protéines bovines potentiellement impliquées dans la reproduction : GPA2, GPB5, PDI, PEBP et ubiquitine

Maya Haj Hassan

► **To cite this version:**

Maya Haj Hassan. Caractérisation de protéines bovines potentiellement impliquées dans la reproduction : GPA2, GPB5, PDI, PEBP et ubiquitine. Sciences du Vivant [q-bio]. Université François Rabelais (Tours), 2011. Français. NNT: . tel-02807111

HAL Id: tel-02807111

<https://hal.inrae.fr/tel-02807111>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences et technologies

**UMR INRA-CNRS Physiologie de la reproduction et des comportements
Equipe Gonadotropines**

THÈSE présentée par :

Maya HAJ HASSAN

soutenue le : **13 décembre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie/Biologie de la reproduction

**Caractérisation de protéines bovines
potentiellement impliquées dans la
Reproduction :
GPA2, GPB5, PDI, PEBP et Ubiquitine**

THÈSE dirigée par :

Mr COMBARNOUS Yves

Directeur de recherche CNRS, INRA-CNRS Nouzilly

RAPPORTEURS :

Mme LEGAC Florence

Directeur de recherche INRA, INRA Rennes

Mr QUERAT Bruno

Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Diderot

JURY :

Mr COMBARNOUS YVES

Directeur de recherche CNRS, INRA-CNRS Nouzilly

Mme DUFOUR Sylvie

Directeur de recherche CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle

Mme DUITTOZ Anne

Professeur, Université François Rabelais

Mme LEGAC Florence

Directeur de recherche INRA, INRA Rennes

Mr QUERAT Bruno

Chargé de recherche CNRS, Université Paris-Diderot

A l'*âme* de mon cher oncle,
le docteur Chawki Haj Hassan

Remerciements

Merci tout d'abord aux membres de jury et qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie Mr. Bruno QUERAT et Mme Florence LEGAC pour avoir bien voulu être mes rapporteurs et merci à Mme Sylvie DUFOUR d'avoir accepté être l'examinatrice et de m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant une semaine. Je remercie enfin particulièrement le professeur Anne DUITTOZ, qui m'a beaucoup aidé surtout au cours de mon master (l'accueil, l'hébergement, la disponibilité et l'écoute) et qui a accepté de présider ce jury.

Toute ma reconnaissance va aux membres de l'équipe qui m'ont accueillie depuis mon stage de Master 2 jusqu'à l'aboutissement de cette thèse, ainsi qu'aux membres de mon comité de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, Yves COMBARNOUS, sans qui je n'aurai certainement pas pu accomplir ce travail, j'ai vraiment apprécié travailler en ta compagnie. Merci de m'avoir fait communiquer ta passion pour la science et ton enthousiasme, merci pour tes conseils, ton soutien, tes encouragements, tes corrections et aussi pour les grosses colonnes de purification et les kilos d'hypophyses ! Merci de m'avoir fait bénéficier de tes années d'expériences surtout pour les techniques de purification.

Mes encadrantes, Claire CAHOREAU et Eva ALVAREZ (Master), qui ont contribué à ma formation scientifique et technique. Merci beaucoup Claire d'avoir accepté de travailler avec moi et de continuer à faire avancer le sujet sans jamais renoncer face aux nombreuses difficultés que nous avons rencontrées. Merci pour toutes tes invitations et ton soutien moral. Je me rappellerai toujours de penser en premier aux contrôles !

Il m'est impossible d'oublier Danièle KLETT (la gentillesse est la noblesse de l'intelligence) avec qui j'ai partagé le bureau durant 3 ans. Merci pour tes aides précieux à réaliser les manipes, pour ton soutien scientifique et moral, ta patience et ton sourire. Tu as une façon extraordinaire pour communiquer le savoir scientifique.

Merci à la région Centre et au Département PHASE de l'INRA de m'avoir attribué une bourse de thèse de 3 ans, également à la direction de l'unité « Physiologie de la reproduction et des comportements de me recevoir en tant que thésarde.

Je tiens à remercier, plus particulièrement Svetlana USBEKOVA et Pascal PAPILLIER pour leurs encouragements, leurs qualités humaines et leurs grandes disponibilités surtout lorsqu'il s'agit de conseils scientifiques. Merci Sveta de m'avoir appris les bases des techniques d'immuno et merci Pascal pour toutes les fois où tu m'as cherché très tôt pour m'amener à l'abattoir et pour les manipes qu'on a faites ensemble...

Betty FUMEL et Leslie ANGULO pour leur amitié, leur soutien et leur aide. Merci Betty pour m'avoir expliqué comment utiliser le microtome, pour toutes les fois où tu m'as ramené à la maison, pour tes petits mails surtout pendant la période de rédaction. Leslie je me rappellerai toujours des moments partagés sous la hotte avec tes petites vaches (Blastocystes).

Christophe STAUB et Guillaume TSIKIS pour m'avoir fait partager une partie de leur savoir. Merci Christophe pour tes excellentes explications et tes précieux conseils, pour les échantillons, les techniques (la cyto centrifuge que je garde en tête) et les épices. Guillaume, c'était avec un grand plaisir que j'ai effectué les gels 2D avec toi.

Matthieu KELLER et Mélanie VOSGES pour la réalisation des manipes d'immuno sur la souris et le poisson zèbre. Merci à vous deux de m'avoir accordé de votre temps et merci pour l'analyse des résultats et le temps passé devant le confocal.

Je souhaite ici remercier les gens qui m'ont aidé à réaliser des manipes, à franchir des difficultés techniques, à me fournir des échantillons ou même pour les simples discussions enrichissantes : Christine PERREAU et Florence GUIGNOT, Ghylène GOUDET, Joëlle DUPONT, Rozenn DALBIES, Jean-Noël COUET, Valérie LABAS, Lucie SPINA, Grégoire HARICHAUX, Maryse MEURISSE, Fabrice VINCENT, Yann LOCATELI, Nicole JOUHANNEAU, Jean-Louis DACHEUX, Cecille JOLLY (Merci pour tes explications détaillées pour les hybridations in Situ, très bonne semaine à coté de toi)...

Des remerciements également à tous les thésards et au personnel de la PRC, plus particulièrement Elodie DESROZIERES, Camille MESLIN (Merci à toutes deux de m'avoir hébergée quand je suis arrivée à Tours), Stéphanie COYRAL-CASTEL , Daphné BRISARD et Camille MANSANET (merci pour l'énergie positive), Ashraf ADIB et Amanda CORDOVA (merci pour les moments partagés surtout à la cantine), Mélanie JOUHANNEAU et Sarah GELLER (pour nos petites discussions) , Maïna BRUS, Julien GAGNEUX, Jean-Yves DURBIZE (j'ai découvert l'acrylique grâce à toi, merci d'avoir ajouté des couleurs à ma vie), , Julie MARIOT, Jessica ROY, Anne-Lyse LAINE, Patrick TREZY, Fernando BORJA, Ghislaine PLOUX, Gaël Ramé...

Je tiens également à remercier des personnes qui en dehors du cadre de la thèse, ont participé à mon épanouissement personnel et ont facilité mon intégration dans la vie à Tours et avec qui j'ai développé une grande amitié : Krystina M.NGOU MILAMA (tu es une richesse culturelle, j'adore nos discussions), Carlos GUERRA (ta cuisine me manque), Antoine SAVOIE (tu es un vrai ami, merci pour ton soutien continu et ton accueil), André DUFOUR (merci pour la culture française et les cours d'histoire), Arlette ESTOUP (un grand merci), Jean-Marie RAMEAU, Carlos MORGADINHO, Adeline BRIANT-MAUVENU, Marie NALLET et Alice AVELINE (Merci pour tous les moments partagés au Club de Karaté de touraine, je vous aime beaucoup), François MEURISSE (mon meilleur prof de sport, tes randos vont me manquer !) et tous mes amis randonneurs ; Guillaume CANU (organisateur de Campings sauvages), Manu SPINETTA, Marine LARDEAU, Amélie MORIN, Imane BOUMART, Sleiman, Aurélie,...

Je remercie aussi le petit groupe d'étudiants avec qui j'ai passé les meilleurs moments et les meilleures vacances même si on est resté à la résidence Grandmont : Raghda SOURANI, Bilal DJABIR, Jamal BOUAZIZ, Mouhamad SALHAB, Ramez WANNOUS, Yara et Mazen SALLOUM, Abadallah SALAMEH, Soumayyeh et Jawad NADAF.

Sous oublier mes amis lointains, qui à distance, ont pu me soutenir d'une façon ou d'une autre. Merci Lara MAADARANI, Nadine ABOU-KHODOR, Tony SALIBA, Walid MERHY, Abir CHAMANDY, Sana TFAILY, Assia HIJAZI, Lola SAHMARANI et Kamel KASSEM (j'aurai souhaité de tout mon cœur que tu sois encore parmi nous, tu me manques énormément, je te dédie ma réussite).

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes proches. Pas besoin de vous dire combien je vous aime et que c'est votre confiance en moi et vos encouragements qui m'ont aidé à supporter les difficultés d'éloignement. C'est à eux que je dois aussi toute ma reconnaissance : à mes parents Adel et Howaida, mon frère Ziad et sa femme Manale , mon frère Bassam, ma petite sœur Jana (la petite architecte) et son fiancé Abass GHOSN (Monsieur le Lieutenant !) et mon Benoit AVRIL (tu cherchais ton nom ? Tu fais partie de la famille maintenant ! Merci pour tout ce qu'on a partagé durant ces dernières années. Ta présence à mes côtés m'a beaucoup apporté et, est en soi une fortune.)

C'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme. J'ai forcément oublié de citer des personnes, je m'en excuse par avance auprès d'elles !

Résumé

Les hormones glycoprotéiques (LH, FSH, TSH, CG) sont présentes uniquement chez les vertébrés et sont constituées d'une sous-unité α commune dans une même espèce et d'une sous-unité β spécifique de chaque hormone. Deux gènes, *gpa2* et *gpb5* apparentés à ceux des sous-unités α et β respectivement ont été découverts à la fois chez les vertébrés et les invertébrés. Chez les mammifères, l'hétérodimère artificiel obtenu par couplage chimique covalent des protéines recombinantes GPA2 et GPB5, active le récepteur de TSH. La structure quaternaire réelle de GPA2 et GPB5 reste sujette à caution et nous avons initié un travail de clonage qui devra permettre à terme de purifier les GPA2 et GPB5 recombinantes puis naturelles et ainsi déterminer si elles sont monomériques, ou possèdent une structure quaternaire, homo-dimériques ou hétérodimériques (Article 3). Dans l'attente de pouvoir réaliser ce travail sur GPA2 et GPB5 nous avons peaufiné les outils immunochimiques nécessaires pour l'étude de la stabilité des hétérodimères de FSH et LH humaines, ovines et bovines. Nous avons ainsi montré la relative fragilité thermique de la structure quaternaire de la FSH bovine par rapport aux FSHs ovine et humaine (Article 1). Comme les gonadotropines possèdent une activité PDI (Protein Disulfide Isomérase), nous avons la perspective d'étudier si les GPA2 et GPB5 possèdent la même activité, soit à l'état monomérique ou dimérique. Dans l'attente de produire ces protéines, nous avons étudié les propriétés de l'activité enzymatique de la PDI bovine hépatique vis-à-vis de divers perturbateurs endocriniens (Article 2).

Un hasard expérimental nous a amené à nous intéresser à la Phosphatidyl-Ethanolamine-Binding Protein (PEBP), une protéine ubiquiste de 21 kDa présentant un très grand nombre de fonctions dans le domaine de la reproduction, les voies de signalisation et une des causes possibles de diverses maladies (cancer, maladie d'Alzheimer, diabète, etc..). Nous avons développé une méthode originale de purification de la PEBP-1 testiculaire bovine par chromatographie d'interaction hydrophobe à très haute concentration de sulfate d'ammonium (Article 4). A partir de la protéine purifiée, nous avons produit chez le lapin des anticorps spécifiques contre la protéine native qui nous ont permis d'être les premiers à développer un dosage ELISA fiable. Par immunohistologie, nous avons également pu montrer l'expression de la PEBP-1 à la surface des spermatozoïdes bovins et porcins, dans les tubes séminifères bovins ainsi que dans l'hippocampe et le cortex cérébral de souris et de poisson zèbre. Ces localisations sont en accord avec les diverses fonctions précédemment décrites pour cette protéine et montrent que nos anticorps peuvent être utilisés dans diverses espèces de vertébrés (Article 5).

Mots-clés FSH – LH – TSH – CG – GPA2 – GPB5 – Protein Disulfide Isomerase – Phosphatidyl-ethanolamine-binding protein – Elisa – Chromatographie d'interaction hydrophobe – Perturbateurs endocriniens – Hippocampe – Testicule – Spermatozoïdes – maladie d'Alzheimer.

Résumé en anglais

Glycoprotein hormones (LH, FSH, TSH, and CG) are present only in vertebrates and consist of a common α subunit within a species and a specific β subunit for each hormone. Two novel genes *gpa2* and *gpb5* related to those of α and β subunits, respectively, were found in both vertebrates and invertebrates. In mammals, the artificial heterodimer obtained by covalent chemical coupling of recombinant GPA2/GPB5 proteins activates the TSH receptor. The genuine quaternary structure of GPA2/GPB5 remains unknown. We initiated a cloning procedure that has eventually led to the purification of recombinant GPA2 and GPB5 and later is expected to allow that of the natural ones in order to determine whether they are monomeric, or possess a quaternary structure, homo-dimeric or heterodimeric (Article 3). Before performing this work with GPA2 and GPB5, we refined the immunochemical tools necessary to study the stability of heterodimeric human, sheep and cattle FSH and LH. We have shown the relative fragility of the thermal quaternary structure of bovine FSH compared to sheep and human FSH (Article 1).

Since gonadotropins have a PDI (Protein disulfide isomerase) activity, we plan to study whether GPA2 and/ or GPB5 exhibit the same activity. Before GPA2 and/or GPB5 become available, we studied the effect of various endocrine disruptors on the enzymatic activity of bovine liver PDI (Article 2).

By chance, we obtained antibodies against the phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP), a 21 kDa ubiquitously protein with a large number of functions in different domains such as reproduction, signaling pathways and involved in various diseases (cancer, Alzheimer's, diabetes...). We have developed an original method for purification of testicular bovine PEBP-1 by hydrophobic interaction chromatography at very high ammonium sulfate concentration (Article 4). Once the purified protein was obtained, we produced specific antibodies against the native protein in rabbits that allowed us to be the first to develop a reliable ELISA assay.

By immunohistology, we showed the expression of PEBP-1 on the surface of bovine and porcine spermatozoa, in bovine seminiferous tubules and the hippocampus and cerebral cortex of mice and zebrafish. The PEBP distribution is consistent with the various functions previously described for this protein and shows that our antibodies can be used in various vertebrate species (Article 5).

Keywords FSH – LH – TSH – CG – GPA2 – GPB5 – Protein Disulfide Isomerase – Phosphatidyl-ethanolamine-binding protein – Elisa –Hydrophobic Interaction Chromatography – Endocrine disruptors – Hippocampus – Testis – Spermatozoa – Alzheimer.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	6
Résumé en anglais	7
Table des matières	8
Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
Liste des abréviations	14
Introduction	15
Première partie Ancêtres moléculaires des sous-unités $\alpha\beta$ des hormones glycoprotéiques	17
Le système endocrinien	17
L'axe hypothalamo-hypophysaire	19
Les hormones glycoprotéiques	21
Les gonadotropines	22
La thyrotropine (TSH)	24
Caractéristiques structurales des hormones glycoprotéiques (GPH)	25
Structure peptidique	25
Structure polysaccharidique	27
Les glycoprotéines alpha-2(GPA2) et beta-5 (GPB5), nouveaux membres de la famille des GPH	28
Caractéristiques structurales	29
Caractéristiques fonctionnelles	29
Localisations et distributions tissulaires	33
Deuxième partie Les PEBP	37
Structure de PEBP/RKIP	40
RKIP et signalisation cellulaire	42
RKIP et la voie MAP-Kinases Raf-1-/MEK/ERK	43
RKIP et NF- κ B	45
RKIP et GPCR	46
RKIP et protéases à sérine	47
RKIP et reproduction	48
RKIP et cancer	50

RKIP et apoptose.....	51
RKIP et HCNP	52
RKIP et la maladie d'Alzheimer (AD).....	54
RKIP et diabète	55
RKIP dans le règne végétal	56
Les objectifs	60
Résultats	63
Article 1 - Differential thermal stability of human, bovine and ovine Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) quaternary structures (In preparation).....	65
Article 2 - Potentiation of the reductase activity of protein disulfide isomerase (PDI) by 19-nortestosterone, bacitracin, fluoxetine, and ammonium sulfate (Published).....	71
Article 3 - Identification and cloning of bovine Glycoprotein Hormone β and α subunits-related molecules: GPB5 and GPA2 (In preparation).....	80
Article 4 - Straightforward isolation of phosphatidyl-ethanolamine-binding protein-1 (PEBP-1) and ubiquitin from bovine testis by hydrophobic-interaction chromatography (HIC) (Published)	92
Article 5 - Immunodetection of RKIP/PEBP by Enzyme-ImmunoAssay (EIA) and Immunohistochemistry (IHC) (In preparation)	99
Matériels & Méthodes	120
Technique de biologie moléculaire	121
Manipulation des acides nucléiques	121
Extraction d'ARN	121
Synthèse des ADNc.....	123
Clonage des produits PCR.....	125
Digestion de l'ADN et insertion dans les vecteurs d'expression	129
Séquençage d'ADN.....	131
Synthèse des ribosondes.....	131
Hybridation sur lame	133
Technique de Biochimie.....	139
Purification et isolement des protéines.....	139
Les étapes de la purification.....	139
Analyse des protéines.....	141
Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	141

Electrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide (2D-PAGE)	142
Révélation des protéines sur gel	143
Immunodetection des protéines par Western Blot	144
Immunodétection par immunohistochimie.....	145
Conclusion et perspectives	151
Bibliographie	155
Résumé	166
Résumé en anglais	166

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1. Quelques homologues de PEBP/RKIP.....	40
Tableau 2. Les différentes espèces chez qui, la structure cristallographiques de la PEBP a été résolue avec leurs numéros d'accession PDB.....	412
Tableau 3. Gènes candidats pour leur rôle dans la suppression des métastases.....	50

Résultat

Article 3

Tableau 1. Sequences of primers used for RT-PCR cloning of GPA2 and GPB5 cDNA.....	84
--	----

Matériel et méthodes

Tableau 1. Les différents clones gpa2 et gpb5	132
Tableau 2. Quelle quantité de sulfate d'ammonium, faut-il ajouter ?.....	142
Tableau 3. Composition des gels d'électrophorèse monodimensionnelle.....	144

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Les hormones de l'hypophyse et leurs différents rôles.....	20
Figure 2. Dessin schématique de la famille à cystine knot	22
Figure 3. Comment GPB5 affecterait le métabolisme et la perte du poids.....	31
Figure 4. Hypothèse de l'activité paracrine et des mécanismes régulateurs de la thyrostimuline-TSHR dans les ovaires.....	32
Figure 5. La région N- terminale du domaine kinase de Raf-1 qui est impliqué dans l'interaction avec RKIP.....	41
Figure 6. Principales voies de signalisation cellulaires.....	43
Figure 7. RKIP et les voies de signalisations cellulaires.....	46
Figure 8. Expression de RKIP dans le cerveau de souris.....	55
Figure 9. Modèle d'interaction du FD avec FT et TFL1.....	57
Figure 10. FT transporté par le phloème des feuilles au méristème apical où il interagit directement avec le facteur de transcription FD.....	59

Résultats

Article 2

Figure 1. Kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by protein disulphide isomerase in the presence of various concentrations (0–10 ⁻⁴ M) of melatonin, auxin, serotonin or metoprolol.....	75
Figure 2. Kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by protein disulphide isomerase in the presence of various concentrations (0–10 ⁻⁴ M) of bisphenol A. BPA, bisphenol A; RFU, relative fluorescence unit.....	76
Figure 3. Effect of increasing concentrations of bacitracin (BAC) on protein disulphide isomerase (PDI) reductase activity.....	77
Figure 4. Kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by protein disulphide isomerase in the presence of various concentrations (0, 10 ⁻⁴ , 10 ⁻³ M) of fluoxetine (FLX).....	77
Figure 5. Kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by protein disulphide isomerase in the presence or absence of 0.5 M ammonium sulphate.....	78
Figure 6. Inhibition of protein disulphide isomerase (PDI) reductase activity by diethylstilbestrol (DES) in the presence of a potentiating concentration of 19-nortestosterone (19-NT).....	78
Figure 7. Inhibition of protein disulphide isomerase (PDI) reductase activity by ethynylestradiol (EE2) in the presence of a potentiating concentration of fluoxetine (FLX).....	79

Article 3

Figure 1. Deduced protein sequence of bovine GPB5 (accession no. XP_002691074) and bovine GPA2 (accession no. XP_002699382).....	86
Figure 2. Amplification of bovine GPB5 and GPA2 cDNA by PCR.....	87
Figure 3. Distribution of gpa2 in bovine tissues.....	87
Figure 4. Enzymes restriction sites included in primers structure.....	88

Article 4

Figure 1. Hydrophobic Interaction Chromatography of the soluble fraction after 80% ammonium sulfate saturation precipitation of the proteins extracted from bovine testes.....	95
Figure 2. 2D-SDS-PAGE of fraction III from Hydrophobic Interaction Chromatography.....	96
Figure 3. Size-exclusion chromatography of fraction III from hydrophobic interaction chromatography on Superdex HR 75.....	96
Figure 4. Comparison of bovine PEBP with recombinant PEBP expressed in E. coli and effect of mercaptoethanol reduction. (Upper panel) SDS-PAGE and coomassie blue staining. (Lower panel) SDS-PAGE and ponceau red staining (left) and Western blotting (right).	97
Figure 5. (A) MALDI-TOF of fraction 3 from size-exclusion chromatography on Superdex HR 75 (B) MALDI-TOF of fraction 4 from size-exclusion chromatography on Superdex HR 75	98

Article 5

Figure 1. Immunolocalisation of PEBP in young bovine testes, using an anti-PEBP antiserum.	105
Figure 2. Immunolocalisation of PEBP on bovine and porcine spermatozoa in both conditions noncapacitated and experimentally capacitated.....	106
Figure 3. Localization of PEBP in an expanded bovine blastocyst viewed under fluorescent microscopy at 200X.....	108
Figure 4. Schematic representation of PEBP distribution on sagittal meridional section of adult zebrafish with one micrograph of the optic tectum.	108
Figure 5. Schematic representation of PEBP distribution on coronal section of adult mouse brain with some micrographs.....	109

Matériel et méthodes

Figure 1. Carte et site de multiclonage du vecteur pGEM-T-Easy	127
Figure 2. Construction de vecteur d'expression.	133
Figure 3. Un cytofunnel.....	148

Liste des abréviations

9NC	9 nitrocamptothécine
a.a	Acide aminé
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
AD	Alzheimer Disease
APP	Amyloid Precursor Protein
CBY	Carboxypeptidase Y
CEN	Centroradialis
CGH	Corticotroph-Derived Glycoprotein Hormone
Cys	Cystéine
DF	Facteur décapacitant
DF-R	Decapacitation factor receptor
DiE-GSSG	Di-Eosin oxidized Gluthathion
DSS	Disuccinimidyl suberate
EIA	Enzyme Immuno Assay
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FSH	Follicle Stimulating Hormone
FT	Flowering LocusT
GH	Growth Hormone
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
GPH	Glycoprotein Hormone
HCNP	Hippocampal Cholinergic neuropeptide
HEK	Human Embryonic Kidney
IL-1 β	Interleukine-1 β
ISH	In Situ Hybridization
I κ B	Inhibiteurs de κ B
IKK	I κ B kinase
LH	Luteinizing hormone
LPS	Lipopolysaccharides
MAP	Mitogen Activated Protein
MAPK	Mitogen Activated Potein Kinase
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
NIK	NF- κ B inducing kinase
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OGH	Orphan Glycoprotein Hormone
PAF	Paraformaldéhyde
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PE	Phosphatidyl-Ethanolamine
PEBP	Phosphatidyl-ethanolamine-binding protein (=RKIP)
PN-1	Protease-nexine-1
PRL	Prolactine
PSI	Presenilin 1
RKIP	Raf Kinase inhibitory protein (=PEBP)
RTSH	TSH receptor
SP	Self Pruning
TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase-1
TFL1	Terminal Flower 1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor
TRH	Thyroid Releasing Hormone
TSH	Thyroid stimulating hormone

Introduction

Chez tous les vertébrés, trois hormones glycoprotéiques FSH, LH, TSH sont sécrétées par l'hypophyse et jouent des rôles primordiaux dans les contrôles de la reproduction et du métabolisme. Ces hormones formées par l'association non-covalente de sous-unités α et β , n'existent pas chez les invertébrés. Cependant, chez pratiquement tous les invertébrés comme chez tous les vertébrés, des gènes appelés *gpa2* et *gpb5*, apparentés respectivement à ceux des sous-unités α et β des hormones glycoprotéiques sont retrouvés par des analyses *in silico*. Par conséquent, les protéines **GPA2** et **GPB5** codées par ces gènes *gpa2* et *gpb5* doivent jouer un ou plusieurs rôles absolument primordiaux et représentent sans doute, les ancêtres moléculaires des sous-unités α et β des hormones glycoprotéiques.

Cette étude était notre objectif initial et a conduit, récemment et donc tardivement au cours de ma thèse, à l'obtention de résultats intéressants.

Pendant la période difficile, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une autre protéine que nous avons transitoirement prise pour la GPB5 sur la base de résultats d'immuno-détection. Cette protéine, une Phosphatidyl-Ethanolamine Binding Protein (**PEBP-1**) s'est révélée intéressante du fait de la multitude de ses fonctions dans le champ de la Reproduction et du fait aussi de la large répartition phylogénétique de la famille des PEBPs des bactéries aux plantes et aux animaux.

L'étude de cette protéine a essentiellement occupé ma dernière année de thèse et ouvre, me semble-t-il, des perspectives intéressantes.

L'introduction de ce manuscrit sera donc divisée en deux parties. Dans la première, nous faisons un rappel concernant les hormones glycoprotéiques (gonadotropines et thyérotropines) et leurs structures (peptidique et glycanique), suivi par la découverte de GPA2 et de GPB5 (structure, distribution, rôles...). Dans la deuxième partie, nous présentons une synthèse bibliographique sur la Phosphatidyl-Ethanolamine Binding Protein (**PEBP**).

Les résultats seront présentés sous forme d'articles scientifiques. Il s'agit d'articles en préparation (article 1, 3 et 5), et publiés (article 2 et 4).

Première partie
Ancêtres moléculaires
des sous-unités α et β des hormones
glycoprotéiques

Le système endocrinien

Le système endocrinien et le système nerveux régulent divers processus physiologiques longs ou même continus tels que la croissance, le métabolisme, la différenciation sexuelle, l'osmorégulation et l'homéostasie par l'intermédiaire de médiateurs chimiques appelés hormones qui agissent sur des récepteurs spécifiques au niveau de leurs organes cibles.

La structure du système endocrinien a particulièrement été conservée au cours de l'évolution. Ses fonctions ont quant à elles connu des spéciations concernant les hormones, les récepteurs propres aux tissus de l'organisme et leurs cibles.

Les systèmes neurosécrétoires sont déjà bien développés chez les invertébrés. La structure et la fonction de leurs organes sont bien spécialisées pour réguler la fonction endocrine.

Par exemple, chez les cnidaires, on trouve des cellules neurosécrétrices qui sécrètent des neuropeptides dont le rôle principal est de contrôler l'alimentation, la reproduction et le développement. L'entrée en mue, la métamorphose et la maturation des gonades chez les insectes dépendent essentiellement de la production, au niveau des cellules neurosécrétrices cérébrales et de la glande prothoracique, d'une hormone prothoracotrope (PTHH, ecdysiotropine, prothoracotropine). Le développement des crustacés, comme celui des insectes, se fait par mues successives accompagnées de changements morphologiques importants de type métamorphique : l'organe X produit une hormone inhibitrice ou MIH pour molt inhibiting hormone qui à son tour inhibe la production d'une hormone de mue de type ecdystéroïde, comparable à celle des insectes et produite au niveau de l'organe Y. La reproduction et la maturation génitale et la vitellogenèse chez les céphalopodes, plus précisément les octopus, sont sous le contrôle de la glande optique (Di Cosmo and Di Cristo, 1998). Cependant, la plupart des invertébrés n'ont pas d'organes endocriniens spécialisés pour la sécrétion d'hormones ; à l'inverse, chez les vertébrés existent des glandes endocrines bien individualisées (thyroïde, surrénale, hypophyse...) ou non (testicule, pancréas, hypophthalmus...). L'hypophyse en relation fonctionnelle étroite avec l'hypothalamus joue un rôle central intégrateur de l'ensemble du système endocrine.

L'axe hypothalamo-hypophysaire

Chez les vertébrés, l'axe hypothalamo-hypophysaire est crucial pour la transformation de l'information neuronale encéphalique en signaux chimiques transportés par la circulation sanguine vers les organes cibles. Ce système est composé comme son nom l'indique, de deux organes, l'hypothalamus et l'hypophyse, tous deux connectés structurellement et fonctionnellement. L'hypothalamus constitue la partie basale du diencephale tandis que les deux parties de l'hypophyse, la neurohypophyse et l'adénohypophyse sont situées sous l'hypothalamus. La neurohypophyse reçoit les prolongements des cellules neurosécrétrices de différents noyaux hypothalamiques. Chez les Tétrapodes, l'adénohypophyse se prolonge vers l'hypothalamus en un système porte-hypophysaire par contre chez les Téléostéens, l'hypophyse est innervée directement par des neurotransmetteurs hypothalamiques impliqués dans la régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires.

Les neurones hypothalamiques secrètent des petits neurohormones, comme les hormones neurohypophysaires qui sont soit des vecteurs de stimulation (libérines) ou des vecteurs d'inhibition (statines). Chez les tétrapodes, ces substances sont secrétées dans le sang au niveau des anses capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire où elles arrivent vers le réseau capillaire du lobe antérieur de l'hypophyse. Les hormones hypophysaires ciblent à leur tour des organes endocrines périphériques comme les gonades et la thyroïde pour les amener à libérer les hormones adéquates dans le sang. Un mécanisme de Feed-back ou rétrocontrôle s'exerce au niveau hypophysaire et/ou hypothalamique permettant un contrôle des quantités circulantes d'hormones périphériques (stéroïdes, T4, adrénaline...).

L'adénohypophyse et la neurohypophyse dérivent de deux origines embryonnaires différentes. L'adénohypophyse dérive de l'invagination de l'ectoderme (oral ectoderm) au niveau du stomodeum ou bouche primitive pour donner la poche de Rathke, au dessous du diencephale. Elle se différencie en trois régions : *pars distalis*, *pars tuberalis* et *pars intermedia*. L'adénohypophyse est donc avant tout un tissu glandulaire, tandis que la neurohypophyse provient des terminaisons neuronales des neurones hypothalamiques. Ce tissu d'origine nerveuse donne naissance au *pars nervosa* de l'hypophyse et à l'éminence médiane.

Il existe six types de cellules endocrines de l'antéhypophyse. La proopiomelanocortine ou POMC qui est clivée pour donner l'hormone adrénocorticotrope ou ACTH dans « les

corticotropes » et la mélanotropine ou α -MSH dans « les mélanotropes », l'hormone de croissance ou GH dans « les somatotropes », la prolactine ou Prl dans « les lactotropes », la thyrostimulone ou TSH dans « les thyrotropes », l'hormone lutéinisante ou LH et la folliculostimulante ou FSH dans « les gonadotropes ». Le dernier type cellulaire est le « Rostral tip thyrotrope » qui disparaît chez l'adulte. Les mécanismes moléculaires et biochimiques qui déterminent les destins des cellules endocriniennes antéhypophysaires ont été étudiés. Ces études ont mis en évidence quelques facteurs ou signaux (LIM homoeodomain, paired-like homoeodomain, bicoid-like homeodomain, sine oculus-related factors) responsables de l'induction de la différenciation (Scully and Rosenfeld, 2002)

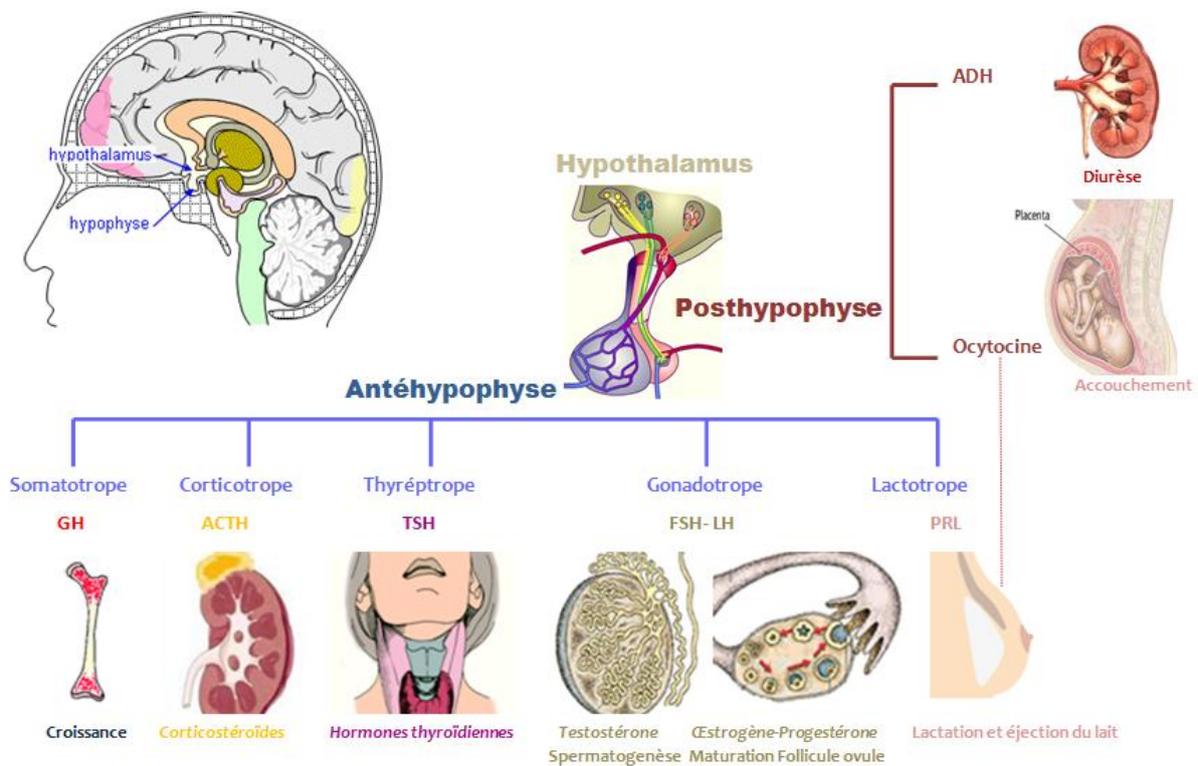


Figure 1. Les hormones de l'hypophyse et leurs différents rôles.

L'acquisition de l'axe hypothalamo-hypophysaire est considérée comme une innovation remarquable chez les vertébrés. Le système endocrinien est conservé dans toutes les classes de vertébrés, indépendamment de leur cycle de vie ou de leurs stratégies reproductrices. Une telle cohérence chez les vertébrés, a conduit à effectuer une abondante recherche comparative sur les mécanismes et les rôles de ce système d'un point de vue évolutif. Cependant, le pourquoi et le comment sur l'émergence et l'acquisition de cet axe de fonctions cruciales et que dans la lignée des vertébrés, sont encore à être clarifiés.

Les hormones glycoprotéiques

La FSH, la LH et la TSH sont des hormones glycoprotéiques contrairement aux hormones holoprotéiques comme la GH, la PRL et l'ACTH qui sont constituées d'une chaîne d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques.

Une glycoprotéine est une protéine portant un ou plusieurs groupements oligosaccharidiques fixés d'une façon covalente. La fraction glucidique peut représenter 5 à 50 % de la molécule. Elle rend les polypeptides plus résistants à la protéolyse et va permettre aux protéines d'être convenablement secrétées. Il existe deux types de glycosylation, la N-glycosylation et la O-glycosylation, selon leur site d'ancrage.

Les hormones Glycoprotéiques assurent un rôle majeur dans la régulation de la reproduction et dans la régulation du métabolisme thyroïdien (Pierce et Pearson, 1981). Elles appartiennent à la famille des protéines à nœud cystéine ou Cystine-Knot dont la séquence consensus est la suivante : $Cys_1-(X)_n-Cys_2-X-G-X-Cys_3-(X)_n-Cys_5-X-Cys_6$. Ces cystéines forment entre elles trois ponts disulfures en se reliant deux à deux de la façon suivante : Cys_2-Cys_5 , Cys_3-Cys_6 formant un anneau, alors que Cys_1-Cys_4 forment le troisième pont qui traverse l'anneau pour former le nœud. L'énergie libre de liaison qui résulte de la formation d'un pont disulfure est importante, elle contribue à la stabilisation tridimensionnelle de la protéine. La formation du nœud cystine se déroule au niveau du réticulum endoplasmique et grâce à l'existence d'un potentiel rédox moins réducteur que le cytoplasme.

Le repliement de ces protéines à nœud cystine, conduit à la formation de trois domaines distincts : deux d'entre eux, se trouve entre Cys_1 et Cys_2 , ainsi que Cys_4 et Cys_5 . Ils se composent de deux brins beta antiparallèles sous forme de doigts, tandis que le troisième domaine se trouve entre Cys_3 et Cys_4 et contient en général une structure alpha hélicoïdale. Cette structure tridimensionnelle force les membres de cette superfamille à exposer les résidus hydrophobes au milieu aqueux environant. Ces résidus hydrophobes conduisent aussi à la formation d'homo ou hétérodimères. Certains membres possèdent un résidu cystéine supplémentaire en face de Cys_4 et qui stabilise la dimérisation par la formation d'un pont disulfure covalent entre les deux sous-unités.

En 1931, Fevold et ses collègues réussirent à séparer les deux fractions correspondant à LH et FSH à partir d'extraits hypophysaires de brebis (Fevold et al., 1931). Elles ont un poids moléculaire de 30 KDa environ chez les vertébrés. Chez les actinoptérygiens, GTH1 et GTH2 constituent les gonadotropines apparentées aux FSH et LH respectivement.

Une autre gonadotropine, La choriogonadotropine ou CG pour Chorionic Gonadotropin, d'origine placentaire, est produite par les syncytiotrophoblastes. Elle se trouve secrétée de manière constitutive en quantité importante dans le sang au cours du premier tiers de la gestation et participe au maintien du corps jaune au cours de la gestation. Elle n'existe que chez les Primates et les Equidés. La choriogonadotropine humaine a été trouvée en 1927 dans l'urine de femme enceinte et sa présence continue d'être la base des tests de grossesse.

La FSH est essentiellement secrétée de manière constitutive, par exocytose alors que la LH est stockées dans des granules de sécrétion intracellulaires. Toutes les deux sont secrétées par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse et sont régulées par le système nerveux central via l'action pulsatile d'une neurohormone : la gonadolibérine ou GnRH pour Gonadotropin Releasing Hormone. En effet la sécrétion de la GnRH est pulsatile, caractérisée par une montée rapide des concentrations sanguines et suivies d'une diminution de type exponentiel lié à son demi-vie. Ainsi la fréquence des cycles de GnRH détermine le rapport des sécrétions de FSH et de LH. La GnRH est elle-même sous l'influence des neurotransmetteurs centraux et des stéroïdes sexuels (œstradiol et progestérone chez la femelle, testostérone chez le male) qui rétrocontrôlent au niveau de l'hypothalamus la stimulation des cellules gonadotropes de l'hypophyse par la GnRH en altérant l'amplitude et la fréquence des pulses et au niveau de l'hypophyse en altérant le nombre des récepteurs à GnRH et en modulant la transcription des gènes codant les sous-unités composant les gonadotropines.

En 2000, Tsutsui et ses collègues ont mis en évidence un neuropeptide hypothalamique purifié à partir d'extraits de cerveau de caille, qui agit directement sur l'hypophyse et inhibe la sécrétion des gonadotropines par les cellules gonadotropes. Il fut nommé GnIH pour Gonadotropin-Inhibitory Hormone (Tsutsui et al., 2000). Les activines et leurs deux modulateurs les follistatines et les inhibines (qui agissent de manière autocrine/paracrine) affectent la sécrétion hypophysaire de FSH, tout en respectant celle de LH (Bilezikjian et al., 2004). En effet, les activines sont synthétisés par les cellules gonadotropes, stimulent la

sécrétion de la FSH en se liant à leurs récepteurs spécifiques qui se trouvent sur les mêmes cellules. Cette stimulation est inhibée soit par les follistatines qui se lient directement aux activines soit par les inhibines qui se lient aux récepteurs des activines.

La thyrotropine (TSH)

La thyrotropine d'origine hypophysaire, joue un rôle dans le contrôle de l'activité endocrine de la thyroïde. Elle est mise en évidence par Greep en 1934 (Greep, 1934). Sa purification a été accomplie en 1956 par Condliffe et Bates à partir d'extraits hypophysaires bovins (Bates and Condliffe, 1956). Elle a un poids moléculaire de 28 à 30 KDa. Elle est sécrétée par les cellules thyrotropes de l'hypophyse sous le contrôle de la TRH hypothalamique (Thyrotropin releasing hormone).

La TSH une fois sécrétée, elle se lie sur ces récepteurs membranaires liés aux protéines G de la cellule épithéliale thyroïdienne en activant l'adénylcyclase et la phospholipase C, ce qui entraîne la libération de la 3,5,3'-tri-iodo-thyronine T3 et de la 3,5,3',5'-tetra-iodo-thyronine T4 ou thyroxine par activation d'une protéine de grosse taille la thyroglobuline et de la peroxidase thyroïdienne. Cette dernière intervient alors dans le couplage des précurseurs alors que la thyroglobuline, porteuse d'hormones thyroïdiennes est alors stockée dans la cavité colloïde (pour environ deux mois, permettant de pallier aux variations des apports), la récupération se fait par pinocytose en fonction des tissus périphériques.

La sécrétion de la TSH est régulée par rétrocontrôle négative effectué par les hormones thyroïdiennes. Ces derniers sont indispensables à la croissance et au développement, en particulier pour le système nerveux central et pour l'os. Ainsi pendant la période fœtale, elles participent aux mécanismes de maturation et de mise en place des connexions neuronale ainsi qu'à la myélinisation et à la différenciation et la maturation osseuse. Elles ont des effets calorigènes et hyperglycémiantes en augmentant l'absorption intestinale de glucides. Elles augmentent la filtration glomérulaire et le débit sanguin rénal...

Caractéristiques structurales des hormones glycoprotéiques (GPH)

Structure peptidique

Les GPH malgré leurs rôles physiologiques divers possèdent une forte homologie structurale et sont considérées comme les hormones protéiques les plus complexes. Elles sont constituées de deux sous unités : α qui est commune à toutes les hormones d'une même espèce et β confère la spécificité biologique et immunologique de chaque hormone au sein d'une même espèce (Pierce and Parsons, 1981). Les chaînes polypeptidiques de α et β sont associées d'une manière non-covalente ou faible pour former un hétérodimère glycosylé et riche en ponts disulfures intrachaines : 5 pour la sous-unité α et 6 pour la sous-unité β . Malgré les variations importantes de séquence entre espèces, la position des cystéines, donc des ponts disulfures, est parfaitement conservée. A l'équilibre, ces sous-unités sont caractérisées par une constante de dissociation K_d de l'ordre de 10^{-6} M à 37°C. Cette valeur est largement supérieure aux concentrations circulantes des hormones (10^{-10} M) et il s'ensuit que les gonadotropines devraient être dissociées, et donc inactives, dans les conditions physiologiques. En fait, il avait été observé que la dissociation des sous-unités était très lente de telle sorte que le dimère avait largement le temps d'agir avant d'être éliminé ou dissocié. Les deux sous-unités se dissocient en effet à pH acide ou basique, en présence d'urée ou de guanidine ou par élévation de la température.

Structure primaire

La structure primaire des protéines correspond à leurs séquences d'acides aminés et détermine leur repliement dans l'espace qui, lui-même est largement responsable de leurs propriétés biologiques.

La sous-unité α est identique pour toutes les hormones glycoprotéiques au sein d'une même espèce. Elle est fortement conservée entre les différentes espèces. Elle est codée par un seul gène (Boothby et al., 1981, Fiddes and Goodman, 1979, Gharib et al., 1990). Le gène de la sous-unité α comporte 4 exons et 3 introns et sa taille varie, suivant les espèces de 8 à 16,5 Kb, en relation avec la longueur du premier intron. Les sous-unités α comportent dans la majorité des espèces 96 résidus d'acides aminés. Les 10 cystéines présentes dans toutes ces séquences ont des positions invariables d'une espèce à l'autre, ce qui permet d'aligner et de comparer ces séquences.

Les sous-unités β sont spécifiques de chaque hormone et sont codés par des gènes différents sur des chromosomes distincts. Les gènes des sous-unités β comportent trois exons et deux introns. La séquence en acide aminé varie plus ou moins en longueur d'une hormone à une autre entre 109-129 acides aminés pour la β FSH, 116-122 acides aminés pour la β LH, 99-130 acides aminés pour la β FSH et 145-149 acides aminés pour la β CG. Elles possèdent 12 cystéines en positions strictement invariantes formant 6 ponts S-S.

Structure secondaire

La structure secondaire correspond à des structures périodiques des acides aminés selon un axe. On connaît deux grands types de structures secondaires : l'hélice alpha et le feuillet Beta. Les proportions de structures secondaires des gonadotropines ont été étudiées par dichroïsme circulaire. La sous-unité α ne comporte qu'une courte séquence en hélice alpha et six feuillets beta tandis que la sous-unité β ne comporte pas du tout d'hélice alpha, elle est constituée essentiellement de cinq feuillets beta. Les liaisons qui vont se créer entre les différents feuillets beta vont engendrer un repliement caractéristique de la structure tertiaire.

Structure tertiaire

La structure tertiaire correspond aux repliements des chaînes protéiques sur elles-mêmes après la formation éventuelle de structures secondaires. Ces repliements étant liés à l'existence des résidus encombrants ou chargés. Au fur et à mesure que la chaîne peptidique s'allonge au niveau des ribosomes, des protéines appelées Chaperonnes viennent assister le repliement correct. Il y aura ensuite une stabilisation de la structure tertiaire par diverses liaisons ioniques, liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes. Les ponts dissulfures ne déterminent pas le repliement mais stabilise aussi la structure finale atteinte.

On trouve dix résidus cystéines sur la séquence de la sous-unité α et douze sur celle de β . Malgré les variations importantes de séquences entre espèces, la position des cystéines, donc des ponts disulfures, est parfaitement conservée. Elles forment respectivement cinq et six ponts disulfures intra-chaînes chez les sous-unités α (Cys₁-Cys₄, Cys₂-Cys₇, Cys₃-Cys₈, Cys₅-Cys₉, Cys₆-Cys₁₀) et β (Cys₁-Cys₆, Cys₂-Cys₇, Cys₃-Cys₁₂, Cys₄-Cys₈, Cys₅-Cys₉, Cys₁₀-Cys₁₂). La forme de ces ponts a été modélisée correctement à partir la structure tridimensionnelle de la CG (Lapthorn et al., 1994, Wu et al., 1994) et de la FSH humaines (Fox et al., 2001). Dans la structure cristalline de hCG, chaque chaîne polypeptidique est formée de brins β antiparallèles, repliés en trois paires de boucles liées au nœud cystine.

Dans la sous-unité α , La deuxième boucle est beaucoup plus longue que les cinq autres. Elle contient à son extrémité une hélice- α qui lui confère en structure particulière en coude. Elle est aussi caractérisée par sa séquence d'acides aminés très conservée entre les différents espèces de vertébrés (entre les Cys5-Cys7) contrairement aux boucles 1 et 3 qui possèdent des structures primaires moins conservées. En ce qui concerne la sous-unité β , la boucle 2 ne contient qu'un seul feuillet β et elle est la plus courte des boucles, par contre elle possède toujours une structure primaire très bien conservée pour toutes les hormones (LH, FSH, TSH et CG).

Association dimérique

Les hormones glycoprotéiques sont secrétées à forte concentration dans les cellules qui les synthétisent pour se retrouver en concentration considérablement plus faible dans le sang, d'où l'importance que l'hétérodimère formé soit suffisamment stable pour avoir le temps d'agir avant leur élimination. L'existence de la structure en nœud cystine formé par 3 ponts S-S et la présence de la ceinture de sécurité maintiennent ensemble l'intégrité de l'hétérodimère. En effet, la ceinture de la sécurité est une extension de la région C-terminal de la sous-unité β qui va entourer la sous-unité α au niveau de sa boucle 2 une fois que l'association dimérique est produite : c'est la Cys₁₂ de la partie C-terminal qui forme un pont avec la Cys₃. L'ouverture et la fermeture de ce pont disulfure sont catalysées par l'activité PDI (Protein Disulfide Isomerase) de l'hormone au moment de la dimérisation des deux sous-unités (Belghazi et al., 2006) (Voir l'article 2).

Structure polysaccharidique

Un des aspects structuraux intéressants de cette famille de GPH est sa forte glycosylation. Cette dernière a été montrée importante pour la persistance circulatoire et la clairance métabolique (capacité globale de l'organisme à éliminer une molécule) et dans leurs activités biologiques (Apparailly and Combarnous, 1994, Combarnous, 1992). Les sites potentiels de N-glycosylation sont les résidus asparagine Asn présents dans les séquences Asparagine-X-Thréonine/Sérine. En général, il existe 2 sites qui sont effectivement N-glycosylés dans les sous-unités α des mammifères tandis que les sous-unités β possèdent selon les hormones et/ou les espèces, un ou deux sites. La N-glycosylation des deux sous-unités se déroule dans le réticulum endoplasmique granulaire d'une façon co-translationnelle. Certaines glycoprotéines peuvent être aussi O-Glycosylés mais souvent avec des chaînes plus courtes que les chaînes N-saccharadiques avec des mécanismes de glycosylation différente.

Les glycoprotéines alpha-2(GPA2) et beta-5 (GPB5), nouveaux membres de la famille des GPH

En 2002, Hsu et ses collaborateurs ont identifié deux nouvelles glycoprotéines qui représentent une forte similitude structurale au niveau de leurs séquences avec les sous-unités α et β des hormones glycoprotéiques de vertébrés. Cette identification a été initiée par une analyse *in silico* sur les EST (Expressed Sequenced Tags) et le génome humain (entièrement séquencé) suivie par une confirmation par RT-PCR sur des ADNc. Ces nouvelles glycoprotéines ont été nommées GPA2 en considérant que la sous-unité α est GPA1 et GPB5 en tenant compte des 4 sous-unités β différentes déjà identifiées des LH, FSH, TSH et la CG. La comparaison des séquences des acides aminés de GPA2 avec la sous-unité α et de GPB5 avec la sous-unité β montre aussi la conservation de l'arrangement des résidus cystéines qu'on trouve chez les sous-unités α et β des GPH. Ainsi GPA2 et GPB5 appartiennent à la super-famille des « Cystine-Knot Proteins» (Hsu et al., 2002).

D'autres orthologues de GPA1 ont été trouvés de la même manière dans les EST et les GSS (Genomic Survey Sequence) de quatre vertébrés ; le rat, la souris, le Tetraodon *nigroviridis* et le xénope (Hsu et al., 2002). Pour GPB5, Hsu l'a identifié aussi chez le xénope et la souris, chez la *Drosophila melanogaster*, chez deux nématodes le *Coenorhabditis elegans* et l'*Ancliyostoma caninum* (Hsu et al., 2002). Un peu plus tard, d'autres génomes de nombreuses espèces de vertébrés et d'invertébrés ont été analysés, ce qui a permis de découvrir l'existence de gènes de GPA2 et de GPB5 chez quasiment toutes les espèces et qui codent potentiellement pour des molécules présentant des analogies importantes avec les sous-unités α et β des GPH.

Chez l'amphioxus, un chordé basal, qui ne possède ni hypophyse ni GPH, deux gènes homologues à *gpa2* et un seul homologue à *gpb5* ont été trouvés (Holland et al., 2008, Tando and Kubokawa, 2009a, Sower et al., 2009). Cependant, le ver à soie, le tetraodon et le poisson zebre possèdent deux *gpb5* tandis que l'oursin possède deux lots de chaque gène. Sower et ses collaborateurs ont noté que la lamproie possède seulement *gpa2* et non pas *gpa1* et ont conclu que GPA2 constitue la sous-unité α ancestrale des hormones glycoprotéiques (Sower et al.,

2009). Les espèces chez qui on n'a pas encore trouvé les deux gènes *gpa2* et *gpb5*, bien qu'elles y avaient été recherchées sont des Hyménoptères (abeille et guêpe) (Hauser et al., 2010) aussi *gpa2* de deux oiseaux (poule et zébrafinch). L'absence de ces gènes chez les cnidaires permet de conclure que les homologues de *gpa2* et de *gpb5* sont apparus au moment de l'émergence des bilatériens.

Caractéristiques structurales

La séquence de la GPA1 humaine est formée de 129 a.a dont les premiers 23 a.a forment le peptide signal putatif. La chaîne protéique mature déduite possède un poids moléculaire théorique de 11,6 KDa avec deux sites potentiels de N-Glycosylation (alors qu'il existe un seul site chez la drosophile d'après (Sudo et al., 2005)). Dans GPA1, on retrouve 9 résidus cystéines parmi les 10 résidus cystéines que la sous-unité α possède.

La séquence protéique de la GPB5 humaine est formée de 130 a.a, contenant un peptide signal putatif de 24 a.a. La forme mature de la protéine contiendrait 106 a.a avec une masse moléculaire théorique de 11,7 KDa, un seul site potentiel de N-Glycosylation et 10 résidus cystéines. Il y a donc potentiellement cinq ponts disulfures qui se forment dans la GPB5 au lieu de six dans les sous-unités β . Le pont disulfure absent correspond au pont formé par la Cys₃-Cys₁₂ qui est impliqué dans la fermeture de la ceinture de sécurité une fois que la hétérodimérisation des sous-unités α et β des GPH a lieu (Hsu et al., 2002).

La ceinture de sécurité des GPH est importante pour la stabilité des hétérodimères et son absence dans GPB5 suggère une différence considérable dans ces propriétés de dimérisation et d'activité biologique par rapport aux sous-unités β des GPH (Alvarez et al., 2009, Hsu et al., 2002).

Caractéristiques fonctionnelles

En se basant sur les ressemblances structurales entre les nouvelles protéines découvertes et les sous-unités α et β des GPH et comme ces derniers sous-unités agissent en formant un hétérodimère non covalent, il était tentant de proposer que GPA2 et GPB5 puissent former aussi un hétérodimère. Néanmoins l'absence de la région des β formant la ceinture de sécurité affaiblit notablement cette hypothèse.

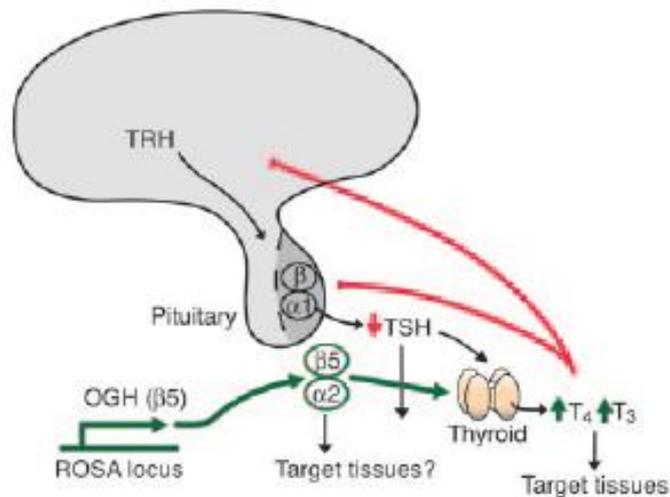
Par la technique de « yeast two-hybrid assay » Nakabayashi et son groupe ont montré que GPA2 et GPB5 sont des potentiels partenaires qui agiraient en interaction : ils ont sous-cloné les ADNc de GPA2 et GPB5 humaines dans un vecteur bipromoteur et puis utilisé ce vecteur pour la transfection des cellules rénales foetales humaines HEK 293T pour une co-expression. Durant le SDS-PAGE, ils ont remarqué l'absence de l'hétérodimère et afin de le visualiser, un couplage chimique par le Disuccinimidyl suberate (DSS) a été réalisé. Ce dimère covalent artificiel présente une activité thyroïdienne in vitro comme il était capable de stimuler les récepteurs à TSH (TSHR) : le dimère était capable de stimuler la production d'AMPc par le TSHR dans des HEK 293T mais non pas par les récepteurs à FSH et à LH. De plus, le traitement d'une lignée de cellules thyroïdiennes de rat, les FRTL5, avec ce dimère stimule la production d'AMPc et l'incorporation de thymidine tritiée avec des taux similaires à la stimulation par la TSH bovine. Pour tester aussi l'action de ce dimère in vivo, des rats males adultes, ne produisant plus de TSH suite à un traitement par la triiodothyronine, montrent une élévation du taux sériques de T4 lors de l'administration de cet hétérodimère A2/B5. Du fait que ce dimère covalent artificiel stimule le récepteur à TSH et non pas les récepteurs à LH ou FSH, avec sa capacité à maintenir un taux de T4 dans l'organisme, cet hétérodimère a été nommé « Thyrostimuline » (Nakabayashi et al., 2002).

Bien que « la thyrostimuline » (GPA2/GPB5 covalente) constitue un potentiel stimulateur de la fonction des cellules thyroïdiennes in vitro et in vivo, son rôle exact sur la physiologie thyroïdienne est mal établi. La thyrostimuline, si elle existe pourrait jouer un rôle paracrine dans l'adénohypophyse et autres tissus qui expriment les récepteurs de TSH (Nakabayashi et al., 2002). Ikekubo et ses collaborateurs proposent que la thyrostimuline stimulerait la thyroïde et maintiendrait l'euthyroïdisme chez les patients présentant un goitre avec des taux de TSH très faible et non stimulable par la TRH (Ikekubo et al., 2005).

Jusqu'à aujourd'hui, le knock-out du gène *gpa2* n'a pas été décrit, alors que MacDonald et ses collaborateurs ont publié en 2005, le knock-out du gène *gpb5* ou OGH (orphan glycoprotein hormone) et aussi de sa surexpression. Dans les deux cas, les animaux sont viables et présentent des ressemblances avec les individus sauvages avec quelques petites différences. En effet, chez les animaux sur-exprimant GPB5, les OGH-TG, une diminution de masse a été remarquée malgré que les OGH-TG mangent beaucoup plus que les individus sauvages. Cette diminution de masse n'est donc pas corrélée avec une diminution de prise alimentaire,

mais à un métabolisme plus important. Ces modifications métaboliques induites étaient dues à une augmentation en hormones thyroïdiennes sans augmentation de la teneur de TSH circulante. Ainsi les auteurs proposent encore une fois que la thyrostimuline qui stimulerait bien l'activité thyroïdienne (Macdonald et al., 2005).

De même pour Okada et son groupe, qui considèrent que la thyrostimuline ou CGH (Corticotroph-Derived Glycoprotein Hormone) comme ils l'ont appelée stimule l'activité thyroïdienne. Ils ont montré que la surexpression de la GPB5 conduit aux mêmes résultats de MacDonald avec quelques différences histologiques : une hypertrophie des follicules thyroïdiens, une hyperplasie des cellules épithéliales des follicules thyroïdiens et une hypertrophie des cellules dans la partie interne de la corticale surrénalienne tandis que la surexpression de GPA2 donne des individus identiques aux sauvages (Okada et al., 2006).



**Figure 3. Comment GPB5 affecterait le métabolisme et la perte du poids.
(MacDonald et al, 2005).**

En 2006, Nagasaki et ses collaborateurs, montrent que la thyrostimuline agit via un mécanisme différent de celui de TSH et indépendant de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ils ont cloné et obtenu les protéines recombinantes de GPA2 et de GPB5 du rat. Ils ont confirmé les travaux de Nakabayashi (Nakabayashi et al., 2002) en montrant que la thyrostimuline, cette fois du rat, stabilisé aussi par du DSS, stimule le TSHR en mesurant l'AMPC et la mobilisation Ca^{2+} intra-cellulaire. Ils ont montré que les niveaux de transcrits de GPA2 et de GPB5 n'étaient pas significativement modifiés par la TRH dans des cultures primaires d'hypophyses. Ils ont aussi déduit que l'hypophyse n'est pas la source de thyrostimuline

comme ils n'ont pas réussi à détecter GPB5 dans l'hypophyse du rat (Nagasaki et al., 2006). Les cytokines proinflammatoires (IL-1 β et TNF α) régulent la transcription de GPB5 à travers la voie NF- κ B dans les At-T20, une lignée corticotrope murine. Les auteurs de ce papier proposent que la thyrostimuline soit relié à des facteurs de stress dans le cas de maladies sévères. Différentes cytokines sont produites au cours du « infectious Stress » et induisent l'expression d'ACTH, établissant ainsi le concept de l'interaction système immunitaire – système neuroendocriniens (Suzuki et al., 2009).

Par real-time-PCR et des études immunohistochimiques, Sun et ses collaborateurs ont montré que la thyrostimuline est exprimée dans les ovocytes de ratte. Les TSHR sont exprimés dans les ovaires (Aghajanova et al., 2009) et sont stimulés par voie paracrine par cette thyrostimuline (Sun et al., 2009). La « thyrostimuline » purifiée après cross-linking par le DSS a été capable de stimuler l'AMPc dans des cellules HEK 293T transfectées par TSHR aussi des cellules humaine NIH, les OVCAR-3, une lignée cellulaire ovarienne obtenu d'une patiente ayant un adénocarcinome ovarien (Sun et al., 2009).

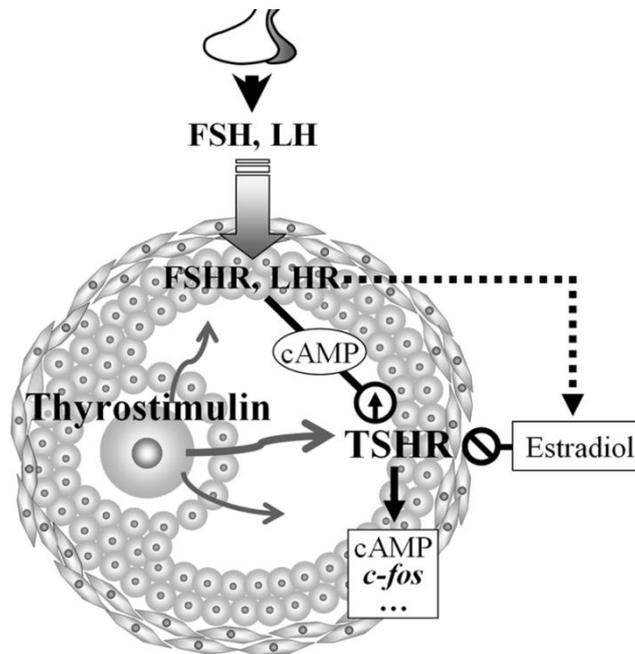


Figure 4. Hypothèse de l'activité paracrine et des mécanismes régulateurs de la thyrostimuline-TSHR dans les ovaires. (Sun et al, 2009).

Van Zeijl et ses collaborateurs, ont essayé d'élucider le rôle de la thyrostimuline dans la régulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-tyroïde quand ce dernier est confronté à un manque ou un excès d'hormone thyroïdienne. Ils ont utilisé le modèle de souris transgéniques

GPB5^{-/-} dans trois cas, hypothyroïdisme, euthyroïdisme et thyrotoxicoses en comparant les jeunes et les adultes. Ils ont déduit que les jeunes euthyroid GPB5^{-/-} développent une hypothyroxinemia (faible concentration de thyroxine dans le sang) et ils ont proposé que c'est la manque de thyrostimuline qui est responsable de ce phénotype chez les transgéniques mais en tenant compte cette fois, que GPB5 peut-être la seule responsable (van Zeijl et al., 2010).

La thyrostimuline pourrait jouer un rôle dans la répression de TSH durant les maladies par un court rétrocontrôle impliquant les TSHR qui sont exprimés dans l'adénohypophyse. En effet, l'administration de lipopolysaccharide LPS à des souris est un modèle établie pour l'étude de la maladie systémique non thyroïdienne. van Zeijl et ses collaborateurs ont injecté les souris transgéniques GPB5^{-/-} par du LPS. Cette administration de LPS a augmenté l'expression des messagers de GPB5 chez les animaux sauvages au niveau hypophysaire et hypothalamique, la suppression des messagers de GPA2 chez les animaux sauvages et transgéniques et la diminution des messages de TSHR chez les animaux sauvages mais pas chez les transgéniques GPB5^{-/-}. Cette dernière diminution suggère que GPB5 joue un rôle dans la régulation de TSHR au cours des maladies aiguës (van Zeijl et al., 2011).

Localisations et distributions tissulaires

La littérature concernant la distribution tissulaire de GPA2 et de GPB5 est contradictoire. Cette distribution dépend de techniques utilisées (hybridation in situ, RT-PCR, immunodetection) et aussi des outils (anticorps anti-peptides, anticorps faits contre la protéine recombinante exprimé en système bactérien...) et peut être des stades de développement des individus sur lesquelles les organes sont prélevés. Mais d'une façon générale, on remarque une large distribution de gpa2 et une expression plus restreinte de gpb5.

Hsu et ses collaborateurs montrent par amplification PCR que chez l'homme, gpa2 est exprimé dans l'hypophyse, les gonades, les reins et le pancréas alors que gpb5 est restreinte au cerveau et à l'hypophyse. Chez la souris et le xenopus, un co-marquage de GPA2 et de GPB5 au niveau des cellules antéhypophysaires a été mis en évidence par les anticorps polyclonaux anti-GPA2 et anti-GPB5 faits chez le lapin (anticorps faits contre les protéines recombinantes humaines exprimées chez *E.coli*) et en parallèle en western blot sur des extraits hypophysaires sans déterminer vraiment dans quel(s) type(s) cellulaire(s) les deux protéines sont exprimées (Hsu et al., 2002).

Nakabayashi et ses collaborateurs retrouvent chez le rat, par RT-PCR les ARNm de *gpb5* dans le cerveau, l'antéhypophyse, la thyroïde, l'oviducte et le cœur et les ARNm de *gpa2* dans ces mêmes tissus avec aussi une expression dans les reins, l'utérus, l'intestin, les poumons et les gonades et les glandes surrénales. Ils ont montré aussi un co-marquage de GPA2 et de GPB5 dans l'adénohypophyse en utilisant le même type d'anticorps que dans le paragraphe précédent (Nakabayashi et al., 2002).

Li et ses collaborateurs ont réalisé une étude immuno-histochimique chez le rat en utilisant des anticorps anti-peptides. Ils ont montré que GPA2 et GPB5 sont tous les deux exprimés dans l'adénohypophyse (sans précision de type cellulaire), le duodénum, le système nerveux central (les dendrites et les axones de l'hypothalamus, cervelet, mésencéphale, *medulla oblongata*, moelle épinière, et rétine), l'estomac et le pancréas, les glandes surrénales et mais pas dans la glande thyroïde. GPA2 n'a pas été retrouvé dans le testicule, le cœur, les poumons, le foie, ni les reins (Li et al., 2004).

MacDonald et ses collaborateurs, en utilisant leurs modèles de souris transgéniques hétérozygotes, indiquent que GPB5 serait exprimé dans le fasciculus retroflexus caudal du cerveau, dans la rétine et dans les tubules séminifères des testicules chez l'adulte et dans les glandes salivaires, lacrymales et les conduits du palais « apparent ducts in the palate » chez le nouveau né (Macdonald et al., 2005).

Chez la drosophile, Sudo et ses collaborateurs, voient l'expression des ARNm de GPA2 et de GPB5 au cours de développement aux niveaux des stades embryonnaires, larvaires et adultes (Sudo et al., 2005).

En 2006, Nakasaki et ses collaborateurs ont cherché par PCR quantitative (q-PCR) l'expression des transcrits de GPA2 et de GPB5 chez le rat et l'humain. Dans les tissus où on trouve les deux transcrits, le niveau d'expression des transcrits de GPB5 était 100-200 fois plus faible que celui de GPA2. Chez l'homme, les transcrits de GPA2 sont fortement exprimés dans le pancréas et l'hypophyse, alors que pour GPB5, c'est dans l'hypophyse où les gènes sont les plus exprimés. Chez le rat, les ARNm de GPA2 sont fortement exprimés dans l'œil, présentent dans l'hypophyse, les testicules, et les reins. Ceux de GPB5 sont aussi

fortement exprimés dans l'œil et les organes impliqués dans la reproduction (testicule, utérus et placenta) avec une expression très faible dans la vessie et l'hypothalamus. Ils étaient à peine détectables chez le rat dans l'hypophyse (les rapports de q-PCR sont 4/1/0,05/0,0005 pour l' α , β TSH, GPA2 et GPB5). Des hybridations in situ sur les hypophyses de rat ont été réalisées en considérant que la q-PCR ne pouvait pas détecter les ARNm s'ils se trouvent dans quelques cellules sélectives. Les transcrits de GPA2 sont diffusés au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse alors que GPB5 était non détectable dans aucun des lobes contrairement à ce qui a été décrit par Nakayashi en 2002 (Nagasaki et al., 2006).

Okada et ses collaborateurs confirment la présence des transcrits de GPA2 en abondance dans le pancréas par Northern Blot, avec un niveau moins important dans l'hypophyse, la parotide, la rétine, la peau, testicule, estomac, reins, colon, intestin grêle et thyroïde par RT-PCR. Alors que les ARNm de GPB5, se trouvent dans l'hypophyse, la rétine, les testicules et la peau et non pas dans le pancréas, parotide, reins, estomac, foie, colon, cerveau, glande surrénales. Ils ont trouvé une même expression chez la souris et ont déduit comme le groupe de Nagasaki, que l'expression des transcrits GPB5 est beaucoup plus faible que ceux de GPA2 dans les tissus où les deux sont exprimés. Par hybridation in situ, les transcrits de GPA2 se montrent localisés dans les cellules acineuses du pancréas et des glandes salivaires. Cette même équipe, a utilisé un double immuno-marquage sur l'antéhypophyse en utilisant des anticorps anti-GPB5 et des anticorps contre des marqueurs de lignés cellulaires antéhypophysaires pour montrer une colocalisation dans les cellules corticotropes humaines alors que chez le rat, Nakabayashi n'a pas trouvé une colocalisation de GPA2 avec d'autres marqueurs antéhypophysaires (Okada et al., 2006).

Sun et ses collaborateurs ont détecté par amplification PCR, une présence des ARNm de GPA2 et de GPB5 dans les ovaires. Les ovocytes contenaient le plus des transcrits de GPB5 alors que les cellules de granulosa montraient un niveau d'expression modéré tandis que par marquage immunohistochimique, ce sont les ovocytes et non pas les cellules de granulosa qui ont été marqué par l'anticorps polyclonal anti-GPB5 (Sun et al., 2009).

GPA2 ou FLR-2 chez *Coenorhabditis elegans*, est exprimé dans quelques neurones au niveau du pharynx, tête et queue de l'état larvaire à l'état adulte. Cette expression a été étudiée par

des anticorps anti-FLR2-GFP (la protéine recombinante a été exprimée chez *E.coli*, purifiée et injectée chez le rat) (Oishi et al., 2009).

Chez l'amphioxus, Tando et Kubokawa ont utilisé l'hybridation in situ in toto (chez *B.belcheri*) et ont détecté les ARNm de GPA2 au niveau de la racine du sixième nerf dorsal (sixth dorsal nerve root), de la région intercalée de la corde nerveuse et au niveau des cellules du côté droit du canal central de la corde nerveuse et du côté dorsale. Cette localisation cellulaire correspond aux cellules RB bipolaires (Retzius bipolar cells) qui sont considérées comme des neurones somatiques sensoriels (Tando and Kubokawa, 2009b).

Dos Santos et ses collaborateurs, ont réalisé une étude par hybridation in situ du profil d'expression des deux gènes au cours du développement embryonnaire de l'amphioxus. Ils ont remarqué une expression ubiquitaire faible de *gpb5*, selon un gradient antéro-postérieur chez les embryons tandis que l'expression de *gpa2* est restreinte au niveau embryonnaire et larvaire. Chez l'amphioxus adulte, la présence des transcrits a été testé par PCR sur les ADNc, ainsi les transcrits de *gpa2* sont détectés dans la région de la fosse de Hatscheck, dans l'intestin postérieur, les myotomes, la notochorde, l'endostyle, les arcs pharyngiens et les gonades. Ceux de *gpb5* ne sont retrouvés que dans l'intestin postérieur, les myotomes et les gonades (Dos Santos et al., 2009).

Les résultats concernant l'expression des GPA2 et de GPB5 dans diverses espèces et à divers stades de développement n'indiquent pas de localisation ni de moment où une co-expression des deux protéines dans un même type cellulaire permettrait une éventuelle hétérodimérisation (si qu'elle pourrait être suffisamment stable sans l'aide d'un pont covalent artificiel).

Notre projet était d'étudier la structure quaternaire éventuelle de l'hétérodimère recombinant de GPA2/GPB5 bovines mais des difficultés inattendues nous ont conduits à suspendre ce travail en attendant de solutionner le problème. Ce qui a été fait depuis mais trop tardivement pour la présente thèse.

Deuxième partie

Les PEBP

La famille de PEBP est formée de protéines ubiquitaires, solubles et de poids moléculaires aux environs de 20-23 kDa et qui comprend à ce jour plus de 400 membres dans l'ensemble des espèces ; bactéries, archées et eucaryotes. Les PEBP sont extrêmement conservées. Leur séquence codante ne comporte pas de peptide signal et elles sont donc essentiellement cytoplasmiques mais on les retrouve néanmoins aussi associées aux membranes cellulaires (Roussel et al., 1988) et parfois même secrétées (Hengst et al., 2001)

En 1984, Bernier et Jolles ont purifié la PEBP, à partir du cerveau de bœuf. Ils ont remarqué durant sa purification que cette protéine soluble restait associée à des lipides endogènes comme les triacylglycérides et les esters de cholestérol et qu'elle était capable de fixer des ligands anioniques comme la bromosulfophtaléine, le sulfate de déhydroépiandrostérone, l'estradiol, le linoléate et l'oléate de cholestérol, mais aussi des phospholipides en particulier la phosphatidylethanolamine (PE) (Bernier and Jolles, 1984). Cette dernière propriété lui a valu son nom principal : Phosphatidyl-éthanolamine-binding protein. La PEBP de cerveau de bœuf lie également différents nucléotides tels que la flavine mononucleotide FMN et le guanosine triphosphate GTP (Bucquoy et al., 1994) mais aussi des protéines G, la locostatine (Zhu et al., 2005) et des dérivés de la morphine (Atmanene et al., 2009). Au fil des années, des protéines homologues à la PEBP-1 bovine ont été isolées et caractérisées (PEBP-2, PEBP-4). La PEBP agit dans un grand nombre de processus cellulaires et physiologiques. Au niveau cellulaire, la PEBP est un inhibiteur d'enzymes différentes, parmi lesquelles RAF kinase (d'où son nom RKIP pour RAF KINASE INHIBITOR PROTEIN) et la thrombine chez les mammifères, la carboxypeptidase Y (CPY) et Ras GTPase-activating protein chez la levure (Bruun et al., 1998, Chautard et al., 2004, Hengst et al., 2001, Yeung et al., 2000, Yeung et al., 1999). Elle est aussi connue sous le nom de facteur décapacitant DF (Gibbons et al., 2005). Elle joue un rôle dans la physiologie cardiaque (Goumon et al., 2004) et dans le développement du cerveau (Yuasa et al., 2001) et l'inflorescence chez les plantes (Banfield and Brady, 2000)... La protéine la plus étudiée parmi les PEBPs est RAF kinase inhibitor protein « RKIP ». C'est pour cette raison, la PEBP sera des fois remplacé par RKIP dans la plupart des paragraphes du manuscrit.

Cette famille de protéine a attiré l'attention de beaucoup de chercheurs qui essayent de comprendre les fonctions, rôles et modes d'action de ces protéines qui sont jusqu'à aujourd'hui très mal établis.

Tableau 1. Quelques homologues de PEBP/RKIP

Espèce	Nom et ou Rôle	Références
<i>Plasmodium falciparum</i> (parasite)	?	(Trottein and Cowman, 1995)
<i>Plasmodium vivax</i> (parasite)	?	(Arakaki et al., 2007)
<i>Onchocera volvulus</i> (nematode)	protège le nématode d'être détecté par le système immunitaire de l'hôte.	(Ertmann and Gallin, 1996)
<i>Toxocara canis</i> (nematode)	protège le nématode en l'empêchant d'être détecté par le système immunitaire de l'hôte.	(Gems et al., 1995)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Odorant binding	(Pikielny et al., 1994)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levure)	Inhibe la carboxypeptidase et yRas GAP. Interagit avec CDC25 impliqué dans des associations moléculaires et qui contrôle la cascade de phosphorylations dans les voies de signalisation glycolitiques.	(Robinson and Tatchell, 1991)
<i>Antirrhinum centroradialis</i> (muflier)	CEN (Centroradialis) Programmation du méristème apical	(Banfield and Brady, 2000)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FT (Terminal Flower) et TFL1 (flowering locus T) Dans la floraison, FT induit la floraison et TFL1 la réprime.	(Ahn et al., 2006)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	SP (Self Pruning) Régularité d'alternance de phases végétatives et reproductives	(Pnueli et al., 1998)
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabac)	CET2/CET4 architecture florale	(Amaya et al., 1999)
<i>Pisum sativum</i> (petit pois)	DETERMINATE Maintien l'indeterminance du méristème apicale et LF (Late Flowering) prolonge la phase végétative	(Foucher et al., 2003)
<i>Oryza sativa</i> (riz)	hd3 (heading date 3), RCN1 (FRD2), RCN2 et RCN3 (FRD1) Répresseur de floraison	(Nakagawa et al., 2002)
<i>Escherichia coli</i>	YBHB et YBCL	

Structure de PEBP/RKIP

La structure basique et la séquence consensus de la famille des PEBP ont été conservées durant l'évolution. Ces protéines ne possèdent pas d'homologie significative avec d'autres protéines dont la structure et la fonction sont connues. Les fonctions biologiques des protéines dépendent étroitement de leur structure tridimensionnelle (3D) qui peut être déterminée par cristallographie aux rayons X et/ou par NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

La structure de la PEBP bovine a été résolue pour la première fois en 1998 en présence de trois ligands anioniques différents : un ion acétate, un ion phosphate ou un groupement phosphoryéthanolamine (Serre et al., 1998). Un peu plus tard, la structure cristalline de la PEBP-1 humaine (hPEBP) a été obtenue et a permis de confirmer la ressemblance entre ces deux protéines (Banfield et al., 1998). Elle est essentiellement composée de deux hélices alpha et de neuf brins beta. Cette fois, la co-cristallisation a été faite avec un ion cacodylate qui se place sur le site putatif de fixation des ligands anioniques de la même manière que les ions acétate, phosphate et phosphoéthanolamine. Cette poche (site putatif) ne peut accueillir que la tête polaire anionique des ligands vu que le volume disponible pour la fixation d'un ligand est faible.

Raf-1 est l'une des MAP-kinases (mitogen activated protein kinase) ou ERK (extracellular signal regulated Kinase) qui catalysent la phosphorylation des protéines MAP. Les MAP-kinases s'activent les unes les autres en cascade : ainsi la MAP-kinase (ERK) est activée par une MAP-kinase-kinase (MEK), elle-même activée par d'autres MAP-kinase-kinase-kinase (Raf-1). Comme nous le verrons plus loin, différentes études ont montré que les PEBP sont des inhibiteurs d'un certain nombre de kinases (Raf-1, IKK α , IKK β ...). La PEBP/RKIP interagit avec Raf-1 et MEK et inhibe la voie MAP-Kinase (Yeung et al., 1999).

Des études de délétion dans la séquence de Raf-1 ont permis de définir la zone de Raf-1 impliquée dans l'interaction avec PEBP. Raf-1 se lie dans la poche de PEBP au niveau des résidus 325-349 de Raf-1 correspondant à la partie N-terminale de son domaine kinase. Cette poche donc, intègre deux signaux de régulation, la fixation du ligand et la phosphorylation pour contrôler l'inhibition de Raf-1 par RKIP (Park et al., 2006, Rath et al., 2008).

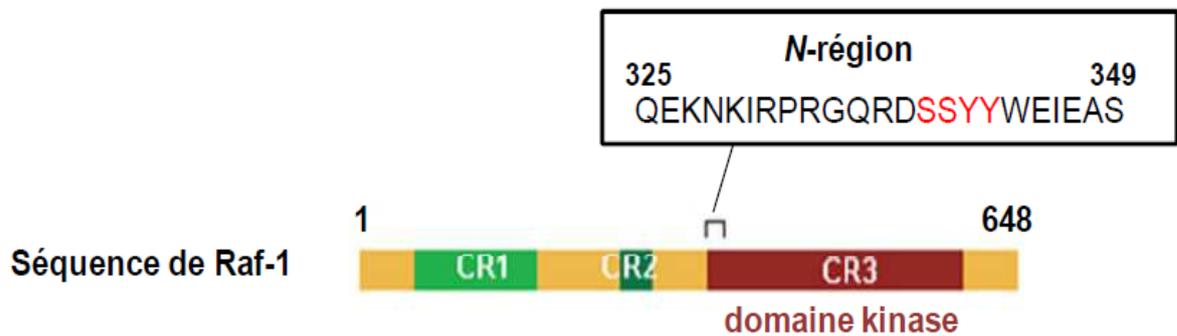


Figure 5. La région N- terminale du domaine kinase de Raf-1 qui est impliqué dans l'interaction avec RKIP.

La mutation du site P74L, un site conservé dans la poche, augmente l'interaction Kinase et la phosphorylation de RKIP, ce qui augmente le signal Raf1/ERK. Les études par NMR montrent que la structure de cette poche est très dynamique, ce qui lui permet de s'adapter et d'interagir avec divers partenaires et d'être impliquée dans des régulations allostériques (Granovsky et al., 2009).

Les structures cristallographiques d'autres PEBP ont été résolues chez différentes espèces.

Tableau 2. Les différentes espèces chez qui, la structure cristallographiques de la PEBP a été résolue avec leurs numéros d'accession PDB.

Espèce	PDB	Référence
<i>Bovin</i>	1B7A et 1A44	(Serre et al., 1998)
<i>humain</i>	1BD9 et 1BEH	(Banfield et al., 1998)
<i>Antirrhium Centroradialis</i>	1QOU	(Banfield and Brady, 2000)
<i>Echerichia coli</i>	1FJJ	(Serre et al., 2001)
<i>Souris</i>	1KN3	(Simister et al., 2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1WPX	(Mima et al., 2005)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1WKP	(Ahn et al., 2006)
<i>Plasmodium vivax</i>	2G2Q	(Arakaki et al., 2007)
<i>Rat</i>	21QX et 21QY	(Shemon et al., 2009)
<i>Drosophila melanogaster</i>	2JYZ	(Rautureau et al., 2009)

Les structures de ces protéines sont très proches et présentent des caractéristiques générales communes à toutes les protéines de la famille des PEBP. Elles sont formées essentiellement par un large feuillet beta central, sur extrémité se trouve un site putatif de liaison des ligands anioniques. Malgré un repliement global particulièrement conservé, les protéines de cette famille présentent néanmoins des différences structurales significatives, surtout au niveau de leurs extrémités N- et C-terminales qui pourraient être déterminantes pour leurs fonctions biologiques spécifiques, notamment pour la régulation de leurs interactions avec différents partenaires : l'hélice alpha qui se trouve à l'extrémité C-terminal de nombreuses PEBP, n'existe pas chez les PEBP de plantes ni de bactéries. Ainsi, les membres de cette famille possèdent des ligands différents et divers états oligomériques (monomère, dimère, tétramère) dont on ignore les rôles biologiques pour le moment.

RKIP et signalisation cellulaire

On définit la signalisation cellulaire transduction du signal par l'ensemble des mécanismes de communication au niveau cellulaire. Beaucoup de molécules sont impliquées dans ces échanges et qui permettent de transporter de l'information via des signaux chimiques, des médiateurs ou des ligands (hormones, facteurs de croissance, cytokines...) puis de décoder les messages portés par ces signaux grâce à des récepteurs extra ou intracellulaires spécifiques ce qui induit une réponse de la cellule réceptrice. Une fois que le ligand se fixe sur son récepteur, ce dernier, subit un changement de conformation, ce qui active une cascade de réactions biochimiques comme par exemple une série de phosphorylations pour les protéines kinases. La figure suivante représente les principales voies de signalisations impliquées dans la régulation des processus cellulaires comme le métabolisme, la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la réponse au stress et la l'inflammation...

Les paragraphes suivants présentent le rôle de la PEBP dans les régulations des MAP kinases et de certaines autres voies de signalisation.

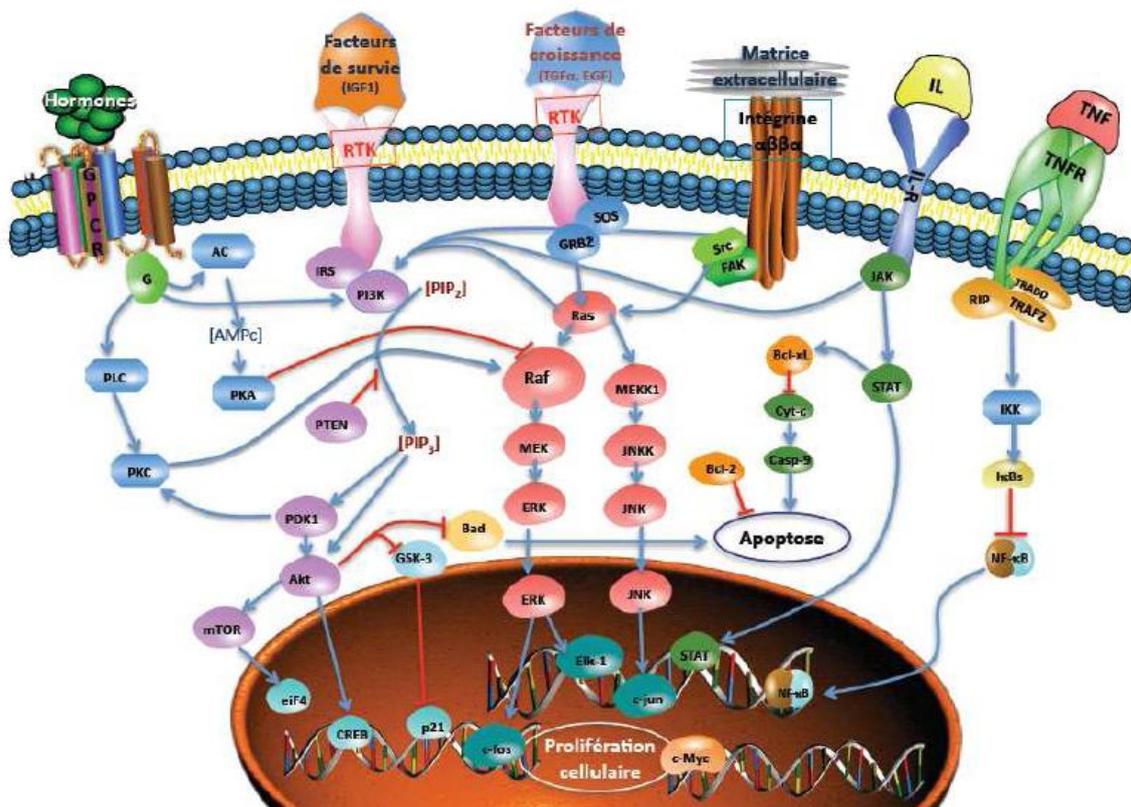


Figure 6. Principales voies de signalisation cellulaires.

RKIP et la voie MAP-Kinases Raf-1-/MEK/ERK

La voie des MAP-Kinases Raf-1/MEK/ERK est une voie de transduction du signal ubiquitaire. Elle permet la transmission des signaux de prolifération et de différenciation cellulaires depuis les récepteurs à activité Tyrosine-Kinase, les RTK, situés au niveau de la membrane plasmique jusqu'au noyau (Elion, 1998). La régulation de cette voie est complexe et fait intervenir des protéines qui assurent l'efficacité et la spécificité de la transmission du signal.

Les RTK ayant fixé par exemple un facteur de croissance, se dimérisent et s'autophosphorylent. Ensuite, la protéine adaptatrice Grb2, qui possède des domaines SH2 et SH3, s'accroche au résidu phosphotyrosine des RTK par son domaine SH2, tandis que les deux domaines SH3 se fixent aux résidus de proline de la protéine adaptatrice SOS (Son of Sevenless). Puis, Grb2-Sos entre en contact avec Ras (GTPase) qui est une petite protéine G (Moodie et al., 1993) et qui se situe dans le cytosol, près de la membrane plasmique.

Ras est alors activée via l'échange d'un GDP contre un GTP et se lie à la Kinase Raf-1 (MAPKKK). Raf-1 activée, phosphoryle et active MEK (MAPKK), une kinase qui phosphoryle à son tour la protéine ERK (MAPK). Cette dernière possède de nombreux substrats tels que des protéines cytoplasmiques, des régulateurs de la traduction, des protéines kinases de la famille Rsk, des facteurs de transcription comme AP-1 qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la survie ou la mort cellulaires, comme le gène Bcl3 (Shaulian and Karin, 2002).

Parmi toutes les protéines qui se lient à Raf, la PEBP-1 ou RKIP pour **Raf Kinase Inhibitor Protein** est le seul inhibiteur naturel endogène de cette voie de signalisation Raf/MEK/ERK. Par la technique double hybride, en utilisant un mutant Raf-1 Kinase, le BXB, comme sonde, Yeung et ses collaborateurs ont isolé la protéine RKIP dans une banque de données d'ADNc humains. Ils ont montré que RKIP inhibe la phosphorylation de MEK par Raf-1 : in vitro et in vivo, RKIP se lie à Raf-1, à MEK et plus faiblement à ERK mais ne se lie pas à Ras. RKIP n'est pas un substrat pour Raf-1 ou MEK, mais elle inhibe compétitivement l'interaction entre ces deux kinases. RKIP co-immunoprécipite avec le complexe Raf-1/MEK/ERK et se trouve co-localisée avec Raf-1 (immunofluorescence par microscopie confocale) que la cellule soit au repos ou activée par une forme oncogénique de Ras. La transcription de gènes dépendants de MEK, ERK et AP-1 est activée une fois que l'expression de la PEBP est réprimée par l'expression d'un ARN antisens ou l'injection d'un anticorps spécifique de RKIP. Par contre les protéines MEK et ERK ne sont plus activées lors d'une surexpression de RKIP, ainsi la transcription des gènes sous le contrôle du facteur de transcription AP-1 (Yeung et al., 1999).

Les mécanismes moléculaires de l'inhibition de la voie des MAP-kinases par RKIP ont été étudiés par double hybride, la capture par « GST Pulldown » et mutagenèse dirigée (Yeung et al., 2000). RKIP forme des complexes ternaires avec Raf-1, MEK et ERK : alors que MEK et ERK peuvent s'associer simultanément à RKIP, les liaisons de Raf-1 à RKIP ou de Raf-1 à MEK sont mutuellement exclusives. RKIP est capable de dissocier le complexe Raf-1/MEK et agit comme un inhibiteur compétitif de Raf-1 pour la phosphorylation de MEK. La localisation des domaines de liaison montre que MEK et RKIP s'associent à des domaines distincts de Raf-1 et que Raf-1 et RKIP s'associent à des sites différents de MEK. Pour empêcher l'inhibition de la voie MAP-kinase par RKIP, les deux sites de liaison à Raf-1 et à

MEK doivent être détruits. Ce résultat montre que la liaison de RKIP soit seulement à Raf-1 soit seulement à MEK est suffisante pour l'inhibition (Yeung et al., 2000). Il semble d'autre part que la cavité conservée des PEBP intervienne dans l'interaction entre RKIP et Raf-1.

RKIP en inhibant la voie Raf/MEK/ERK, elle influence indirectement l'activité de la protéine Kinase Aurora B. RKIP s'associe aux centrosomes et aux kinétochores et agit comme régulateur lors de la ségrégation des chromosomes et favorise la stabilité du génome (Eves et al., 2006).

RKIP et NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription nucléaire et ubiquiste, qui régule positivement un nombre considérable de gènes en réponse à des divers stimuli comme le stress (radiation UV ou choc thermique), l'infection bactérienne (lipopolysaccharide) et virale, et également en réponse à des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor) ou l'interleukine 1 β (IL-1 β).

Dans sa forme inactive, NF- κ B est maintenu dans le cytoplasme par une famille de protéines inhibitrices, les I κ B (Inhibitors of κ B). La phosphorylation de I κ B se fait par I κ B kinase (I κ K) par ses deux sous-unités catalytiques I κ K α et I κ K β . Après la phosphorylation, le site I κ K phosphorecepteur va servir comme une partie d'un site de reconnaissance essentiel pour E3RS^{I κ B/ β -TrCP}, une SCF-type E3 ubiquitine ligase, ce qui explique l'ubiquitination de I κ B et sa dégradation. Ces trois étapes, la phosphorylation des deux sérines 32 et 36, la polyubiquitination rapide et la dégradation protéolytique de I κ B par le protéosome 60S conduisent à l'activation de NF- κ B qui se dimérise pour gagner le noyau et se lie à l'ADN où il déclenche la transcription de différents gènes dont ceux de la réponse immunitaire ou inflammatoire et divers maladies.

La phosphorylation et l'activation des I κ K peut se faire par certaines kinases de la famille MAPKKK comme NIK (NF- κ B inducing kinase), MEKK1 (MEK kinase 1), TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1), mixed lineage kinase 3, et Cot/TPL2. Malgré les études avancées sur l'identification des kinases qui activent le complexe I κ K, il n'y a pas beaucoup d'informations sur les régulateurs négatifs qui peuvent affecter ces voies. Yeung et ses collaborateurs ont montré que RKIP joue un rôle inhibiteur de la voie de signalisation NF- κ B. L'inhibition de la PEBP par microinjection d'un anticorps anti-PEBP

active énormément le reporteur NF- κ B *lacZ* dans les fibroblastes Rat1 tandis que la surexpression de la RKIP inhibe ce reporteur. RKIP agit en amont du complexe kinase responsable de la phosphorylation et de l'inactivation de l'inhibiteur de NF- κ B, IKK. Plus précisément, RKIP inhibe les quatre kinases de la voie NF- κ B in vitro et in vivo : NIK, TAK-1, I κ K α et I κ K β . C'est ainsi que la transduction du signal est inhibée. Ce mode d'action ressemble à celui joué par RKIP avec Raf-1 et MEK dans la voie MAP-Kinase. Comme les deux voies MAP-Kinase et NF- κ B ont des rôles physiologiques bien distincts, la fonction de la RKIP pourrait-être, au moins pour une part, de coordonner la régulation de ces voies (Yeung et al., 2001).

RKIP et GPCR

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) constituent la famille la plus grande de récepteurs. Ils interviennent pratiquement dans tous les processus physiologiques tels que l'inflammation, la neurotransmission, la libération d'hormones, la régulation de la pression sanguine. La PKC phosphoryle RKIP sur la sérine-153 qui perd alors sa capacité à lier Raf-1 (perte de l'inhibition de la voie MAPK), et par contre se lie alors à la kinase GRK2 et l'inhibe. GRK2 ne peut plus phosphoryler les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) ce qui bloque leur internalisation. Un tel mécanisme permet de réguler la voie de transduction médiée par les GPCRs.

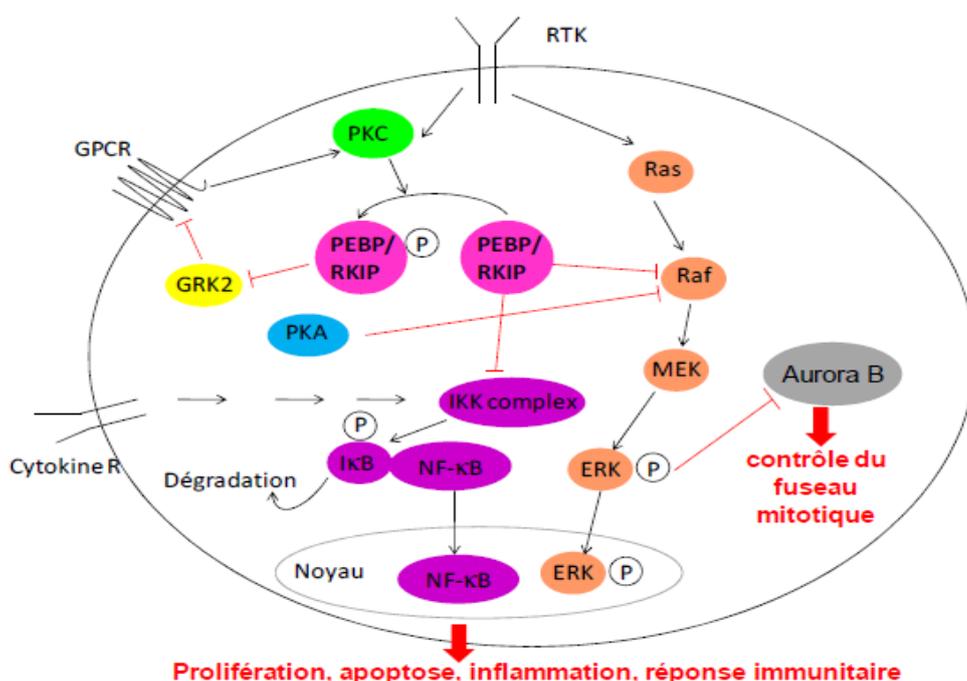


Figure 7. RKIP et les voies de signalisations cellulaires

RKIP et protéases à sérine

Les protéases à sérine désignent une famille d'enzymes protéolytiques qui catalysent l'hydrolyse de la liaison peptidique. Leur site actif contient une sérine qui joue le rôle central dans la catalyse. Ce groupe comprend des enzymes digestives pancréatiques comme la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et d'autres enzymes impliquées dans la coagulation comme la thrombine, la kalikréine, d'autres types encore comme les facteurs du complément. Cette famille joue des rôles très importants dans plusieurs processus durant le développement et l'homéostasie tissulaire. Parmi, leurs fonctions, les protéases à sérine, peuvent dégrader les composants des matrices extracellulaires pour permettre l'excroissance dans les processus neuronaux ou la migration cellulaire. Elles favorisent la mort cellulaire et agissent comme facteurs mitogéniques. L'activité de ces protéases est régulée par certains inhibiteurs, qui sont responsables de maintenir un développement et une homéostasie normaux. Un dérèglement de cette activité surtout au niveau du système nerveux peut être impliqué dans des pathologies comme la maladie d'Alzheimer.

Les RKIP sont capables d'inhiber d'une manière spécifique un certain nombre de protéases à sérine. Chez les mammifères, la PEBP-3 de souris, inhibe la thrombine, la neuropsine, la chymotrypsine, mais n'inhibe pas la trypsine, l'activateur du plasminogène, ni l'élastase (Hengst et al., 2001).

La protéase-nexine-1 PN-1, serpine tissulaire, inhibitrice de la thrombine présente dans le système nerveux central. Cependant, le fait que l'inhibition de la thrombine a été également détecté dans les cerveaux de souris PN-1^(-/-) indique la présence d'un inhibiteur supplémentaire de thrombine. Hengst et al, ont réussi à purifier et à identifier RKIP comme étant cet inhibiteur. La thrombine est considérée comme un mitogène et Raf-1 est phosphorylée suite à la liaison de la thrombine à son récepteur, un GPCR. Par conséquent, et suite à la stimulation des récepteurs activés par les protéases, PEBP pourrait moduler la réponse cellulaire. Il reste à déterminer le site actif et le mécanisme par lequel la PEBP inhibe les protéases à serine.

La Tfs1p ou I^c, homologue de RKIP chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est capable aussi d'inhiber la carboxypeptidase Y (CPY), une enzyme vacuolaire. La CPY contient un site

actif Ser, His, Asp et une « Trypsine- like oxyanion hole ». Son mécanisme catalytique est donc considéré comme semblable aux protéases à sérine (Chautard et al., 2004).

Chez le *Sulfolobus solfataricus*, un archée procaryote, la SsCEI ou PEBP du sulfolobus inhibe l'APEH(Sc) qui est une protéase à sérine appartenant à la famille de prolyl oligopeptidase (POP) (Palmieri et al., 2010).

Le fait que des membres de la famille de RKIP agissent comme inhibiteurs de l'activité protéolytique dans deux organismes évolutivement très éloignés ; la levure et la souris, suggère que ce pourrait être une caractéristique commune aux RKIP.

RKIP et reproduction

La capacitation des spermatozoïdes a été découverte par Colin Russell Austin et Chueh Chang en 1951. Elle se définit par l'ensemble de modifications biochimiques et physiques que le spermatozoïde subit dans les voies femelles pour acquérir le pouvoir fécondant. Seul un spermatozoïde complètement capacité peut interagir avec un ovocyte non fécondé et subir la réaction acrosomique grâce à ses interactions moléculaires spécifiques avec la zone pellucide. Parmi ces changements qui se déroulent dans l'isthme de l'oviducte c'est la perte de protéines de surface. Le processus de capacitation est réversible : l'élimination de protéines de surface de spermatozoïdes non capacités contribue à la capacitation rapide tandis qu'une nouvelle incubation avec ces protéines contribue à la perte du pouvoir fécondant (Fraser, 1984).

Ces protéines de surface qui inhibent la fécondation d'une façon réversible sont appelées Facteurs de décapacitation. (DFs). Ces DFs interagissent indirectement avec la membrane plasmique via de récepteurs spécifiques. Plusieurs modifications au niveau moléculaire ont lieu une fois que les DFs sont enlevés, parmi lesquelles une inactivation du Ca²⁺-ATPase, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Arnoult et al., 1999) à travers les canaux calciques voltage dépendant de type T, localisé dans la région post acrosomique de la tête du spermatozoïde (Adeoya-Osiguwa and Fraser, 1996). Les informations sur les DFs sont encore incomplètes, bien que certains facteurs soient partiellement purifiés et isolés par centrifugation douce de spermatozoïdes non capacités (Fraser, 1998).

En 1998, Frazer a montré qu'on perd des DFs lors du traitement d'une suspension de spermatozoïdes avec la phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) qui enlève les glycoposphatidylinositol (GPI) et qu'en conséquence les spermatozoïdes sont capcités. Par contre, l'addition des DFs de nouveau à la suspension traitée par PI-PLC ne provoque pas la réaction inverse. Ainsi ce n'est pas les DFs qui ont une ancre GPI mais ce sont d'autres molécules sur lesquelles le DFs vient s'attacher et sont appelés DF-receptor (DF-R) (Fraser, 1998).

Il y a quelques années deux laboratoires indépendants ont identifié la PEBP comme une protéine de surface de spermatozoïdes. En 2005, Gibbons et ses collaborateurs, ont montré que la PEBP est le récepteur de facteur(s) décapacitant(s) (Gibbons et al., 2005) et Nixon et ses collaborateurs, en se basant sur une méthode non mécanique pour séparer les protéines membranaires ont montré que la PEBP joue le rôle d'un facteur décapacitant qui réduit aussi l'expression de la phosphotyrosine sur la membrane plasmique des spermatozoïdes (Nixon et al., 2006). Cette exposition de phosphoprotéines à la surface avec l'implication d'autres membres de la famille des chaperonnes ont été impliqué dans la formation d'un récepteur fonctionnel qui active la capacitation et l'interaction avec la zone pellucide (Asquith et al., 2004). Des études plus approfondies sont donc nécessaires pour déterminer si la PEBP-1 agit comme un DF-R ou un DF.

Pour mieux comprendre l'importance de RKIP dans la reproduction, des souris transgéniques RKIP-1^{-/-} ont été générées (Theroux et al., 2007). Le taux de capacitation et de reproduction a été étudié aussi que la localisation de la RKIP-1 sur les spermatozoïdes. Ces souris knock-out ont été irradiées et les testicules ont été directement prélevés pour étudier la spermatogenèse et l'apoptose des cellules germinales (Moffit et al., 2007). Les résultats montrent la présence d'une capacitation précoce chez les souris RKIP-1^{-/-}. Une telle capacitation précoce conduit à un taux de reproduction réduit. Il était aussi intéressant de montrer que les males RKIP-1^{-/-} ont un taux de reproduction réduit quand ils sont accouplés à des femelles RKIP-1^{-/-} ou RKIP-1^{+/-} tandis que les males RKIP-1^{+/-} accouplés à des femelles RKIP-1^{-/-} ont un taux de reproduction normal par rapport au types sauvages. Par contre, les souris RKIP-1^{-/-} ne montrent pas de différence significative en terme d'apoptose dans les cellules germinales avec les souris sauvages. Ceci est peut-être dû au système de compensation par les autres types de PEBP.

Ces études démontrent le rôle de PEBP dans la régulation de la capacitation, ce qui implique éventuellement un rôle intéressant dans la reproduction et peuvent avoir des applications dans le traitement de fertilité ou dans le développement d'un mode de contraception comme les modifications moléculaires du DF ou du DF-R peuvent rendre les spermatozoïdes irréversiblement non fertiles.

RKIP et cancer

RKIP a été identifié comme étant le premier inhibiteur endogène de la voie MAPkinase Raf/mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK). Indépendamment de la voie MAP-Kinase, RKIP affecte aussi la voie NFkB (Yeung et al., 2001). Ces deux voies jouent des rôles importants dans le cancer et l'invasion en régulant principalement des fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la transformation, la mobilité, la survie et la métastase.

Au cours des dernières années, PEBP a été considérée comme un nouveau gène candidat pour son rôle dans la suppression des métastases (Tableau 3).

Le premier lien entre PEBP et cancer a été établie sur des modèles de cellules de prostate métastatique (C4-2B) et non-métastatique (LNCaP). Ces travaux ont montré une diminution de l'expression de PEBP et de son messager dans les cellules métastatiques (Fu et al., 2003).

Tableau 3. Gènes candidats pour leur rôle dans la suppression des métastases.

(Klysik et al., 2008)

Gene Abbreviation	Full Name
BRMS1	Breast cancer metastasis suppressor 1
Bsp	Bone sialoprotein
CRSP3	Transcriptional coactivator
CDH1	E-cadherin
Drg-1	NDRG gene family member
Fxa	Coagulation factor Xa
Kai1 (CD82, C33)	Tetraspanin, TM4SF superfamily member
KISS1	Kisspeptin 1
Maspin	Serpin family of serine protease inhibitors
MKK4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4
Δ GNp63 α	p63 isoform
nm23	Nonmetastatic 23
RhoGDI2	Inhibitor of guanine nucleotide dissociation from Rho and Rac
RKIP-1	Raf kinase inhibitor protein-1
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TXNIP/VDUP1	Thioredoxin-binding protein(Vitamin D3 upregulated protein 1)

Par ailleurs, la surexpression de PEBP dans des cellules cancéreuses métastatiques diminue leur pouvoir invasif. Par la suite, d'autres travaux ont rapporté la diminution de l'expression ou l'absence de PEBP dans d'autres cancers : mélanomes de la peau (Park et al., 2005), carcinome des cellules de Merkel (Houben et al., 2006), cancer du sein ganglionnaire (Hagan et al., 2005, Chatterjee et al., 2004) insulinomes (Zhang et al., 2004), cancer colorectal (Minoo et al., 2007) et hépatocarcinomes (Schuierer et al., 2006, Lee et al., 2006). Récemment, il a été proposé que le taux de PEBP dans le sang pourrait être utilisé comme un marqueur de cancer de la prostate (Fu et al., 2006). Les travaux récents de Eves et ses collaborateurs indiquent que l'absence de PEBP peut augmenter l'instabilité génétique de la cellule (Eves et al., 2006) tandis que les travaux sur les hépatomes suggèrent que l'absence de RKIP peut augmenter le taux de division cellulaires (Lee et al., 2006). Ces données suggèrent que la diminution de l'expression de RKIP-1 peut induire plusieurs caractéristiques généralement associées à la fois à la croissance et la propagation du cancer.

Les études à venir, peuvent fournir des outils pour exploiter la PEBP comme modèle pour la conception de nouveaux médicaments anti-cancéreux. En effet, Les composés anti-migratoires peuvent être exploités en tant qu'agents anti-cancéreux comme l'angiogenèse de la tumeur et sa métastase dépendent de la migration cellulaire.

RKIP et apoptose

La majorité des drogues anticancéreuses agissent sur les mêmes voies de signalisation de la PEBP. Il semble donc possible que PEBP puisse réguler l'apoptose en réponse à ces drogues. Des travaux réalisés sur les cancers du sein et de la prostate ont montré que la chimiothérapie induit l'expression de PEBP qui sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose (Chatterjee et al., 2004). Par exemple, dans des cellules cancéreuses de prostate DU145 en présence de 9-nitrocamptothécine (9NC - inhibiteur de la topoisomérase I), les cellules subissaient une apoptose généralisée accompagnée d'une augmentation significative de RKIP (Pantazis et al., 2003). Or il existe une lignée de cellules RC1 issue de la lignée DU145 qui est résistante au traitement par le 9NC et pour laquelle aucune augmentation de RKIP n'a été observée lors du traitement (Chatterjee et al., 2004). Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'induction de RKIP pourrait donc être nécessaire à l'apoptose induite par le 9NC. Cette hypothèse a été confirmée en montrant que le blocage de RKIP par de petits ARN interférents empêche l'apoptose pour la lignée DU145 traitée par le 9NC, alors qu'à l'inverse l'injection de RKIP restaure la sensibilité des cellules RC1 au 9NC en provoquant leur apoptose. Enfin, le traitement de la

lignée DU145 par d'autres stimulants génotoxiques comme l'étoposide ou le cisplatine provoque également l'induction de l'expression de RKIP (Chatterjee et al., 2004). La corrélation directe entre la sensibilité aux drogues pro-apoptotiques et l'induction de RKIP suggère donc que la surexpression de RKIP pourrait être nécessaire pour l'apoptose des lignées de cellules de cancer de la prostate lors de l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique.

D'autres études ont montré que le Rituximab (anticorps monoclonal dirigé contre le marqueur CD20 des lymphocytes B) prescrit dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens et dans le traitement des cancers qui concernent les lymphocytes B (Huhn et al., 2001), entraîne l'expression de PEBP qui provoque une diminution de la prolifération cellulaire et de l'induction de l'apoptose en agissant sur les voies de transduction du signal MAP-Kinases et NF- κ B (Jazirehi et al., 2004). Par contre, le mécanisme qui permet l'induction de PEBP est actuellement inconnu.

Aussi, d'autres travaux ont montré que la surexpression de PEBP/RKIP dans les cellules cancéreuses de prostate et mélanomes est responsable de l'induction de l'apoptose *via* le récepteur de mort cellulaire DR5 appartenant à la famille des récepteurs au TNF (Baritaki et al., 2007). Plus récemment, il a été montré que dans les mélanocytes non tumoraux, la forme oncogène B-Raf V600E induit l'apoptose des cellules en induisant PEBP.

Tous ces résultats suggèrent que PEBP/RKIP joue le rôle d'inducteur de l'apoptose en réponse à des dérégulations au niveau des voies de signalisation ou en présence d'agents chimiothérapeutiques *via* un mécanisme impliquant les voies Raf/MEK/ERK et NF- κ B.

RKIP et HCNP

La synthèse d'acétylcholine et d'acétylcholine transférase est augmentée d'une manière dose-dépendante par l'addition d'extraits solubles d'hippocampe de rat à une culture de neurones cholinergiques issus du noyau septal median d'un embryon de 16 jours (Ojika and Appel, 1984). Cette augmentation est due à un peptide acétylé de 11 acides aminés le HCNP (Hippocampal Cholinergic neuropeptide) purifié à partir de l'hippocampe de jeunes rats dont la structure est la suivante : acetyl-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu (Ojika et

al., 1992). La forme non acétylée est également présente dans l'hippocampe et possède aussi une activité biologique (Ojika et al., 1995).

Cette stimulation de l'activité cholinergique est en fonction de l'âge ; les valeurs les plus faibles sont obtenues par les extraits hippocampaux des rats les plus vieux (12 mois). Le HCNP pourrait donc être un facteur neurotrophique lors du développement de l'hippocampe et il pourrait jouer un rôle important pour la mémoire et l'apprentissage. D'ailleurs, le HCNP s'accumule dans les corps de Hirano au niveau de l'hippocampe. Les corps de Hirano sont des inclusions éosinophiles filamenteuses paracrystallines présentes surtout dans les dendrites et péricaryons des neurones des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer et de certaines autres maladies neuro-dégénératives.

Le précurseur de ce peptide est La PEBP-1. En général, le clivage de protéines précurseur se fait sur les sites contenant des acides aminés basiques par divers protéases (Viereck and Beinfeld, 1992). Dans d'autres cas, certains peptide bioactive ne possèdent pas de résidus d'acides aminés basiques sur leur site de clivage comme indique par exemple la séquence de la PEBP). Dans ces cas, le clivage se fait à l'aide de chymotrypsin-like proteases (Docherty and Steiner, 1982). En 1996, Ojika et Otsuka ont montré que le clivage de La PEBP pour donner le HCNP est réalisé par une enzyme spécifique de 68 KDa dont son activité est maximale à pH 6 (Ojika et al., 1996).

HCNP et PEBP se trouvent dans plusieurs tissus que ce soient des tissus neuronaux ou non. Leurs expressions diminuent avec l'âge, et leurs fonctions diffèrent selon le tissu dans lequel elles sont exprimées. Les deux protéines sont présentes dans la matrice des granules sécrétoires des cellules chromaffines bovines de la médullo-surrénale. Ces cellules dérivent de la crête neurale embryonnaire. Quand le nerf splanchnique est stimulé, Elles relarguent en même temps que les catécholamines un mélange complexe de protéines et de peptides, directement dans le sang. Vu le rôle des catécholamines dans la physiologie cardiaque, les chercheurs ont vérifié si le HCNP et la PEBP possédaient aussi des effets sur la physiologie cardiaque. Ils ont pu montrer que le HCNP agit avec un effet inotropique négatif sur un cœur de grenouille isolé et perfusé. Il diminue la contractilité à une gamme de concentration de 10^{-11} à 10^{-7} . De plus, ce peptide était capable d'inhiber totalement et à une concentration de 10^{-10} les effets d'isoprotérénol, un agoniste β -adrénergique. Ainsi Goumon a suggéré que PEBP et

HCNP peuvent être considérés comme des facteurs endocrines impliqués dans la physiologie cardiaque (Goumon et al., 2004).

RKIP et la maladie d'Alzheimer (AD)

La maladie d'Alzheimer est l'une des maladies neuro-dégénératives les plus communes chez l'homme. Les personnes atteintes par cette maladie manifestent une diminution progressive des fonctions cognitives. Ceci inclut la perte de mémoire, l'aphasie, l'apraxie et l'agnosie. Il s'avère qu'il existe deux types AD : un type qui touche les individus dont l'âge est inférieure à 65 (AD-familiale) et l'autre type qui concerne les individus dont l'âge est supérieur à 65 (AD-sporadique ou non-familiale).

L'AD-familiale est lié à une mutation de trois gènes : le gène APP qui code pour un précurseur de la protéine amyloïde, le gène PS1 presenilin 1 et le gène presenilin 2. Une mutation de APP, PS1 et PS2 est trouvée chez 30% de ces patients.

Les gènes qui interviennent dans l'AD-non familiale sont encore non identifiés, par contre des facteurs de risques comme l'apolipoprotéine E (ApoE) sont connus. Il faut noter que la maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle qui résulte d'une expression altérée de plusieurs gènes.

Par hybridation *in situ*, il a été montré une diminution significative de l'expression d'ARNm de PEBP/RKIP dans le cerveau des patients touchés par l'AD-non familiale (Maki et al., 2002) et plus précisément dans la région CA1 de l'hippocampe. HCNP et NGF maintiennent dans le cerveau un taux élevé d'acétylcholine transférase qui est nécessaire au développement des neurones cholinergiques du noyau septal médian. PEBP en tant que précurseur du HCNP, affecte énormément cette fonction cholinergique. Un dysfonctionnement de cette activité cholinergique est souvent associé avec des troubles de mémoire liés à l'âge, un des symptômes caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Aussi, sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, la lignée transgénique Tg2576, les chercheurs ont montré une corrélation significative entre la formation de plaque beta amyloïde A β et la diminution de l'expression de RKIP-1.

Le Knock-out de PEBP-1 chez la souris, montre une expression ubiquitaire de cette protéine dans les formations limbiques surtout au niveau des noyaux olfactifs, de l'aire préoptique, de l'hippocampe, des noyaux hypothalamiques, des amygdales, et du neocortex.

Ces mêmes souris âgées de quatre mois souffrent de problèmes d'apprentissage et d'un déficit olfactif. Un déclin dans la perception olfactive est aussi une caractéristique des patients atteints d'AD (Solomon et al., 1998) et le test de discrimination olfactif permet de distinguer entre les patients atteints d'AD et les individus non atteints mais déprimés chez qui le sens olfactif est moins troublé.

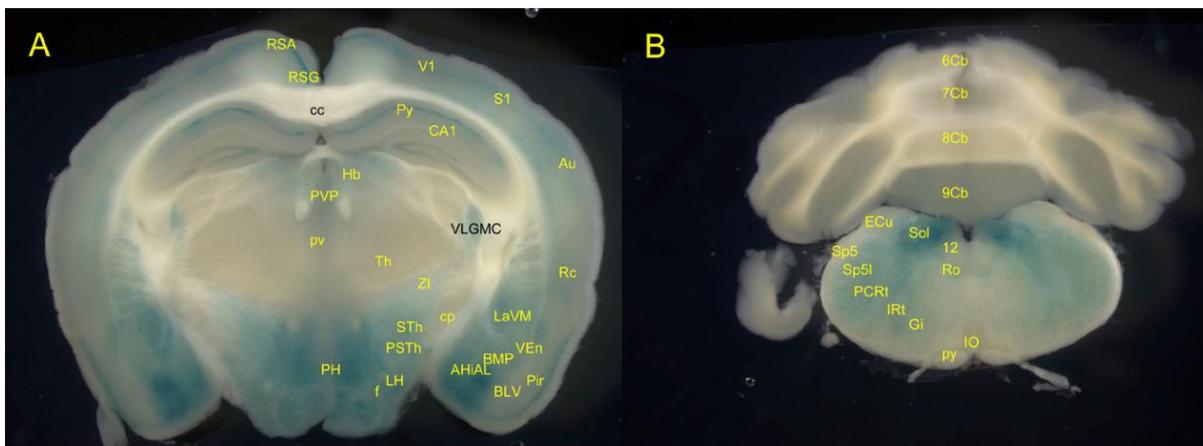


Figure 8. Expression de RKIP dans le cerveau de souris (Theroux et al., 2007). On voit l'expression en bleu du gène reporter β -geo sur des coupes de cerveau de souris de 5 mois. Nos résultats (Article 5) conviennent avec ce qui est présenté par ces expériences.

RKIP et diabète

Le diabète est une maladie, qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline (type I) ou que l'organisme ne répond pas correctement à l'insuline qu'il produit (type II). Les cellules bêta constituent l'un des types cellulaires du pancréas et sont responsables de la sécrétion de l'insuline. En 2004, Zhang et al, ont montré que RKIP est exprimée dans les îlots de Langerhans du pancréas et colocalisée avec les cellules productrices d'insuline et du polypeptide pancréatique PP (peptide de régulation). La même équipe a montré aussi que RKIP est moins exprimée dans les insulinomes humains et inhibe la prolifération de la lignée de cellules bêta. Ces données suggèrent que RKIP a un rôle dans la régulation et de prolifération au sein des îlots pancréatiques.

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la prolifération et la différenciation des cellules bêta pourrait conduire à de nouvelles stratégies pour le traitement du diabète (Zhang et al., 2004).

Les OTLF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) sont des rats qui développent le diabète de type II juste soixante semaines après leur naissance. Ils constituent le modèle-type pour étudier le diabète II (mauvaise réponse à l'insuline par l'organisme). Le traitement de ces rats par le fenofibrate (320 mg/kg), un agoniste de PPAR α , augmente la sensibilité de l'insuline dans les tissus périphériques. Par spectrométrie de masse, la PEBP/RKIP a été identifiée parmi les protéines qui étaient différentiellement exprimées. Comme on a vu précédemment, RKIP est connu pour son rôle inhibiteur de la voie ERK par interaction directe avec Raf-1-kinase. En effet, dans le cas d'un diabète, ERK est activée par les cytokines, ce qui augmente la résistance à l'insuline. Donc on peut penser que RKIP peut avoir un rôle dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et du métabolisme lipidique (Hahm et al., 2010).

RKIP dans le règne végétal

Les PEBP/RKIP des plantes jouent un rôle très important dans leur architecture, plus particulièrement au niveau de leur inflorescence. L'inflorescence est la disposition des fleurs sur la tige d'une plante à fleur. On distingue deux types d'inflorescence : indéfinie et définie, selon que l'axe principal de l'inflorescence est déterminé par un bourgeon ou une fleur. Ce phénomène a été étudié par mutation de gènes appartenant à la famille des PEBP : TFL1 (TERMINAL FLOWER1) chez *Arabidopsis thaliana*, CEN (CENTRORADIALIS) chez *Antirrhinum centroradialis* (*gueule de loup*) et SELF PRUNING chez *Lycopersicon esculentum* (*tomate*). Plus tard, avec le séquençage entier du génome du riz et les EST d'autres espèces agronomiques, plusieurs analyses phylogénomiques ont été faites afin d'obtenir un aperçu de l'histoire évolutive de la famille des PEBP et éventuellement en déduire des possibles conservations des fonctions à partir des modèles *in silico*.

Chez *A. thaliana*, le méristème végétatif se caractérise par des métamères très courts et la transition à l'état d'inflorescence se traduit par un allongement de la tige. Un réseau complexe de voies de signalisation contrôle la transition florale du méristème végétatif apical vers l'état reproducteur ou méristème floral. Deux gènes principaux le FT (Flowering Locus T) et TFL1 (Terminal Flower1) avec quatre autres le TSF (Twin sister of FT), BFT (Brother of FT and

TFL1), ATC (*Arabidopsis thaliana* Centrodialis homologue) et le MFT (Mother of FT and TFL1) forment la famille de PEBP chez *Arabidopsis*. FT et TFL1 agissent au niveau des promoteurs intervenant dans la formation des fleurs **AP1** par une interaction physique directe avec le facteur de transcription FD qui fait partie de la famille des bZIP (basic Leucine Zipper Protein) et qui est fortement exprimé au niveau du méristème apicale de la plante.

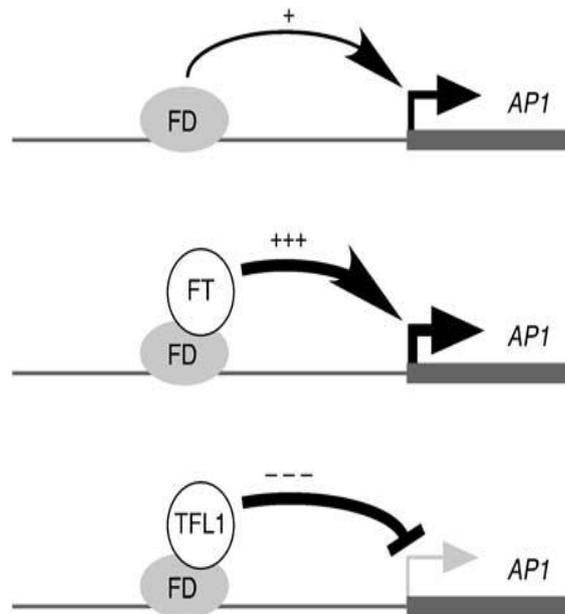


Figure 9. Modèle d'interaction du FD avec FT et TFL1.

TFL1 et FT présentent de fortes similitudes et ont des effets opposés sur l'inflorescence : FT induit l'inflorescence tandis que TFL1 la réprime. La région impliquée dans cette différence d'activité consiste en un segment de 14 résidus qui a beaucoup évolué chez les orthologues de TFL1 mais qui reste très conservé chez les orthologues de FT. Les structures cristallines des protéines recombinantes produites en *E.coli*, montrent que ce segment forme une boucle externe de conformation variable (résidu 128-145) et que la différence d'activité est due à un résidu sur la boucle de TFL1 qui forme une liaison hydrogène avec un autre résidu près de l'entrée d'une poche potentielle de ligand : His88 chez TFL1 et Tyr85 chez FT (Ahn et al., 2006).

FT ne joue pas seulement un rôle dans l'inflorescence mais aussi dans la dormance et dans l'éclosion des bourgeons. Des études récentes montrent que la protéine codée par FT est transporté des feuilles vers l'apex à travers le phloème. En effet, la surexpression de CONSTANS (CO), activateur de FT, spécialement exprimé dans le phloème, permet

également une surexpression de FT. Cette dernière est suffisante pour induire une floraison précoce, suggérant que FT est capable de traverser du système vasculaire jusqu'au système apical (Wigge, 2011). FT serait donc une hormone des feuilles interagissant directement avec un facteur de transcription FD au niveau du méristème apical. Ce mécanisme s'apparente à celui des stéroïdes bien que la structure de FT soit probablement différente.

Le gène SP (Self Pruning) homologue de TFL1/FT et CEN est responsable de l'alternance de phases végétatives et reproductives chez la tomate qui est une plante sympodiale. Chez le type sauvage, le méristème apical se limite à une inflorescence tandis que la croissance se poursuit par un méristème latéral. Ce dernier répète à son tour le même processus. L'ensemble de ces méristèmes multiples obtenus constitue la tige, contrairement à *Arabidopsis* et *Antirrhinum* qui sont des plantes monopodiales, c'est-à-dire provenant d'un même méristème. Chez le mutant sp (la proline 76 est substituée par une leucine) ou lors de la suppression du gène par un ARN anti-sens, le nombre de feuilles diminue progressivement au niveau de l'unité sympodiale au fur et à mesure du vieillissement de la plante (trois, puis deux, puis une) et finalement sa pousse se termine par deux inflorescences successives. Le mutant ne modifie pas l'architecture globale de la plante sympodiale mais présente plutôt une rupture de la régularité des cycles d'alternance des phases végétatives et reproductives.

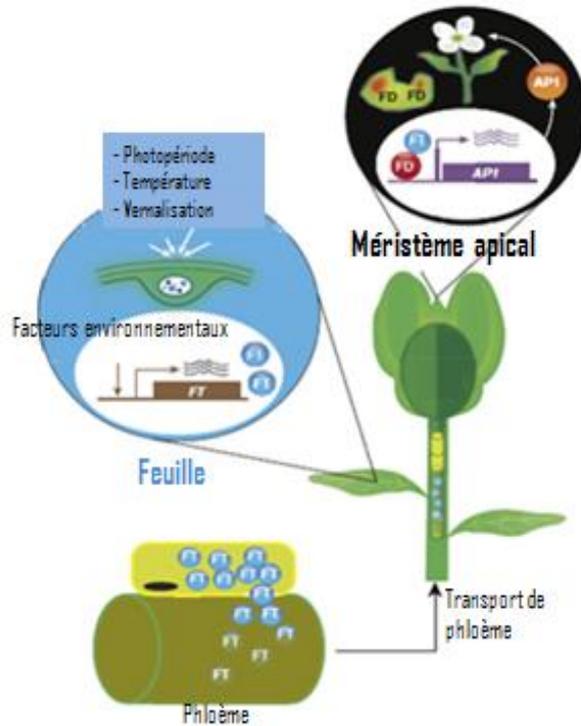


Figure 10. FT transporté par le phloème des feuilles au méristème apical où il interagit directement avec le facteur de transcription FD (Wigge 2011 modifié).

Contrairement aux mutants de SP, les mutants de CEN chez *Antirrhinum centroradialis* ont un phénotype remarquable car l'architecture de la plante est totalement modifiée. La plante est plus petite et plus touffue car la croissance de sa tige s'arrête prématurément. L'inflorescence indéterminée est convertie en inflorescence déterminée où le méristème apicale est transformé en fleur (Bradley et al., 1996).

Des homologues de FT appartenant donc à la famille des PEBP, ont été décrits aussi chez le riz. Lorsque ces gènes sont inactivés, la plante ne fleurit jamais. Le riz, à l'opposé d'*Arabidopsis*, est une plante à jour court ou nyctipériodique qui ne fleurit que si la durée de la phase lumineuse au cours d'une journée est inférieure à un seuil critique. Cette caractéristique est directement reliée à l'expression du gène FT du riz, le Hda3, qui est peu exprimé pendant les jours longs, et qui est en revanche très exprimé pendant les jours courts. Le Hd1, l'homologue chez le riz de CO d'*Arabidopsis*, active l'expression de FT du riz pendant les jours courts, et le réprime pendant les jours longs (Hayama et al., 2003).

Les protéines de la famille des PEBP jouent donc des rôles centraux dans la régulation du développement et de la reproduction des plantes selon des mécanismes inconnus chez les animaux.

La PEBP/RKIP a conquis notre attention vu les rôles importants qu'elle peut jouer et le fait d'avoir un anticorps par hasard qui reconnaît cette protéine sous son état réduit et non réduit, nous avons décidé de la purifier de la fraction testiculaire bovine là où on l'a trouvée par abondance. Une fois purifiée, nous avons décidé de faire des anticorps anti-PEBP spécifiques (de titre plus important que l'anticorps de départ). Cet anticorps va nous servir pour développer un dosage de PEBP sensible qui sera décrit pour la première fois.

Les objectifs

On ne connaît que les gènes *gpa2* et *gpb5* et n'ont été décrites que les propriétés de GPA2 et de GPB5 recombinantes artificiellement associées de manière covalente. Les protéines

naturelles n'ont jamais été décrites jusqu'à nos jours, et puisque ces gènes ont été conservés au cours de l'évolution on estime que leurs produits doivent jouer des rôles primordiaux et comme GPB5 ne possède pas de ceinture de sécurité (dans la région C-terminale) contrairement aux sous-unités β des hormones glycoprotéiques. Ainsi, nous pensons que contrairement à ce qui a été publié par d'autres, GPA2 et GPB5 ne forment pas d'hétérodimères mais joueraient des rôles distincts. Afin d'étudier leur dimerisation (ou non) et pour arriver aux produits naturels une démarche a été suivie et se résume en gros par les points suivants :

1. Déterminer où et quand les produits GPA2 et GPB5 de ces gènes sont synthétisés chez notre modèle le bos taurus.
2. Produire et purifier les GPA2 et GPB5 recombinantes et en caractériser la portion glycoprotéique.
3. Déterminer si elles forment un dimère stable (analogie avec les $\alpha + \beta$ des hormones glycoprotéiques).
4. Produire et caractériser des anticorps anti-peptides de GPA2 et GPB5 bovins.
5. Purifier les GPA2 et GPB5 naturelles et en caractériser la nature protéique ou glycoprotéique.
6. Déterminer les rôles biologiques respectifs de GPA2 et GPB5 (si pas de dimère) ou communs (si dimère).
7. Étudier si GPA2 et/ou GPB5 possèdent une activité PDI comme les gonadotropines.

L'obtention inattendue d'un anticorps contre une PEBP dont les rôles sont essentiellement connus au travers d'expérimentations d'inactivation ou de surexpression de leurs gènes chez différentes espèces, nous a permis de saisir cette opportunité pour nous intéresser à la protéine elle-même : à sa purification, ses propriétés physicochimiques, son dosage et envisager pour l'avenir l'étude de ses relations structure-activités.

Résultats

Nos résultats vont être présentés ci-après sous forme de cinq articles dont deux sont publiés et trois encore en préparation.

Les trois premiers articles concernent la famille des hormones glycoprotéiques (GPH) :

1. Tout d'abord une étude de la stabilité de la structure quaternaire des LHs et FSHs de trois espèces en exergue des questions que pose la structure des GPA2 et GPB5 (hétérodimérisation ou non ?) (Article en préparation).
2. Ensuite une étude de l'activité de la PDI hépatique bovine et de sa sensibilité à divers perturbateurs endocriniens pour tenir compte du fait que LH et FSH possèdent une activité PDI et que nous souhaiterions à l'avenir déterminer si GPA2 et/ou GPB5 possèdent une telle activité (Article publié).
3. Enfin dans cette partie, nous présenterons nos résultats sur le clonage des ADNc des GPA2 et GPB5 bovines qui sont le préalable à l'expression des protéines recombinantes et à l'étude de leur structure (hétérodimérique ou non ?) en vue de la production d'anticorps qui permettront le suivi des GPA2 et GPB5 naturelles pour leur purification (Article en préparation).

Les deux derniers articles concernent la PEBP (RKIP) sur laquelle nous sommes tombés par hasard et à laquelle nous nous sommes intéressés pendant la troisième année de ma thèse :

4. Tout d'abord une mise au point d'une purification originale de la PEBP testiculaire bovine, et de l'ubiquitine et la caractérisation de ces deux protéines (Article publié).
5. Ensuite la production d'anticorps dirigés contre la PEBP ainsi purifiée et leur utilisation pour la mise au point d'un EIA et la recherche tissulaire de la PEBP par immunohistochimie (Article en préparation).

Pour chacun des articles, une courte introduction est proposée afin de montrer l'articulation de chacun d'eux avec l'ensemble du travail.

Article 1 - Differential thermal stability of human, bovine and ovine Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) quaternary structures (In preparation)

Ce travail a été effectué pour mieux comprendre les gonadotropines bovines et leurs structures. En effet, La FSH bovine a été toujours difficile à purifier, nous avons alors décidé de purifier de la FSH bovine à partir d'une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium d'un broyat d'hypophyse bovine. Les résultats obtenus nous montrent des quantités faibles de FSH bovines dans les fractions P50 et P80 hypophysaires. Pour mieux comprendre ce rendement faible, on s'est intéressé à étudier la structure quaternaire de la FSH bovine.

En étudiant la structure quaternaire de FSH chez différents espèces (humaine, bovine et ovine), on a pu montrer en se basant sur la technique d'Elisa sandwich en utilisant des anticorps spécifiques de la sous-unité α et de la sous-unité β que les gonadotropines bovines possèdent certaine fragilité structurale par rapport aux autres espèces étudiées. Ainsi la FSH bovine possède une température de dissociation inférieure à 60°C. Par contre, les autres FSH testés humaines et ovines, leurs températures de dissociation se situent entre 68-74°C. En même temps on s'est retrouvé avec une FSH ovine qui résiste à la dissociation à 93°C.

Differential thermal stability of human, bovine and ovine Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) quaternary structures

Maya HAJ HASSAN, Claire CAHOREAU, François LECOMPTE, Danièle KLETT and Yves COMBARNOUS

Abstract

Quaternary structure of human, bovine and ovine Follicle-Stimulating Hormones (hFSH, bFSH and oFSH) and Luteinizing Hormone was assessed in sandwich ELISAs using either a monoclonal anti-oFSH β antiserum or an anti-LH β antiserum for capture and a biotinylated anti-hFSH α (α 4 epitope) for detection. Neither free α or β subunits gave any signal in this assay so that it was possible to measure the residual heterodimeric fraction after thermal treatment of the three FSHs under study. The hormones were submitted to 5-min heating between 37 and 90°C before rapid cooling in melting ice before ELISA. The data showed half-dissociation of natural and recombinant human and ovine FSH preparations between 68-74°C whereas bovine FSH preparations exhibited much lower stability with half-dissociation below 60°C. The FSH and LH from the same species exhibited identical stability of their quaternary structure confirming the similarity of their inter-subunit interfaces. Moreover whereas all human and bovine as well as most ovine FSH preparations were fully dissociated at temperatures above 80°C, one natural ovine FSH preparation contained a large fraction that resisted to dissociation at 93°C. This suggests the existence of FSH $\alpha\beta$ heterodimer with covalently linked subunits in ovine pituitary. The chemical nature of this inter-subunit bond remains to be determined.

1. Introduction

Glycoprotein hormones (Luteinizing Hormone LH, Follicle-Stimulating Hormone FSH, Chorionic Gonadotropin CG and Thyroid-Stimulating Hormone TSH) are comprised of two dissimilar, non-covalently bound glycoproteic subunits, named α and β (Pierce and Parsons, 1981). The α -subunit is common to all of them and it is encoded by a unique gene whereas β -subunits are different and confer hormonal specificity to each $\alpha\beta$ heterodimer (Combarrous, 1992). The 1:1 association of α and β subunits is mandatory for the expression of hormonal activity and the conformational stability of the heterodimers is thus of particular interest.

In a previous work, we have shown that short-term incubation of glycoprotein hormones at various temperatures and measurement of residual dimer by micro-HPLC or SDS-PAGE or sandwich ELISA provide similar values as microcalorimetry for the measurement of their conformational stability. Compared to physico-chemical techniques (HPLC and SDS-PAGE), sandwich ELISA allows to determine this parameter using hormones that are not highly purified thanks to the high specificity of the antibodies towards the α and β subunits respectively.

In the present work, the short-term thermal stability of FSH and LH from human, bovine and ovine species was studied and compared to our previous data concerning the equine gonadotropins eLH and eCG as well as hCG (Legardinier et al).

2. Materials and Methods

Hormones :

oFSH RP1 and oFSH RP2 (NIH, NICDD), oFSH VAL (our lab),

bFSH NIH I2 (NIH), bFSH phe-III, bFSH CY1131, bFSH CY1132-Ia, bFSH CY2672-III, bFSH CY2683-I and bFSH CY2683-II (our lab)

hFSH **xx** (Ferring), hFSH I3, hFSH SIAFP-1 and rec hFSH NIH (Parlow)

pFSH **xx** (Beckers, Univ Liège, Bel)

eFSH CY1368

oLH CY**xxxx** (our lab)

bLH **??**

hLH **??**

Incubation

Heat treatments were performed in 50µl in PBS buffer pH7.4 at a concentration of in 200µl-PCR tubes (fourniss) that were incubated in a water bath at fixed temperatures between 37 and 93°C. These temperatures were measured in parallel by one graduated alcohol thermometer and one electronic thermometer (). After 5 minutes of incubation at the desired temperature, the tubes were immediately plunged in melting ice. For the sake of comparison, different hormones were incubated in parallel.

Antibodies and ELISA

Monoclonal anti-oFSH (refs) was kindly provided by Dr Keith Henderson and Jenny Juengel (AgResearch, NZ); anti-oLH was ... Monoclonal anti-hFSH MCA1026 directed against the α 4 epitope (refs Dirnhoffer, Berger) was purchased from Serotec (). Its biotinylation was performed either by NHS coupling on lysine residues or by xx coupling on sugar moiety after their mild performic oxidation (ref). The latter is preferable as there is no risk of modifying amino acid residues belonging to the paratope.

The specific anti-oFSH (1/10000?) and anti-oLH (1/10000?) antisera were used for coating of Maxisorb microtiter plate (Nunc, Denmark) wells overnight at 4°C in 100µl carbonate buffer pH 9.6. All wells were subsequently overcoated with 150µl assay buffer containing 2mg/ml BSA in PBS-tween. After elimination of the buffer, 100 µl of the media to be assayed, diluted in PBS-tween-BSA were introduced in wells in triplicate and incubated for 1h at room temperature. After 4 washings with 150µl PBS-tween, the detection step was performed.

For detection, the biotinylated anti-hFSH specific for the α 4 epitope present in the common α -subunit of glycoprotein hormones from numerous species was used in all assays. It was used at a concentration of xxx and incubated for 1h at room temperature.

Finally, Neutravidin-Horseradish peroxidase conjugate (ref) was used before peroxidase activity measurement with 100µl TMB (KPL). After 20 min, the absorbance of each well at 450nm and 660nm was detected after acidification of the medium with 50µl 0.2N H₂SO₄.

3.Results

Characterization of the assays

Specificity (species, dimer vs subunits) and sensitivity

Validation of the assay for dissociation measurement

Assay with known amounts of heterodimers and subunits : slopes as a function of heterodimer

Measurement of $\alpha\beta$ heterodimers dissociation

FSHs

LHs

4. Discussion

The sandwich ELISAs described here allow to measure the concentration of heterodimeric FSH and LH from various species and are insensitive to free uncombined α and β subunits from these hormones. These assays were thus useful to follow the heat stability of gonadotropins quaternary structure.

The heterodimeric structure of ovine and human gonadotropins were found to be resistant to short-term heating above 70°C whereas bovine FSH quaternary structure was found to be largely less stable.

A fraction of one of our ovine FSH preparation was found to be resistant to temperatures above 90°C. At the hormone concentration used which is below the equilibrium K_d , recombination of subunits upon cooling after heating is impossible. As it is unlikely that the gonadotropins preserve their folding above 80°C, it can be concluded that the fraction withstanding very high temperature does refold upon cooling and the reformation of the heterodimeric molecule is possible only if the subunits are covalently linked so that low concentration has no impact.

For the moment, we do not know the chemical nature of the intersubunit link (SS bridge, pseudo-peptide bond between a Lys and Glu or Asp residue ?). Also we don't know whether this bond is natural or formed during the extraction and purification steps of the hormone. If it

is natural, it would be interesting to study the quantitative importance of this fraction and its specific biological role.

Article 2 - Potentiation of the reductase activity of protein disulfide isomerase (PDI) by 19-nortestosterone, bacitracin, fluoxetine, and ammonium sulfate (Published)

La PDI est une protéine chaperonne possédant une activité oxydoréductase/isomérase. Elle est principalement localisée dans le réticulum endoplasmique et assiste aux repliements des protéines néo-synthétisées par la formation ou le déplacement correct des ponts disulfures. Elle a été découverte par Anfinsen et son groupe qui ont conclu qu'elle améliore le taux de réactivation de la ribonucléase réduite, protéine contenant 4 ponts disulfures nécessaire à son activité. La PDI n'a pas contribué à l'oxydation de la ribonucléase réduite mais elle a accéléré la formation correcte des ponts disulfures. Ceci a été contrôlé par la reprise de l'activité enzymatique de la ribonucléase.

La PDI se retrouve en abondance chez tous les eucaryotes. Elle est codée par une famille multigénique. Elle est formée approximativement de 490 acides aminés et possède un poids moléculaire de 56 KDa à peu près. La séquence d'ADN de l'enzyme nous a informé qu'elle contient deux segments présentant une homologie avec la thiorédoxine ; une petite protéine ubiquiste (12 KDa) qui catalyse la réduction des ponts disulfures des protéines (Holmgren 1985). Ces segments homologues, désignés A et A', contenant le site actif -Cys-Gly-His-Cys-. Deux autres régions, b et b' ont également une homologie limitée l'une à l'autre.

En 1982, Robillard et Konings ont suggéré que les échanges « dithiol/disulfure » pourraient jouer un rôle dans l'activation des récepteurs. Les réactions d'oxydo-réduction entre ligands et récepteurs ont été décrites dans les systèmes d'insuline (Clark and Harrison, 1985), de prolactine (Yamada and Donner, 1985) de prostaglandines (Peterson et al., 1988) et de catécholamines. La recherche dans les séquences d'acides aminés des hormones glycoprotéiques a montré une homologie entre la sous-unité β et le site actif de la

thiorédoxine. Une séquence similaire existe aussi chez la sous-unité β de FSH. Il s'agit d'un tétrapeptide -Cys-Gly-Pro-Cys-.

Tableau 1. Homologie entre les sous-unités β et l'activité thioredoxine.

Thiorédoxine	-Try-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys
PDI	-Try-Cys-Gly-His-Cys-Lys
LH β	-His-Cys-Gly-Pro-Cys-Arg
FSH β	-His-Cys-Gly-Lys-Cys-Asp

Ainsi, la thiorédoxine possède une activité PDI. Elle est capable de catalyser la réactivation de la ribonucléase réduite et dénaturé (rRNase) et la « Scrambled Rnase » qui contient des ponts disulfures incorrectement établies. Il est de même pour les gonadotropines, il a été montré qu'elles possèdent une forte activité PDI (Grasso et al., 1991, Chew et al., 1995, Boniface and Reichert, 1990). Cette activité est moins forte que la PDI en soi mais plus importante que l'activité de la thiorédoxine. En effet, la réactivation de la rRNase par des concentrations différentes de LH et de FSH, montre une relation directe entre la concentration de l'hormone et le taux de repliements rRNase. En plus, une fois que LH est chauffée à 70°C pendant 15 minutes, son activité thioredoxine diminue nettement (>80%) ce qui indique que l'activité dépend de l'intégrité structurale de l'hormone. L'activité thioredoxine des gonadotropines peut jouer alors un rôle important dans l'association de leurs deux sous-unités, surtout que la séquence qui ressemble à la thiorédoxine se trouve adjacentes à « la boucle de détermination » de la ceinture de sécurité qui porte certainement l'essentiel de la spécificité biologique du dimère selon Ward et Moore (Ward et Moore, 1979).

Dans un travail récent du laboratoire (Klett et al, 2010), il avait été montré que les œstrogènes (l'éthinylestradiol et le bisphénol-A) ainsi que l'indométhacine exercent une inhibition tandis que le medroxyprogestéroneacétate et le nortéstostérone exercent une potentialisation de l'activité réductase de la PDI. Dans l'article présenté et afin d'obtenir une meilleure compréhension des propriétés des ligands qui sont responsable soit de l'inhibition ou de l'augmentation de l'activité réductase de la PDI, nous avons réalisé des tests avec divers molécules autres que celles identifiées en 2010. En utilisant le même substrat le « Di-eosin-oxidized Gluthathion » (DiE-GSSG), trois autres molécules, la bacitracine, la fluoxétine, et le sulfate d'ammonium montrent une augmentation de l'activité réductase de la PDI.

RESEARCH ARTICLE

Potential of the reductase activity of protein disulphide isomerase (PDI) by 19-nortestosterone, bacitracin, fluoxetine, and ammonium sulphate

Maya Haj Hassan¹, Eva Alvarez¹, Claire Cahoreau¹, Danièle Klett², François Lecompte¹, and Yves Combarous²

¹NRA, Nouzilly, France, and ²CNRS INRA, Reproductive Physiology, INRA-PRC, Nouzilly, France

Abstract

Protein disulphide isomerase (PDI) in the endoplasmic reticulum catalyzes the rearrangement of disulphide bridges during folding of secreted proteins. It binds various molecules that inhibit its activity. But here, we looked for molecules that would potentiate its activity. PDI reductase activity was measured *in vitro* using di-eosin-oxidized glutathione as substrate. Its classical inhibitor bacitracin was found to exert a biphasic effect: stimulatory at low concentrations ($\sim 10^{-6}$ M) and inhibitory only at higher concentrations ($\sim 10^{-4}$ – 10^{-3} M). The weak oestrogenic molecule bisphenol A was found to exert a weak inhibitory effect on PDI reductase activity relative to the strong oestrogens, ethynylestradiol, and diethylstilbestrol. Like 19-nortestosterone, fluoxetine was found to exert a potentiating effect on PDI reductase activity and their potentiating effects could be reversed by increasing concentrations of oestrogens. In conclusion, this paper provides the first identification of potentiators of PDI activity that are potential pharmaceuticals against pathologies affecting protein folding such as Alzheimer's disease.

Keywords: Bacitracin, bisphenol A, ethynylestradiol, Alzheimer's disease

Introduction

Protein disulphide isomerase (PDI) has been known for a long time as a protein-folding catalyst¹ involved in the formation of native disulphide bridges of proteins in the endoplasmic reticulum^{2,3}. It binds to numerous ligands including proteins, peptides, and various other molecules. In particular, PDI has been shown to bind oestradiol and this leads to a decrease in its isomerase activity as followed by its activity on RNase renaturation⁴.

Using di-eosin oxidized glutathione (DiE-GSSG) as substrate, it has been previously shown⁵ that all the potent oestrogenic molecules tested [oestradiol, E2; 17 α -ethynylestradiol (EE2) and diethylstilbestrol (DES)] also exhibited an inhibitory effect on PDI reductase activity. Likewise, the non-steroidal anti-inflammatory molecule indomethacin was also found to inhibit PDI reductase activity in the same assay.

Surprisingly, we found that two non-oestrogenic steroids, medroxyprogesterone acetate (MPA) and 19-nortestosterone (19-NT), in contrast potentiated PDI reductase activity⁵. In order to get a better understanding of the ligands properties responsible for inhibition or augmentation of PDI reductase activity, we performed a preliminary screening with various other molecules in order to get a first guess on the molecular structural features of the ligands exhibiting either inhibitory or stimulatory effects, respectively. In addition to the previously identified 19-NT, three other molecules, bacitracin, fluoxetine (FLX) and ammonium sulphate, were found to potentiate PDI reductase activity using DiE-GSSG as substrate.

Materials and methods

Bacitracin (BAC), bisphenol A (BPA), 17 α -EE2, FLX, dithioerythreitol (DTeT), eosin 5-isothiocyanate, GSSG, PDI (E.C. 5.3.4.1) from bovine liver (PDI), were all

Address for Correspondence: Yves Combarous, CNRS INRA, Reproductive Physiology, INRA-PRC, Nouzilly, 37380 France. E-mail: ycomb@free.fr

(Received 30 July 2010; revised 00 00 0000; accepted 07 December 2010)

Abbreviations

19-NT, 19-nortestosterone;
BAC, bacitracin;
BPA, bisphenol A;
DES, diethylstilbestrol;

DiE-GSSG, di-eosin oxidized glutathione;
EE2, ethynylestradiol;
FLX, fluoxetine;
MPA, medroxyprogesterone acetate

purchased from Sigma-Aldrich (Isle-d'Abeau, France) and were of the highest available grades.

The PDI substrate, DiE-GSSG, was synthesized and purified as previously described⁶ with minor modifications⁵.

PDI reductase activity was measured through abolishment of fluorescent self quenching when DiE-GSSG

is reduced into two molecules of E-GSH. Initial velocities in fluorescence increase ($\lambda_{exc} = 518 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$) were recorded using a Spectra-Max Gemini spectrofluorimeter (Molecular Devices, Sunnyvale, California) and analyzed with SoftMaxPro program. Concentrations of the reagents at t_0 were 333 nM for PDI, 2.4 μM for DiE-GSSG, 33 μM for DteT, and 0.1 nM to 100 μM for the

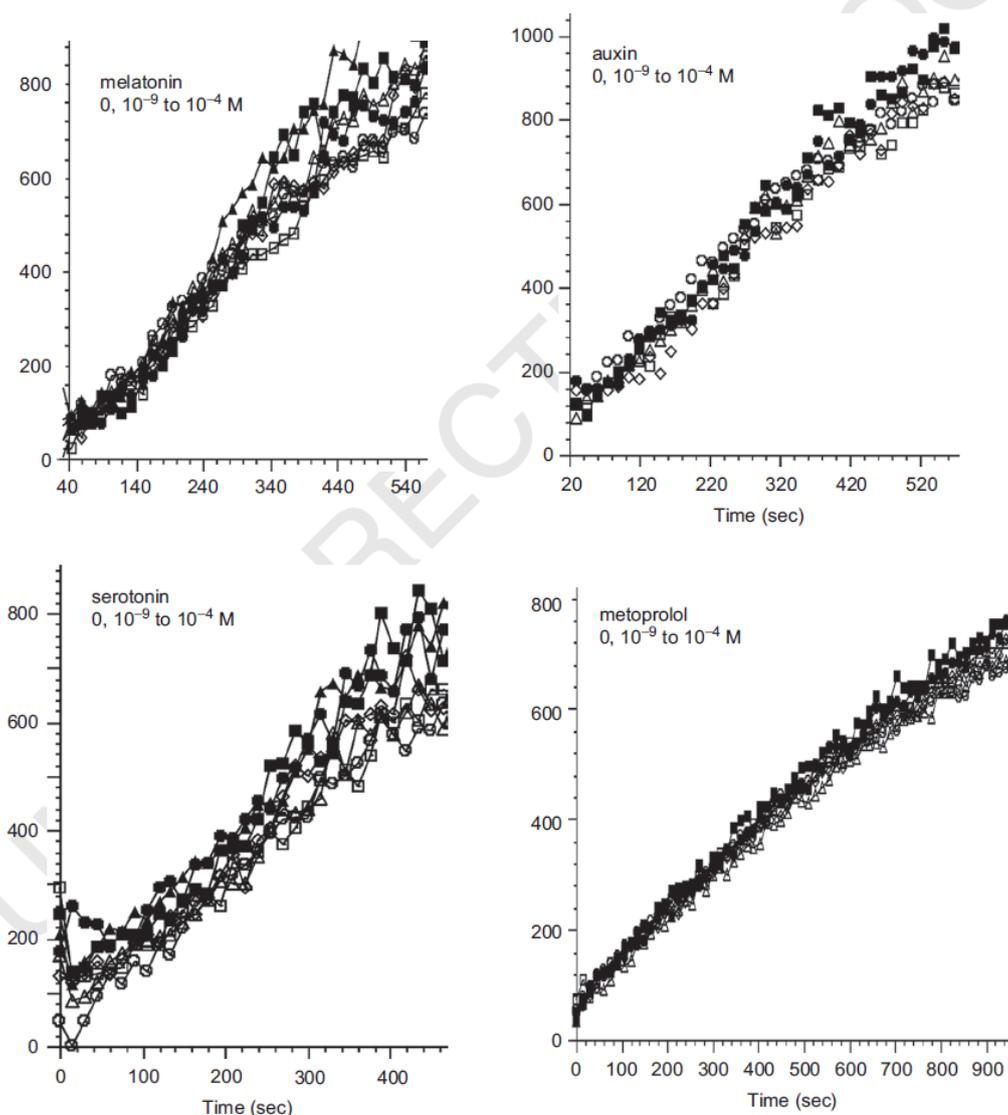


Figure 1. Kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by protein disulphide isomerase in the presence of various concentrations ($0-10^{-4} \text{ M}$) of melatonin, auxin, serotonin or metoprolol.

various molecules under study; except ammonium sulphate and sodium chloride (0.5 M).

Results

In the course of screening for molecules affecting PDI reductase activity using DiE-GSSG as substrate we found a number of molecules without any effect including metoprolol, serotonin, melatonin, and auxin (Figure 1).

Since potent oestrogenic molecules were found to inhibit PDI reductase activity, we looked for a possible effect of the weak oestrogen BPA. Figure 2 shows that BPA only exerted a slight inhibitory effect on PDI reductase activity in the 10^{-6} – 10^{-5} M range.

In order to get further information on PDI-inhibiting molecules, we included BAC that has been known for a long time as an inhibitor of PDI activity (ref). In fact, Figure 3 shows that BAC exerted a biphasic effect on PDI reductase activity. It potentiated PDI activity at around 10^{-6} M final concentration and inhibited it at around 10^{-4} M final concentration.

Interestingly, we observed two new molecules in addition to 19-NT and MPA⁵ exhibiting stimulatory effect on PDI reductase activity. Indeed Figure 4 shows that fluoxetine exerted such a potentiating effect but only in the millimolar range. Figure 5 shows that 0.5 M ammonium sulphate also potentiates PDI reductase activity whereas 0.5 M sodium chloride was without any effect (not shown). We also checked that the increase in fluorescence due to ammonium sulphate was indeed due to a higher production of E-GSH and not to higher fluorescence efficiency.

In order to get a better understanding of the mechanisms of ligands inhibitory and stimulatory effects on PDI reductase activity, we analyzed PDI activity in the simultaneous presence of both potentiating and inhibitory ligands. Figure 6 shows the inhibition of PDI activity by increasing doses of DES in the presence of a potentiating dose of 19-NT whereas Figure 7 shows the inhibitory effect of EE2 in the presence of a potentiating concentration of FLX.

Discussion

PDI is a multifunctional enzyme mainly found in the endoplasmic reticulum of eukaryotes⁷ where its main function is to catalyze the rearrangement (isomerization) of disulphide bridges during folding of membrane and secreted proteins. This activity is of utmost importance as over one-third of all human proteins fold in the endoplasmic reticulum⁸. The concentration of PDI in the lumen of the endoplasmic reticulum is known to be very high⁹ and it has been reported to act as a high capacity reservoir for various ligands including hormones such as oestradiol (E2) and thyroxine (T3^{4,10}).

It has been previously shown that all the potent oestrogenic molecules tested (E2, EE2, DES) exhibited an inhibitory effect on PDI isomerase^{4,11} and reductase⁵ activities. In the present work, we show that the weaker oestrogen BPA also exerts an inhibitory effect on PDI reductase activity. This result is consistent with previous observation that BPA inhibited the chaperone activity of PDI on RNase renaturation^{12,13}. We found BPA to inhibit only partially (15%) PDI reductase activity and it did so

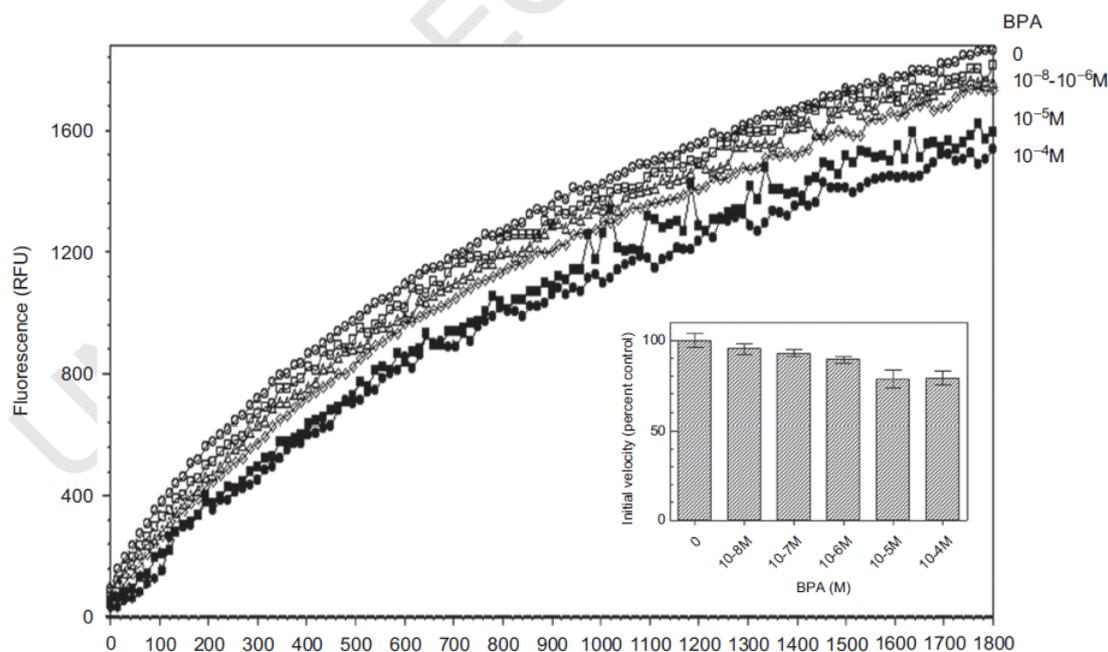


Figure 2. Kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by protein disulphide isomerase in the presence of various concentrations (0 – 10^{-4} M) of bisphenol A. BPA, bisphenol A; RFU, relative fluorescence unit.

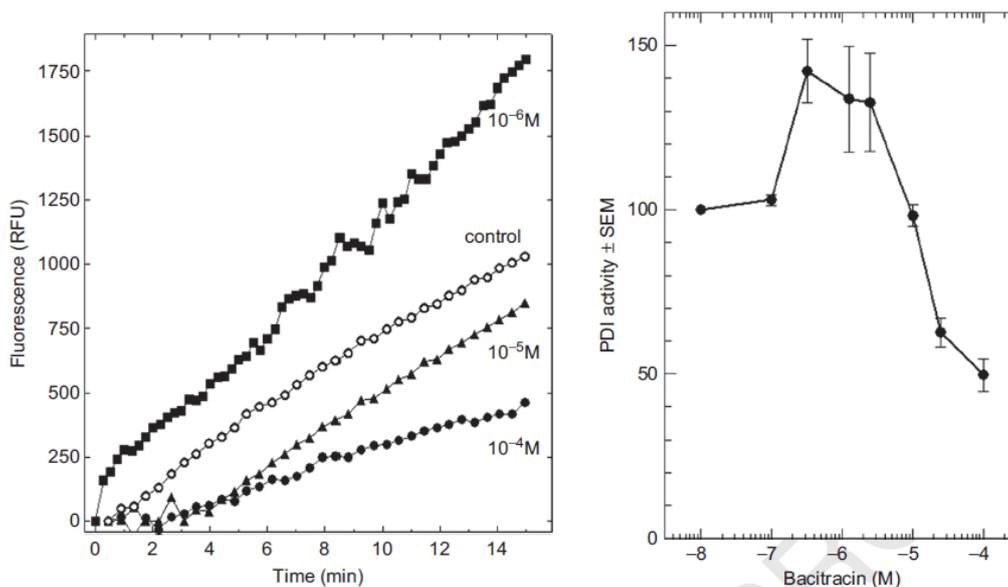


Figure 3. Effect of increasing concentrations of bacitracin (BAC) on protein disulphide isomerase (PDI) reductase activity. Left panel: kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by PDI in the presence of various concentrations ($0-10^{-4}$ M) of BAC. Right panel: initial velocity of PDI reducing activity as a function of BAC concentration relative to the velocity in the absence of bacitracin taken as control ($n=3$). RFU, relative fluorescence unit.

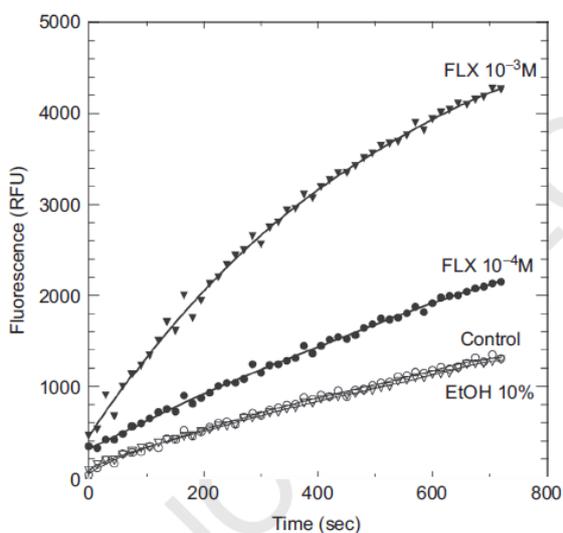


Figure 4. Kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by protein disulphide isomerase in the presence of various concentrations ($0, 10^{-4}, 10^{-3}$ M) of fluoxetine (FLX). The figure also shows the effect of 10% ethanol alone as also present with 10^{-3} M FLX.

at much higher concentrations ($10^{-5}-10^{-4}$ M) than the more oestrogenic molecules ($10^{-9}-10^{-8}$ M). This difference between the inhibitory doses of BPA and those of the potent oestrogenic molecules (E2, EE2, DES) on PDI reductase activity is roughly in the same order of magnitude as their relative oestrogenic activities¹⁴⁻²¹. It can be that, in some way, the binding sites for these different

molecules in the oestrogen receptors (ER) and in PDI, respectively are similar enough to explain their similar relative binding affinities for EE2 and BPA, respectively (although this ratio is variable among species and between males and females). Another more exciting possibility relies on the observations that PDI is also present in locations other than the endoplasmic reticulum²² and can directly interact with the ER α and modify its functional properties²³. A provoking but tenable hypothesis is that the binding of oestrogenic molecules to PDI would play a pivotal role in the stimulation of ER through this direct ER α -PDI interaction.

Since serotonin, melatonin, and auxin are derived from the indolic di-cyclic amino-acid tryptophan, we suspected that they could also exert some inhibitory effect on PDI activity. In fact, we found that they all had no effect on PDI activity at concentrations up to up to 10^{-4} M (Figure 1). The β -1 adrenergic receptor antagonists, metoprolol (Figure 1) and atenolol (not shown) also did not exert any effect on PDI activity.

In a previous paper⁵, we reported that two non-oestrogenic steroids, MPA, and 19-NT potentiated PDI reductase activity. Even with a somewhat limited screening, in the present study we were able to identify a few other molecules also potentiating PDI reductase activity using the recently developed assay with DIE-GSSG as substrate⁶.

Surprisingly, the well-known inhibitor of PDI activity BAC^{24,25} was found to exert potentiating activity and it did so at lower concentrations (around 10^{-6} M) than those leading to the expected inhibition (around 10^{-4} M). BAC is a partly-cyclic polypeptide²⁶ and to our knowledge, there is no clear structural explanation for its mechanism

of inhibition of PDI activities. The present data showing a biphasic dose-response effect of BAC on PDI reductase activity might be helpful in future studies to better understand the PDI mechanism of action.

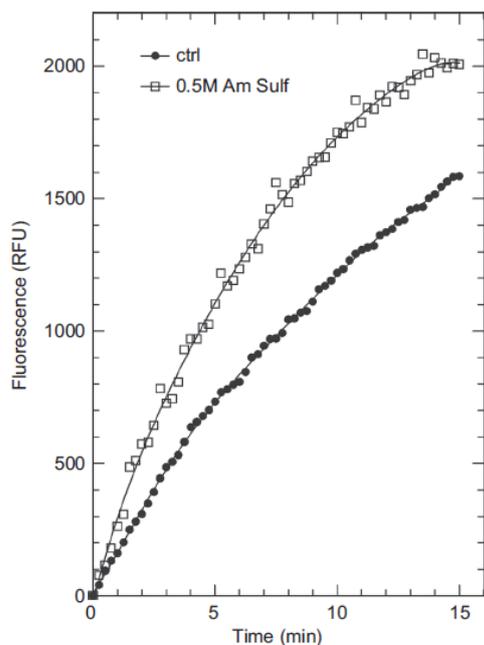


Figure 5. Kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by protein disulphide isomerase in the presence or absence of 0.5M ammonium sulphate. RFU, relative fluorescence unit.

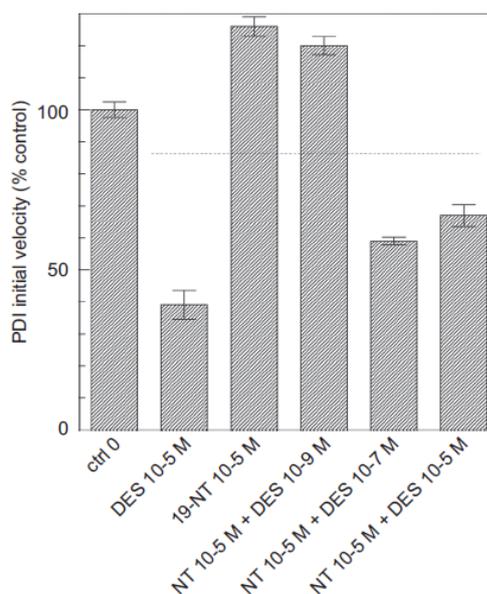
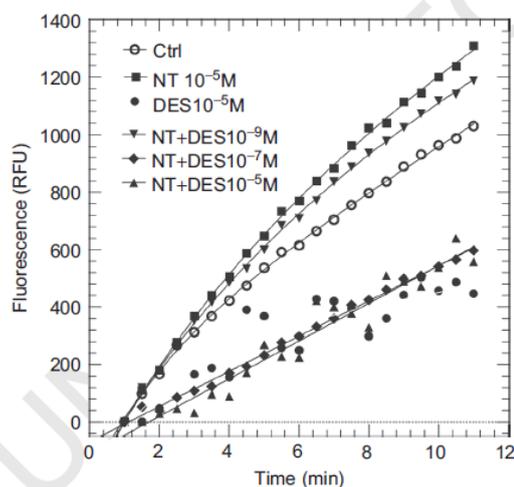


Figure 6. Inhibition of protein disulphide isomerase (PDI) reductase activity by diethylstilbestrol (DES) in the presence of a potentiating concentration of 19-nortestosterone (19-NT). Left panel: kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by PDI in the presence of 10^{-5} M of either DES or 19-NT or in the presence of 10^{-5} M 19-NT together with various concentrations (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} M) of DES. Right panel: initial velocity of PDI reducing activity in the presence of either DES or 19-NT alone or in combination (data from left panel). RFU, relative fluorescence unit.

The most efficient potentiating molecule we have identified so far is FLX which is known to act as a selective-serotonin-reuptake inhibitor and is the active component in the antidepressant Prozac^{™27}. FLX was found in our study to greatly increase PDI reductase activity but this effect was observed only at millimolar concentration which is largely higher than its active circulating concentrations²⁸. The observed augmentation of PDI reductase activity by FLX is therefore not responsible for any of its favourable or unfavourable pharmacological effects²⁹⁻³³. Nevertheless, the molecular structure of FLX offers an interesting basis for the search of molecules with higher PDI potentiating activities, in order to better understand the molecular mechanism of this enzyme.

Ammonium sulphate (0.5 M) was also found to potentiate PDI reductase activity in contrast to 0.5 M NaCl. It is likely that the mechanism involved is totally different from those implied for 19-NT, BAC, or FLX. The chaotropic/kosmotropic property of ammonium sulphate is well known and greatly influences protein stability and activity^{34,35}, and their crystallization capacity³⁶. It is therefore possible that ammonium sulphate can influence PDI catalytic efficiency by favouring its active conformation as previously shown for glutamate decarboxylase³⁷ and consistent with the observation that PDI, like thioredoxins and transglutaminases, resist detergents and chaotropic agents³⁸. Another possibility is that ammonium sulphate act by altering water properties and therefore either water-protein interactions³⁵ or the active concentration of substrate. This latter mechanism would thus be independent of PDI properties.

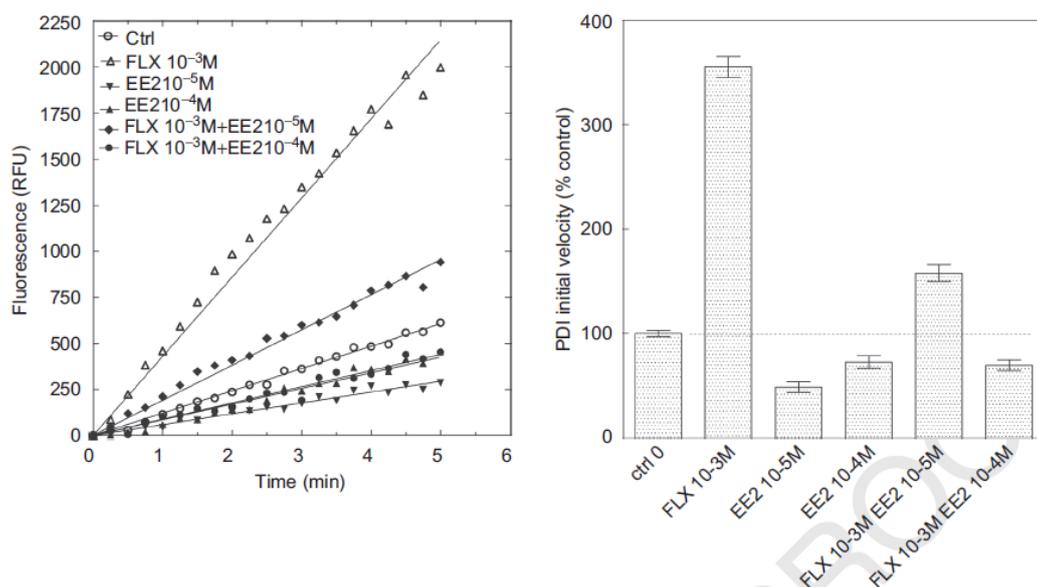


Figure 7. Inhibition of protein disulphide isomerase (PDI) reductase activity by ethynylestradiol (EE2) in the presence of a potentiating concentration of fluoxetine (FLX). Left panel: kinetics of di-eosin oxidized glutathione reduction into fluorescent E-GSH catalyzed by PDI in the presence of 10⁻³ M FLX or 10⁻⁵ or 10⁻⁴ M EE2 alone or in the presence of 10⁻³ M FLX. Right panel: initial velocity of PDI reducing activity in the presence of either FLX or EE2 alone or in combination. RFU, relative fluorescence unit.

To our knowledge, this paper and the previous one from our laboratory⁵ are the first to describe ligands that potentiate PDI activity. Molecules with such a potentiating effect on PDI activity would be of utmost interest for the treatment of pathologies originating from intracellular protein aggregation. This concerns mainly neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease^{39,40} but augmentation of PDI activity would also be expected to have favourable effects in situations where its inhibition by millimolar concentrations of BAC was found detrimental such as in angiogenesis⁴¹ or stroke protection⁴².

The molecules we have shown so far to exert augmentation of PDI reductase activity exhibit dissimilar structures and it is thus likely that they act through different mechanisms. It will be of interest to broaden the screening for PDI activity-potentiating molecules in order to identify highly potent and possibly synergistic drugs favouring correct folding and disulphide bridges formation in proteins.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Goldberger RF, Epstein CJ, Anfinsen CB. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J Biol Chem* 1963;238:628–635.
- Sevier CS, Kaiser CA. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:836–847.
- Hatahet F, Ruddock LW. Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *Febs J* 2007;274:5223–5234.
- Primm TP, Gilbert HF. Hormone binding by protein disulfide isomerase, a high capacity hormone reservoir of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2001;276:281–286.
- Klett D, Cahoreau C, Villeret M, Combarrous Y. Effect of pharmaceutical potential endocrine disruptor compounds on protein disulfide isomerase reductase activity using di-eosin-oxidized-glutathione. *PLoS one* 2010;5:e9507.
- Raturi A, Mutus B. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Radic Biol Med* 2007;43:62–70.
- Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci* 2006;31:455–464.
- Chen Y, Zhang Y, Yin Y, Gao G, Li S, Jiang Y et al. SPD—a web-based secreted protein database. *Nucleic Acids Res* 2005;33:D169–D173.
- Abell BA, Brown DT. Sindbis virus membrane fusion is mediated by reduction of glycoprotein disulfide bridges at the cell surface. *J Virol* 1993;67:5496–5501.
- Gilbert HF, Kruzel ML, Lyles MM, Harper JW. Expression and purification of recombinant rat protein disulfide isomerase from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 1991;2:194–198.
- Tsibris JC, Hunt LT, Ballejo G, Barker WC, Toney LJ, Spellacy WN. Selective inhibition of protein disulfide isomerase by estrogens. *J Biol Chem* 1989;264:13967–13970.
- Hiroi T, Okada K, Imaoka S, Osada M, Funae Y. Bisphenol A binds to protein disulfide isomerase and inhibits its enzymatic and hormone-binding activities. *Endocrinology* 2006;147:2773–2780.
- Hashimoto S, Okada K, Imaoka S. Interaction between bisphenol derivatives and protein disulphide isomerase (PDI) and inhibition of PDI functions: requirement of chemical structure for binding to PDI. *J Biochem* 2008;144:335–342.

14. Ashby J, Odum J. Gene expression changes in the immature rat uterus: effects of uterotrophic and sub-uterotrophic doses of bisphenol A. *Toxicol Sci* 2004;82:458-467.
15. Schmidt S, Degen GH, Seibel J, Hertrampf T, Vollmer G, Diel P. Hormonal activity of combinations of genistein, bisphenol A and 17beta-estradiol in the female Wistar rat. *Arch Toxicol* 2006;80:839-845.
16. Takagi H, Shibutani M, Masutomi N, Uneyama C, Takahashi N, Mitsumori K et al. Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. *Arch Toxicol* 2004;78:97-105.
17. Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T et al. Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 2001;35:2917-2925.
18. Stoker C, Rey F, Rodriguez H, Ramos JG, Sirosky P, Larriera A et al. Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol* 2003;133:287-296.
19. Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Imatanaka N, Takatsuki M. Subacute oral toxicity study of ethynylestradiol and bisphenol A, based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no.407". *Arch Toxicol* 2002;76:65-74.
20. Trudeau VL, Turque N, Le Mével S, Alliot C, Gallant N, Coen L et al. Assessment of estrogenic endocrine-disrupting chemical actions in the brain using *in vivo* somatic gene transfer. *Environ Health Perspect* 2005;113:329-334.
21. Ceccarelli I, Della Seta D, Fiorenzani P, Farabollini F, Aloisi AM. Estrogenic chemicals at puberty change ER α in the hypothalamus of male and female rats. *Neurotoxicol Teratol* 2007;29:108-115.
22. Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol* 2002;193:154-163.
23. Schultz-Norton JR, McDonald WH, Yates JR, Nardulli AM. Protein disulfide isomerase serves as a molecular chaperone to maintain estrogen receptor α structure and function. *Mol Endocrinol* 2006;20:1982-1995.
24. Roth RA. Bacitracin: an inhibitor of the insulin degrading activity of glutathione-insulin transhydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;98:431-438.
25. Mandel R, Ryser HJ, Ghani F, Wu M, Peak D. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4112-4116.
26. Stone KJ, Strominger JL. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:3223-3227.
27. Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:764-774.
28. Pérez V, Puiigdemont D, Gilaberte I, Alvarez E, Artigas F. Augmentation of fluoxetine's antidepressant action by pindolol: analysis of clinical, pharmacokinetic, and methodologic factors. *J Clin Psychopharmacol* 2001;21:36-45.
29. Jang DP, Lee SH, Park CW, Lee SY, Kim YB, Cho ZH. Effects of fluoxetine on the rat brain in the forced swimming test: a [¹⁸F]-FDG micro-PET imaging study. *Neurosci Lett* 2009;451:60-64.
30. Lister A, Regan C, Van Zwol J, Van Der Kraak G. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. *Aquat Toxicol* 2009;95:320-329.
31. Lee CS, Kim YJ, Jang ER, Kim W, Myung SC. Fluoxetine induces apoptosis in ovarian carcinoma cell line OVCAR-3 through reactive oxygen species-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;106:446-453.
32. Lee LJ. Neonatal fluoxetine exposure affects the neuronal structure in the somatosensory cortex and somatosensory-related behaviors in adolescent rats. *Neurotox Res* 2009;15:212-223.
33. Lim CM, Kim SW, Park JY, Kim C, Yoon SH, Lee JK. Fluoxetine affords robust neuroprotection in the postischemic brain via its anti-inflammatory effect. *J Neurosci Res* 2009;87:1037-1045.
34. Yang Z, Liu XJ, Chen C, Halling PJ, Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:821-828.
35. Yang Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *J Biotechnol* 2009;144:12-22.
36. Dumetz AC, Lewus RA, Lenhoff AM, Kaler EW. Effects of ammonium sulfate and sodium chloride concentration on PEG/protein liquid-liquid phase separation. *Langmuir* 2008;24:10345-10351.
37. Hiraga K, Ueno Y, Oda K. Glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: activation by ammonium sulfate. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72:1299-1306.
38. Rao RU, Mehta K. Transglutaminases, thioredoxins and protein disulfide isomerase: diverse enzymes with a common goal of cross-linking proteins in lower organisms. *Indian J Exp Biol* 2004;42:235-243.
39. Kim HT, Russell RL, Raina AK, Harris PL, Siedlak SL, Zhu X et al. Protein disulfide isomerase in Alzheimer disease. *Antioxid Redox Signal* 2000;2:485-489.
40. Dinoto L, Deture MA, Purich DL. Structural insights into Alzheimer filament assembly pathways based on site-directed mutagenesis and S-glutathionylation of three-repeat neuronal Tau protein. *Microsc Res Tech* 2005;67:156-163.
41. Tian F, Zhou X, Wikström J, Karlsson H, Sjöland H, Gan LM et al. Protein disulfide isomerase increases in myocardial endothelial cells in mice exposed to chronic hypoxia: a stimulatory role in angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H1078-H1086.
42. Descamps E, Petraut-Laprais M, Maurois P, Pages N, Bac P, Bordet R et al. Experimental stroke protection induced by 4-hydroxybenzyl alcohol is cancelled by bacitracin. *Neurosci Res* 2009;64:137-142.

Article 3 - Identification and cloning of bovine Glycoprotein Hormone β and α subunits-related molecules: GPB5 and GPA2 (In preparation)

Dans ce présent article, nous décrivons en premier, l'isolement et le clonage des ADNc de GPA2 et de GPB5 bovines à partir de l'hypophyse et du testicule respectivement. L'isolement des gènes fait intervenir plusieurs étapes telles que l'extraction des ARNm, la synthèse d'un ADN complémentaire, l'obtention d'une grande quantité d'ADNc par PCR (Polymerase chain reaction) en utilisant des amorces spécifiques et le clonage du gène dans un vecteur tel que le pGEM-T-Easy. Ce dernier est introduit dans des bactéries. Les bactéries ainsi transformées sont sélectionnées par la résistance à un antibiotique conférée par le plasmide. Puisqu'on a obtenu l'ADNc de la GPB5 en premier et puisque la molécule s'avère être plus immunogène, on a fait faire des anticorps géniques chez la souris. On possédait aussi des anticorps anti-peptides qui sont fait chez la poule. On a essayé de chercher les protéines naturelles à partir des extraits testiculaires bovins mais aucun des anticorps n'a marché...(voir l'article 4)

Dans la deuxième partie, nous décrivons le sous-clonage des fragments d'ADNc déjà isolé dans vecteurs d'expression. Dans ce but, nous extrayons l'ADNc de son plasmide d'origine (le pGEM-T-Easy), puis nous modifions les séquences bordant ce gène par PCR. Ceci nous permet de créer des sites de restriction enzymatique qui seront nécessaires à extraire de nouveau l'ADNc modifié pour être enfin sous-cloné dans des plasmides d'expression p119 ou p119-His.

(Pour plus de détails, voir matériels et méthodes).

Identification and cloning bovine Glycoprotein Hormone β - and α subunits-related molecules: GPB5 & GPA2

Maya HAJ HASSAN*, Eva ALVAREZ*, Danièle KLETT, Yves COMBARNOUS and Claire CAHOREAU[#]

* co-authors

[#] correspondant author

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unit « Physiologie de la Reproduction et des Comportements », 37380 Nouzilly (France)

Abstract

GPB5 and GPA2 are the paralogs of the glycoprotein hormone (GPH) β and α subunits that are expressed in all vertebrate and most invertebrate species, in contrast to the GPHs α - and β -subunits that are expressed only in vertebrates. Their biological role(s) and quaternary structure are still a matter of debate. In the present report we studied the mRNA expression profile of GPA2 and GPB5 in different bovine tissues and described the identification and the cloning of bovine *gphb5* and *gpha2* from testis and pituitary gland respectively. We also constructed expression vectors with and without a His-Tag in order to be used to produce recombinant proteins in baculovirus-insect cells Sf9.

1. Introduction

The glycoprotein hormones (GPHs), Luteinizing Hormone (LH), Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Thyroid Stimulating Hormone (TSH) and Choriogonadotropins (CGs) are found only in vertebrates and consist of non-covalently associated α - and β -subunits (Pierce and Parsons, 1981, Combarnous, 1992, Puett, 1986). The α -subunits are common to all GPHs and are encoded by a unique gene in each species. By contrast, the β -subunits (LH β , FSH β , TSH β and CG β) are encoded by distinct genes and determine the functional specificity of each $\alpha\beta$ heterodimer.

Two genes, *gpa2* and *gpb5*, related to the GPH α - and β -subunit genes respectively, have recently been evidenced in human (Nakabayashi et al., 2002) and mouse and subsequently in most metazoans, in contrast to the GPH subunit genes which are only present in vertebrates. Indeed *gpha2* and *gphb5* genes were found in almost all available invertebrate genomes studied so far (Sudo et al., 2005, Hsu et al., 2002, Dos Santos et al., 2009b) except

hymenopteras (Hauser et al., 2010). The two novel molecules share the conserved cysteine residue arrangement found in α (GPA1) and β -subunits respectively (Alvarez et al., 2009, Avsian-Kretchmer and Hsueh, 2004), and were named GPA2 and GPB5 based on the chronological order of discovery. GPB5 and β subunits retain the structural characteristics of the common ancestor of β subunit family proteins and could represent the ancient form of glycoprotein hormone β subunit family genes.

2. Materials and methods

RNA extraction and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA Was extracted from bovine testis using RNA isolation kit (Macherey, Nagel) as described in the manufacturer's suggested protocol. Buffers were supplied in the corresponding kit. For RT-PCR, 1 μ g RNA, 1 μ L oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/mL) and 0.5 mM dNTP (each) were heated at 65°C for 5 min, cooled rapidly, and then added to 20 units RNaseOUT Recombinant Ribonuclease inhibitor (Invitrogen) , 10 mM DTT (Invitrogen) and 4 μ L of a 5X first strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂). Mixture was incubated at 37°C for 2 min, before adding 200 units moloney murine leukaemia virus reverse transcription (M-MLV RT) (Invitrogen), and incubated for additional 50 min. M-MLV RT was inactivated at 70°C for 15 min. The generated cDNA was amplified by PCR otherwise stored at -20°C.

cDNA amplification by PCR with specific primers

The amino acid sequences deduced from putative gpa2 and gpb5 bovine nucleotide sequences were used to design specific probes that were purchased from Eurogentec. The reaction mixture for PCR contained 200 ng of cDNA as template, 0,2 mM dNTPs (each), 2mM MgSO₄, 0,6 mM primers (each), 1 unit/25 μ L of Platinum taq polymerase (Interchim) in appropriate buffer. The PCR program was as follow: initial denaturation at 94°C for 2 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 10 s, annealing at 58°C for 30 s, and elongation at 68°C for 1 min, and at the end further elongation at 68°C for 7 min and cooling at 4°C till used.

Cloning Procedure

The PCR products were directly melting-agarose gel-extracted and ligated to pGEM-T-easy (Promega) according to the manufacturer's protocol. The ligation mixture was transformed into *E.coli* DH5 α competent cells. Ampicillin (100 μ g/mL) resistant clones were obtained. Colonies from positive clones were picked up and grown and plasmids DNA were isolated

using miniprep kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. Plasmids DNA were tested for the correct insert by restriction digestion, and then were verified by sequencing. The verified plasmids DNA were used as a template with corresponding primers to create enzymatic restriction sites BglIII, HindIII, BamHI with the same PCR program indicated above. The PCR product was cloned again into pGEM-T-Easy vector.

Tableau 1. Sequences of primers used for RT-PCR cloning of GPA2 and GPB5 cDNA.

Primers	Sequence	Used for
gpa2	F 5' GCCCATGGCGTCCCCCAAAC 3' R 5' CTAGTAGCGGAGAGGCGACAC 3'	Amplifying the complete sequence
gpb5	F 5' GCTGGTGTACCTTTTTTCTTGGC 3' R 5' CAGATGGTCTCACACTCCGTG 3'	
BamHI-gpa2-HindIII	F 5' GCGGGATCCGAATGCCCATG 3' R 5' GCGAATTCACTAAGCTTCTAGTAG3'	Creating enzyme restriction sites to insert cDNA in p119 vector
BglII- gpb5- HindIII	F 5' GCGAAAGATCTAGATGAGGCTGGTGTAC3' R 5' GCGGGAATTAGCTTGATGGTCTCACAC3'	
BamHI-gpa2-HindIII-Stop	F 5' GCGGGATCCGAATGCCCATG 3' R 3' GAATTCACTAGTAGAAGCTTGTAGC 3'	Creating enzyme restriction sites to insert cDNA in p119-His vector
BglII- gpb5- Hind III-Stop	F 5' GCGAAAGATCTAGATGAGGCTGGTGTAC3 R 5' GCGGGAAGCTTCAGATGGTCTCACAC 3'	

Subcloning of the modified cDNA in order to construct expression vectors

Plasmids with added enzyme restriction sites were digested with both BglII and HindIII and ligated into p119 or p119-His vector that had previously been digested with both same enzymes. The ligation product was then transformed into DH5 α -competent cells. The obtained plasmids were tested for the correct insert by restriction digestion.

Electrophoresis and Western Blot

Proteins were separated by SDS-PAGE in reducing and non-reducing conditions on 15% polyacrylamide gels and were electroblotted onto nitrocellulose membranes at 150 V for 80 minutes at room temperature using a Tris-Glycine-Ethanol buffer. Transfer was confirmed by reversible staining with Ponceau S. Blots were blocked with 1X TBS, 0.05% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) milk for 30 minutes, and probed with the anti-GPB5Bt antibody (1:10 000) for 24 hours at 4°C, then washed thrice in 1X TBS, 0.05%, Tween 20 for 10 seconds each followed by three 10 minute washes. Blots were incubated with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:100 000) for 1 hour and again washed thrice in 1X TBS, 0.05% (v/v) Tween 20 for 10 seconds each followed by three 10 minutes washes. Detection of bound antibody was achieved by enhanced chemiluminescence (ECL Amersham).

Hybridation in situ

The RNA probe is synthesized in vitro in the presence of digoxigenin-substituted nucleotide, dig-UTP using the linearized full cloned cDNA as DNA template (Roche, Cat.No.11277073910).

3. Results

Isolation of bovine GPA2 and GPB5 cDNA

Based on the amino acid sequences of human GPA2 (Accession NP_570125) and GPB5 (Accession AAM53261), homologous sequences were found in Genbank of the bovine GPA2 (Accession XM_002699336/ XP_002699382) and GPB5 (Accession no. XM_002691028/ XP_002691074) using the Blast search program.

The bovine *gpb5* gene is located on chromosome 10, and is composed of two exons (204 bp, 189 bp) separated by a large intron that spans over 3423 base pairs. It encodes a predicted protein of 130 amino acids including a signal peptide of 20 amino acids and a theoretical molecular weight of 14,24 KDa with one potential conserved N-glycosylation site (Fig.1). while bovine *gpa2* is located on chromosome 29, and it is made of 3 exons (103 bp, 185 bp, 102 bp) intersected by 2 introns of 160 bp and 111 bp and encoded a predicted protein of 129 amino acids with a theoretical molecular weight of 13,97 KDa with two potential N-glycosylation sites (Fig.1).

To confirm the predicted sequences of bovine GPA2 and GPB5, RT-PCR technique was carried with the help of specific primers that flank the Start and the Stop codons from template derived from adult bovine RNA extracted from testis. Full-length clones were isolated from bovine testis. DNA sequence analysis revealed that they contain a continuous opening reading frame and it is made of 393 bp for *gpb5* and 390 for *gpa2*. As PCR cannot discriminate between cDNA targets synthesized by reverse transcription and genomic DNA contamination, extracted genomic DNA was used in PCR to control genomic contamination. (Fig.2).

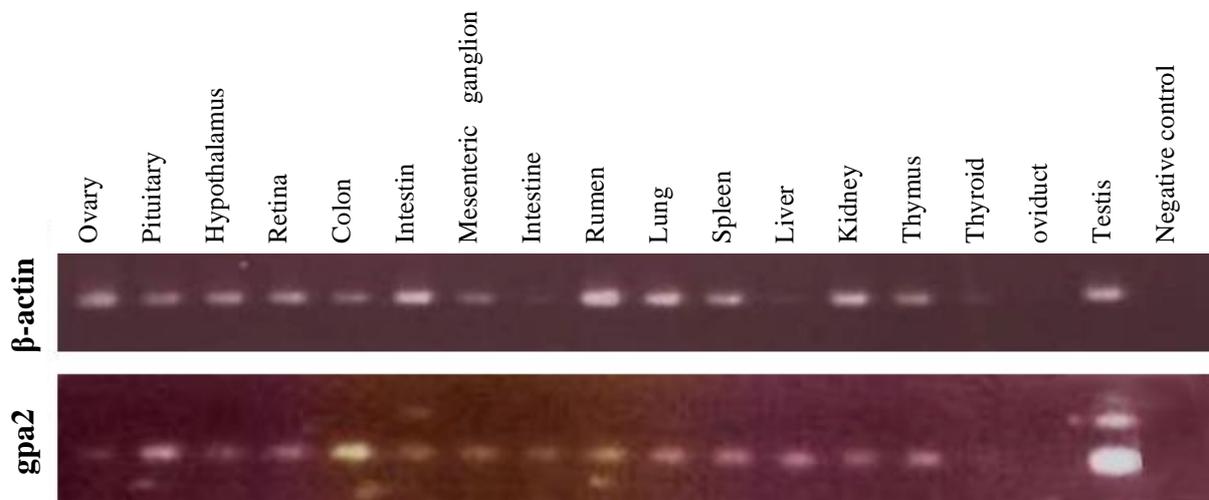


Figure 3. Distribution of gpa2 in bovine tissues.

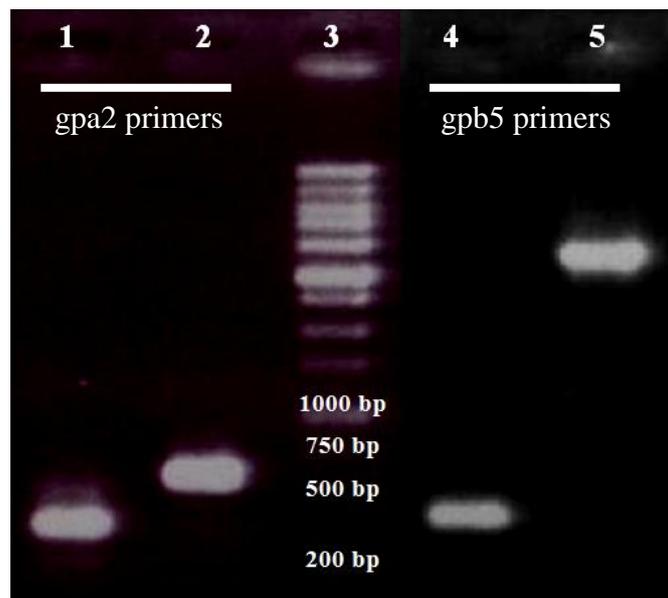


Figure 2. Amplification of bovine GPB5 and GPA2 cDNA by PCR. Bovine testis total RNA was isolated according to the kit protocol. RT-PCR reactions were performed using MMLV and 1 μ g RNA. PCR reactions were performed with specific primers. 10 μ L of each reaction was electrophoresed on a 1.5% agarose gel and stained just before visualization by UV with EtBr

Lane 1 GPA2 cDNA (390 bp)

Lane 2 Genomic DNA used as control (661 bp = 390 (exons) + 271 (introns))

Lane 3 DNA ladder

Lane 4 GPB5 cDNA (395 bp)

Lane 5 Genomic DNA used as control (3816 bp = 393 (exons) + 3423 (intron))

Construction of enzyme restriction sites to facilitate ligation of cDNA to similarly cut expression vectors

Recombinant DNA can easily be formed when DNA is cut with the same enzyme combination that cut the vector. As the expression vectors used in this study contains BglII and HindIII as single restriction sites, we studied the possibility to create the same restriction sites on gpa2 and gpb5 cloned cDNA. The sequence of gpb5 does not contain BglII neither HindIII restriction sites but gpa2 contains a single site for BglII. So for gpa2 cDNA, we had to create a BamHI restriction site that produces compatible sticky ends with BglII. BamHI and BglII generate different but compatible ends. These restriction sites BglII/BamHI and HindIII, were designed in the structure of primers, and they flank gpa2 and gpb5 cDNA from the Start codon till the Stop codon as shown example in figure 4 (Fig.4).The same technique was used to create corresponding enzyme restriction sites to obtain cDNA suitable to be inserted in tagged expression vectors (See Table 1. for primers).

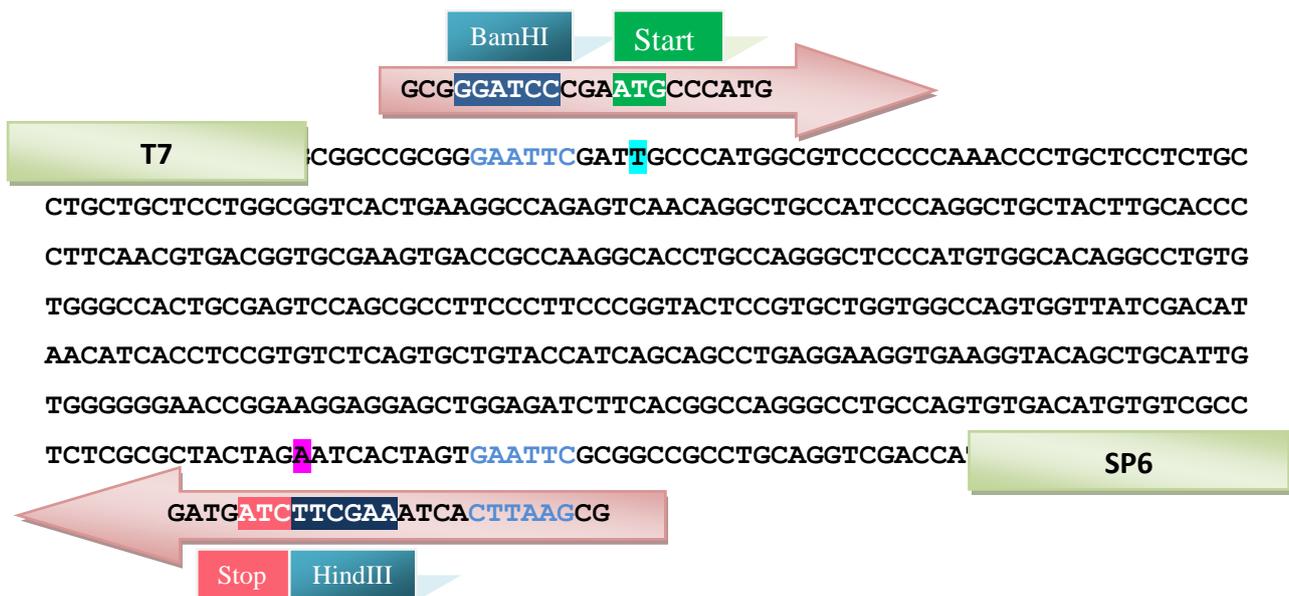


Figure 4. Enzymes restriction sites included in primers structure. T7 and SP6 are the RNA polymerase promoters of the pGEM-T-Easy vector, they are flanking a multiple cloning site (MCS) that contains multiple restriction sites that release the insert by simple digestion with a single restriction enzymes as EcoRI (GAATTC shown in blue). Constructions of enzyme restriction sites will facilitate ligation of cloned gpa2 cDNA to similarly cut p119 expression vector.

Western Blot and antibodies

As we found that mRNA of GPA2 and GPB5 were expressed both in testis, we decided to look in this tissue for natural proteins. It was precipitated by ammonium sulfate to fractionate proteins. Fractions were dialyzed, lyophilized and then an aliquot of each fraction was diluted in Laemmli's 4 X buffer under non-reducing and reducing conditions. Samples were heated or not for 10 min at 100 °C and electrophoresed in 15% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. The membranes were tested with two different kinds of antibodies: the first was a chicken anti-peptide anti-GPB5 (Interchim) and the second one was a mouse anti-GPB5 genomic antibody made with our gpb5 cDNA sequence (Interchim). Unfortunately no specific staining was obtained with the antibodies.

Hybridation in situ

To locate which cells express gpa2 or and gpb5, we checked the expression of mRNA in bovine testis using RNA probes. No staining was observed.

4- Discussion

When seeking the genome databases, GPA2 and GPB5 were found in almost all invertebrates and vertebrates. This evolutionary analysis indicates that GPA2 and GPB5 are the ancestors of the gonadal and thyroid glycoprotein hormones. They may have appeared in the early Cambrian period. GPA2 and GPB5 as alpha and beta subunits of glycoprotein hormones, belong to the cystine-knot superfamily, a family that also contains other members like transforming growth factors TGF , Bone morphogenetic proteins BMP and their antagonists, inhibins, Mullerian inhibiting substance, platelet derived growth factors PDGFs, the Norrie disease gene product NDP as well as the von Willebrand factor vWf...

As the common alpha subunits forms noncovalent heterodimers with the various beta subunits, GPA2 and GPB5 were proposed to act as a heterodimer that was called thyrostimulin (Nakabayashi et al., 2002) . Because GPA2 and GPB5 co-localise in the rat and human anterior pituitary and rat's ovaries where the TSH receptor is known to be expressed, a paracrine role of thyrostimulin was suggested(Aghajanova et al., 2009, Nakabayashi et al.,

2002, Prummel et al., 2000). However, the putative biological role for the heterodimer *in vivo* is still a matter of debate.

In fact, neither the structure of GPA2 and GPB5 (Alvarez et al., 2009) nor their tissue distribution and their expression levels (Dos Santos et al., 2009a, Okajima et al., 2008, Sudo et al., 2005) support the proposition of forming an heterodimer.

In order to study the possibility or not of obtaining a stable heterodimer as it is the case in the $\alpha\beta$ heterodimer, we started by isolating and cloning of GPA2 and GPB5 cDNA from bovine testis. Using specific primers that flank the start and the stop codons let us obtain cDNA for the entire gene. The analysis of this cDNA shows one conserved potential N-linked glycosylation site (N-X-T/S) in *gpb5* and two sites in *gpa2*. The sequence analysis of these clones showed that their cDNA sequences were found to be identical to the ones previously reported (XM_002699336 and XM_002691028).

We shown by RT-PCR that *gpa2* was expressed in a large tissue number whereas *gpb5* was restricted to tissue. We should mention that other PCR amplification (Nested-PCR) could be interesting to explore in order to see if we could detect *gpb5* in other tissues. This kind of expression was not new, the mRNA levels of GPA2 was 200 times higher than those of GPB5 in both human and rat tissues (Nagasaki et al., 2006).

PCR analyses may not detect a mRNA if it is expressed in a few selective cells, so we performed *in situ* hybridization (ISH) studies on adult bovine testis. We were unable to detect neither GPA2 nor GPB5 mRNA. These experiments are to renew in making new probes (only one pair of primer was tested for each product) and trying different incubation conditions.

As we found by PCR that the testis was the organ that expressed mRNA of GPA2 and GPB5, we looked for the natural proteins by using two different antibodies anti-GPB5. Unfortunately, the only staining we got was not specific as we determined by mass spectrometry the identity of the protein.

Later, we construct appropriate plasmids for expression in baculovirus-insect cell system. Therefore, we generated two recombinant baculoviruses encoding bovine GPA2 and GPB5, respectively, in an attempt to co-express both proteins in insect cells (Data not published).

Further studies will have to address the physiological roles of these proteins and their interaction with each other if possible.

Acknowledgements

We thank Svetlana Usbekova for providing us with the first bovin testis cDNA and genomic DNA and Bruno Quérat for different discussion and the INRA and the Région Center Council for a joint PhD grant to MHH.

References

- AGHAJANOVA, L., LINDEBERG, M., CARLSSON, I. B., STAVREUS-EVERS, A., ZHANG, P., SCOTT, J. E., HOVATTA, O. & SKJOLDEBRAND-SPARRE, L. (2009) Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, 18, 337-47.
- ALVAREZ, E., CAHOREAU, C. & COMBARNOUS, Y. (2009) Comparative structure analyses of cystine knot-containing molecules with eight aminoacyl ring including glycoprotein hormones (GPH) alpha and beta subunits and GPH-related A2 (GPA2) and B5 (GPB5) molecules. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 90.
- AVSIAN-KRETCHMER, O. & HSUEH, A. J. (2004) Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol*, 18, 1-12.
- COMBARNOUS, Y. (1992) Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr Rev*, 13, 670-91.
- DOS SANTOS, S., BARDET, C., BERTRAND, S., ESCRIVA, H., HABERT, D. & QUÉRAT, B. (2009a) Distinct expression patterns of glycoprotein hormone-alpha2 and -beta5 in a basal chordate suggest independent developmental functions. *Endocrinology*, 150, 3815-22.
- DOS SANTOS, S., BARDET, C., BERTRAND, S., ESCRIVA, H., HABERT, D. & QUÉRAT, B. (2009b) Distinct expression patterns of glycoprotein hormone-alpha2 and -beta5 in a basal chordate suggest independent developmental functions. *Endocrinology*, 150, 3815-22.
- HAUSER, F., NEUPERT, S., WILLIAMSON, M., PREDEL, R., TANAKA, Y. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. (2010) Genomics and peptidomics of neuropeptides and protein hormones present in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *J Proteome Res*, 9, 5296-310.
- HSU, S. Y., NAKABAYASHI, K. & BHALLA, A. (2002) Evolution of glycoprotein hormone subunit genes in bilateral metazoa: identification of two novel human glycoprotein hormone subunit family genes, GPA2 and GPB5. *Mol Endocrinol*, 16, 1538-51.
- NAGASAKI, H., WANG, Z., JACKSON, V. R., LIN, S., NOTHACKER, H. P. & CIVELLI, O. (2006) Differential expression of the thyrostimulin subunits, glycoprotein alpha2 and beta5 in the rat pituitary. *J Mol Endocrinol*, 37, 39-50.
- NAKABAYASHI, K., MATSUMI, H., BHALLA, A., BAE, J., MOSSELMAN, S., HSU, S. Y. & HSUEH, A. J. (2002) Thyrostimulin, a heterodimer of two new human

- glycoprotein hormone subunits, activates the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Clin Invest*, 109, 1445-52.
- OKAJIMA, Y., NAGASAKI, H., SUZUKI, C., SUGA, H., OZAKI, N., ARIMA, H., HAMADA, Y., CIVELLI, O. & OISO, Y. (2008) Biochemical roles of the oligosaccharide chains in thyrostimulin, a heterodimeric hormone of glycoprotein hormone subunits alpha 2 (GPA2) and beta 5 (GPB5). *Regul Pept*, 148, 62-7.
- PIERCE, J. G. & PARSONS, T. F. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 50, 465-95.
- PRUMMEL, M. F., BROKKEN, L. J., MEDURI, G., MISRAHI, M., BAKKER, O. & WIERSINGA, W. M. (2000) Expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in the folliculo-stellate cells of the human anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 4347-53.
- PUETT, D. (1986) Human choriogonadotropin. *Bioessays*, 4, 70-5.
- SUDO, S., KUWABARA, Y., PARK, J. I., HSU, S. Y. & HSUEH, A. J. (2005) Heterodimeric fly glycoprotein hormone-alpha2 (GPA2) and glycoprotein hormone-beta5 (GPB5) activate fly leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-1 (DLGR1) and stimulation of human thyrotropin receptors by chimeric fly GPA2 and human GPB5. *Endocrinology*, 146, 3596-604.

Article 4 - Straightforward isolation of phosphatidyl-ethanolamine-binding protein-1 (PEBP-1) and ubiquitin from bovine testis by hydrophobic-interaction chromatography (HIC) (Published)

En cherchant la GPB5 bovine dans les différentes fractions testiculaires obtenues par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium avec l'anticorps anti-peptide anti-GPB5, on a obtenu un signal de 22 KDa à peu près dans la fraction S80. La détermination de l'identité de cette protéine a été réalisée par spectrométrie de masse. La protéine est identifiée comme la phosphatidyl-ethanolamine-binding protein (PEBP) et non la GPB5. Cette protéine s'est révélé très intéressante vu les rôles qu'elle joue au niveau physiologiques (Reproduction, cancer, diabète...) et au niveau moléculaires (inhibe les voies de signalisations MAPK et NFκB...). Comme on n'avait pas d'autres outils pour chercher la GPB5 naturelle et qu'en parallèle on avait beaucoup de problèmes dans l'expression de la GPB5 recombinante, on a décidé de travailler un peu plus sur cette PEBP.

Ainsi dans cet article, on a développé une technique de purification rapide de la PEBP dans des conditions originales ; la fraction soluble S80 (3,2 M en sulfate d'ammonium) dans laquelle on a détecté la PEBP, a été chargée directement sur une colonne de phenylsépharose équilibré avec la même concentration de sulfate d'ammonium. Ensuite, les protéines sont éluées en diminuant la concentration des sels (1, 0.5 et 0.2 et 0 M sulfate d'ammonium dans de l'hydrogénocarbonate d'ammonium) et en augmentant la concentration d'un solvant moins polaire que l'eau (50% Ethylène Glycol). On a pu ainsi purifier la PEBP testiculaire bovine avec une autre protéine l'ubiquitine, on a aussi comparé la PEBP purifiée avec la PEBP recombinante faite chez *E.coli*.



Straightforward isolation of phosphatidyl-ethanolamine-binding protein-1 (PEBP-1) and ubiquitin from bovine testis by hydrophobic-interaction chromatography (HIC)

Maya Haj Hassan, Danièle Klett, Claire Cahoreau, Yves Combarrous*

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), «Physiologie de la Reproduction et des Comportements» Unit, 37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 June 2011
Accepted 21 August 2011
Available online 26 August 2011

Keywords:

Phosphatidyl-ethanolamine-binding protein
Hydrophobic interaction chromatography
Raf-1 kinase inhibitory protein
Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein
Isoform

ABSTRACT

Isolation of phosphatidyl-ethanolamine-binding protein-1 (PEBP-1) from bovine brain was described almost three decades ago but it required a large number of steps to reach high purity. After the fractionation of bovine testis proteins by ammonium sulfate precipitation we found that PEBP-1, detected by Western blotting, was among the very few proteins still soluble at 80% ammonium sulfate saturation (3.2 M). This soluble fraction (S80) was directly loaded onto a phenyl sepharose column equilibrated at the same ammonium sulfate concentration (3.2 M). A stepwise elution of the retained material at 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 M ammonium sulfate in ammonium hydrogen carbonate was performed and then with ammonium hydrogen carbonate alone and finally with 50% ethylene glycol. All fractions were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting and the fractions containing PEBP-1 was further fractionated by size exclusion chromatography on a HR75 Superdex column permitting the isolation of ubiquitin in addition to PEBP-1 as demonstrated by Western blotting and mass spectrometry. This study shows the feasibility of hydrophobic interaction chromatography (HIC) on phenyl sepharose at a very high ammonium sulfate concentration (3.2 M; 80% saturation) to efficiently purify the proteins that are still soluble in these extreme conditions.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The PEBP (phosphatidyl-ethanolamine-binding protein) family is a highly conserved group of proteins that have been identified in numerous tissues in most organisms, including bacteria, yeasts, plants, invertebrates and vertebrates. Phosphatidyl-ethanolamine-binding protein-1 (PEBP-1) is a multifunctional 21–23 kDa protein that was initially described as a cytoplasmic protein [1] but was later found associated with plasma and endoplasmic reticulum membranes in numerous organs [2] and it was also found to be secreted [3] despite its lack of a signal sequence. PEBP-1 is known under various other names corresponding to its different biological activities recognized so far in the animal kingdom: Raf-1 kinase inhibitory protein (RKIP) [4], decapacitation factor-receptor (DF-R) [5], hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein (HCNPPP) [3,6] or serine-protease inhibitor (SPI) [7]. In addition, PEBP has been shown to regulate cell migration [8–10], to be an inhibitor of non-apoptotic programmed cell death [11] and to act as a tumor suppressor. Indeed, its expression is

down-regulated in tumor interstitial fluid from breast cancer patients [12] and it negatively regulates both the MAPK and NFκB pathways that are found hyperactivated in melanomas [13]. Concerning the central nervous system, PEBP-1 has been found down-regulated in the Alzheimer disease model mouse line Tg2576 [14] but, in contrast, it is up-regulated in rat hippocampal progenitor cells which are important for memory formation [15] as well as in the brain of atlantic cod exposed to methylmercury [16].

The isolation of PEBP-1 in a highly purified state was described almost three decades ago but it required a large number of steps [1]. In the present paper, we report a straightforward method allowing the isolation of PEBP-1 by taking advantage of its high solubility in 80% saturation ammonium sulfate and the development of hydrophobic interaction chromatography on a phenyl-sepharose column equilibrated at this very high ammonium sulfate concentration. Preliminary characterization of PEBP-1 purified by this method is presented.

2. Materials and methods

Bovine testes were obtained at a local slaughterhouse immediately after sacrifice of the animals (3–6 months of age). Chemicals were of the highest grade available and were obtained from Sigma

* Corresponding author. Tel.: +33 2 47 42 76 50; fax: +33 2 47 42 77 43.
E-mail address: combarno@tours.inra.fr (Y. Combarrous).

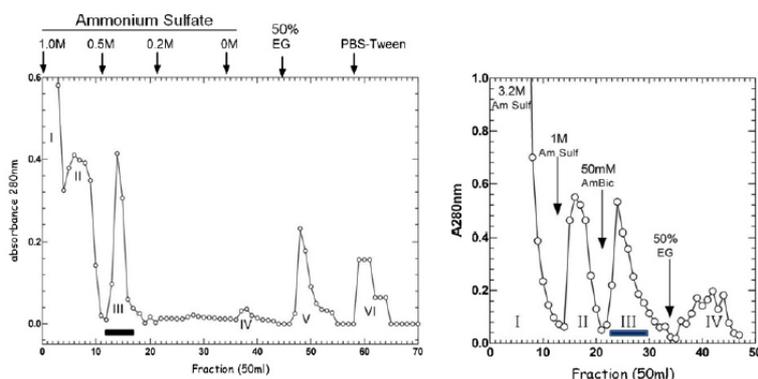


Fig. 1. Hydrophobic Interaction Chromatography of the soluble fraction after 80% ammonium sulfate saturation precipitation of the proteins extracted from bovine testes. The column was equilibrated in 3.2 M ammonium sulfate (~80% saturation) before loading of the S80 fraction (soluble fraction after 80% ammonium sulfate saturation precipitation). After total loading, the column was first eluted with 1 M ammonium sulfate. It was then eluted with 0.5 M and 0.2 M ammonium sulfate then with 0.05 M ammonium hydrogen carbonate, 50% (v/v) ethylene glycol in 0.05 M ammonium hydrogen carbonate and finally with Tween in PBS (left) or it was directly eluted with 0.05 M ammonium hydrogen carbonate and finally with 50% (v/v) ethylene glycol in 0.05 M ammonium hydrogen carbonate (right).

(St-Quentin-Fallavier, France) unless otherwise stated. Phenyl-sepharose gel as well as Sephadex G25 and Superdex HR75 columns were from GE Healthcare France. Dialysis membrane (cut off 12–14000) was from Medicell Intl Ltd (London, UK).

The phenyl-sepharose column (5 cm × 12 cm) was equilibrated in 3.2 M ammonium sulfate before use and elution steps were performed at 3.2, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 and 0 M in 50 mM ammonium hydrogen carbonate followed by washing with 50% ethylene glycol. In an alternative protocol, elution steps were performed at 3.2, 1.0, and then directly 0 M in 50 mM ammonium hydrogen carbonate.

Small-scale preparative HPLC was performed on a Superdex 75 column using a GE Healthcare Ettan apparatus at a flow rate of 200 μ l/min using 50 mM ammonium hydrogen carbonate for elution. The fractions were recovered, freeze-dried and subsequently analyzed.

Mass spectrometric identification of the protein was performed by Ms Lucie Spina at the MassSpec laboratory (PAIB) in our Institute using an ESI-TRAP linear ion-trap spectrometer (Thermo Electron Co, Waltham, Mass, USA) and the Mascot identification program [17]. Mass determination of purified materials was carried out by MALDI-TOF.

Recombinant bovine PEBP expressed in *E. coli* [18,19] was kindly provided by Dr. Françoise Schoentgen (CNRS, IMPMC, Paris, France). The anti-PEBP IgYs were obtained from chicken eggs and purified by affinity chromatography (Interchim, Montluçon, France) whereas rabbit anti-ubiquitin polyclonal antibodies were previously characterized [20].

For SDS-PAGE and Western blot analyses, an aliquot of each fraction was diluted in Laemmli's 4 \times buffer under nonreducing or reducing conditions [21]. Samples were heated or not for 10 min at 100 °C and electrophoresed in 15% SDS-PAGE. Gels were either silver or coomassie blue stained or transferred overnight at 4 °C onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Ecquevilly, France). The membranes were probed with the anti-PEBP antibody (1:2500, 4 h at room temperature), then one hour at room temperature with 1:100,000 donkey peroxidase-conjugated anti-chicken antibodies (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA, USA). Membranes were visualized using the ECLTM Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences Orsay, France) after a 15-min exposure.

Hydroxylamine treatment (1 M pH 7.0 at 30 °C for 16 h) was used to specifically hydrolyze putative thioester linkage between cysteine residue and palmitic acid chain [22,23].

3. Results

3.1. Purification

The testes were rapidly brought back to the laboratory in melting ice and after elimination of the albuginae were cut into small dices. This material was then extracted in 1 l of 0.15 M ammonium sulfate per kg tissue by vigorous grinding using an Ultra-Turax (Janke & Kunkel, Staufen, Germany) at full speed at 4 °C. After centrifugation (5000 \times g, 30 min), the supernatant was adjusted to 1 M ammonium sulfate (approximately 25% saturation at 4 °C) by addition of the solid salt under stirring and kept overnight at 4 °C before centrifugation in the same conditions as above. The resulting supernatant was then added with solid ammonium sulfate up to 50% saturation (2.0 M) at 4 °C and kept overnight at this temperature. After centrifugation, the supernatant was recovered and added with solid ammonium sulfate up to 80% saturation (3.2 M) at 4 °C. After overnight precipitation and centrifugation, the final supernatant (S80) was recovered and loaded on a phenyl-sepharose column (5 cm × 12 cm) equilibrated in 3.2 M ammonium sulfate elution buffer. Stepwise elution was then performed at 1.0, 0.5, 0.2 and 0.1 M ammonium sulfate in 50 mM ammonium hydrogen carbonate and then with 50 mM ammonium hydrogen carbonate alone and finally with 50% ethylene glycol (Fig. 1, left panel).

PEBP-1 was mainly found in the 0.5 M ammonium sulfate fraction (fraction III). This fraction was then dialyzed against demineralized water at 4 °C, freeze-dried and submitted to desalting chromatography on a Sephadex G25 column equilibrated in 50 mM ammonium hydrogen carbonate.

Since almost no material eluted at 0.2 M and 0.1 M ammonium sulfate, the standard elution scheme was modified as to eluate the PEBP-containing fraction directly with 50 mM ammonium hydrogen carbonate after the 3.2 M and 1 M ammonium sulfate steps (Fig. 1, right panel) in the following purifications. As expected, PEBP was eluted in fraction III in the absence of ammonium sulfate.

The analysis of fraction III by 2D-SDS-PAGE (Fig. 2) showed that it contained only a few proteins, with PEBP as the main component and ubiquitin as a minor component as determined by specific Western blotting.

Size-exclusion chromatography on Superdex HR75 column was chosen as a final step for PEBP (Fig. 3). PEBP was detected in fraction 3 by Western blotting (Fig. 3B) and its elution volume as well

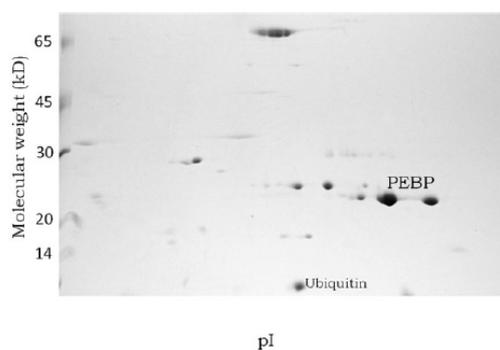


Fig. 2. 2D-SDS-PAGE of fraction III from Hydrophobic Interaction Chromatography (Fig. 1, right). PEBP and ubiquitin were identified by Western blotting (Fig. 3) and mass spectrometry (Fig. 5).

as its mobility in SDS-PAGE were in agreement with its expected molecular weight. In parallel, the 8500 Da protein which was purified in peak 4 was identified as ubiquitin by Western blotting (Fig. 3C).

3.2. Characterization

The purified bovine testis PEBP was compared to recombinant bovine PEBP expressed in *E. coli* in a SDS-PAGE and Western blotting. Fig. 4 shows that the testicular 21 kDa protein exhibits the same mobility as authentic recombinant PEBP in SDS-PAGE and that both are specifically recognized by anti-PEBP IgYs. In non-reducing conditions two bands were evidenced with the minor one exhibiting a slightly lower mobility. The two bands were detected by Western blotting indicating that the two molecules are two forms of PEBP. In reducing conditions, only one band was detected and it was also readily detected in Western blotting.

Mass spectrometry analysis of the 21 kDa protein recovered from the size-exclusion chromatography on HR75 (Fig. 3, fraction 3) confirmed that this protein is PEBP. Indeed Fig. 5 shows a major peak at 20853 that is fully consistent with the calculated molecular mass of PEBP (20881). A minor peak was also detected that exhibits a mass of 21,093 that is thus about 212 Da higher than the major peak.

These two peaks detected by mass spectrometry correspond to the two bands evidenced by SDS-PAGE and Western blotting. In reductive conditions (mercaptoethanol at 100°C), the higher-molecular weight band disappeared, suggesting that it is transformed into the lighter one. In order to test the hypothesis

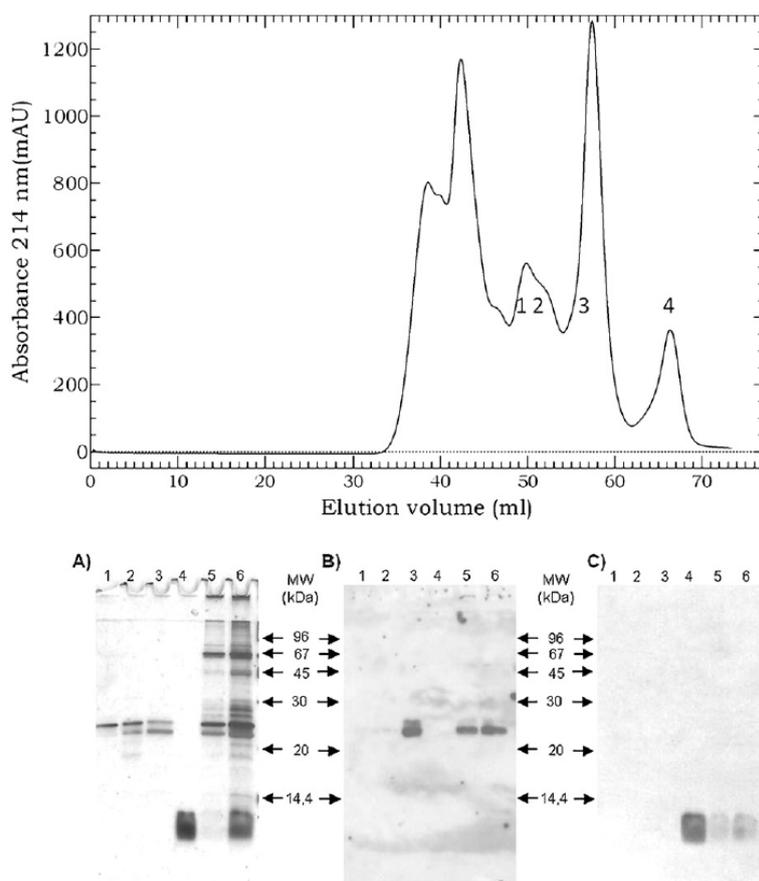


Fig. 3. (Upper panel) Size-exclusion chromatography of fraction III from hydrophobic interaction chromatography (Fig. 1, right) on Superdex HR 75. The figures show the fractions analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. (Lower panel) SDS-PAGE (15%) and Western-blottings of 2 µg of fractions 1–4 from Superdex HR75 chromatography above and of 5 and 10 µg starting material (5, 6). A: silver staining; B: Western blotting with anti-PEBP; C: Western blotting with anti-ubiquitin.

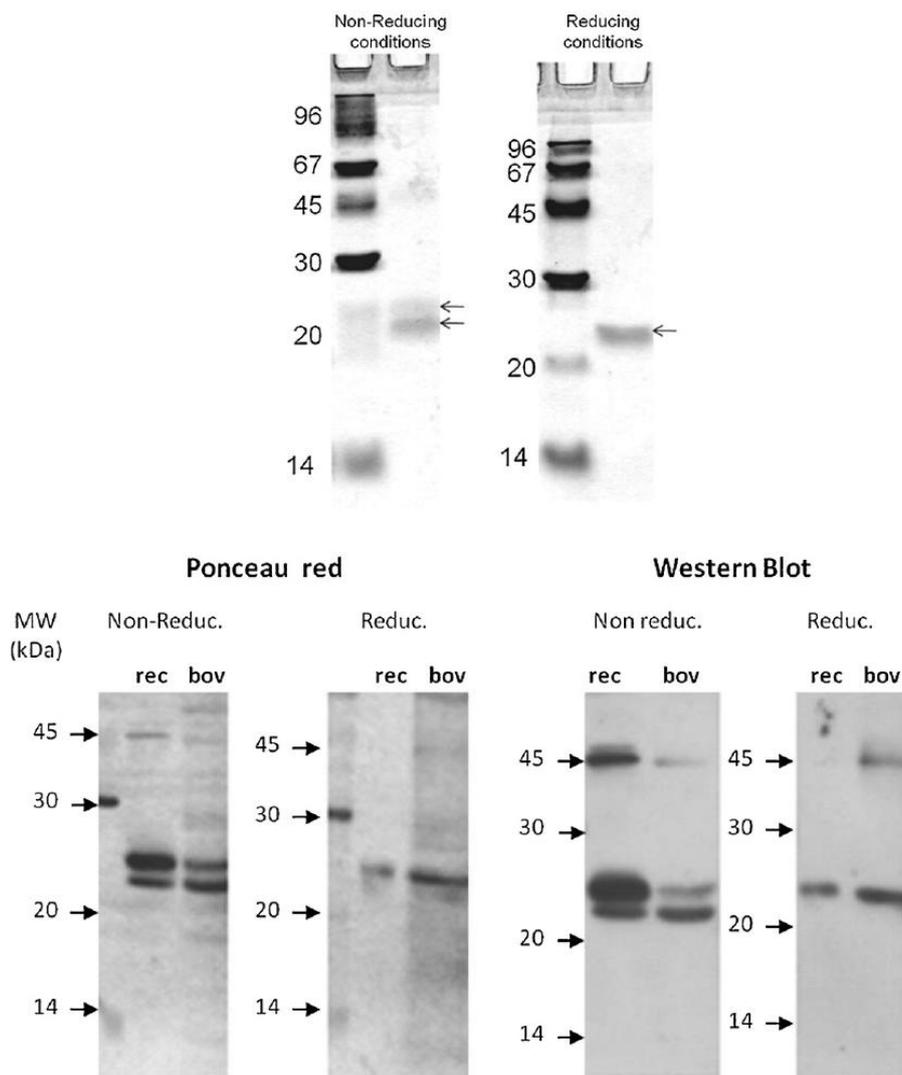


Fig. 4. Comparison of bovine PEBP with recombinant PEBP expressed in *E. coli* and effect of mercaptoethanol reduction. (Upper panel) SDS-PAGE and coomassie blue staining. (Lower panel) SDS-PAGE and ponceau red staining (left) and Western blotting (right).

that the ~212 Da adduct is due to *S*-palmitoylation of one cysteine residue in PEBP-1, the preparation was submitted to 1 M hydroxylamine treatment at 30 °C in order to specifically cleave the putative thiolester linkage. No modification in the ratio of the two PEBP bands in SDS-PAGE was observed after this treatment.

The protein eluted in fraction 4 in size-exclusion chromatography on Superdex-75 (Fig. 3) was shown to exhibit a molecular mass of 8450 (Fig. 5B) consistent with that of ubiquitin (calc. MW 8434) and confirmed by Western blotting data (Fig. 3C).

4. Discussion

Phosphatidyl-ethanolamine-binding protein (PEBP) has been shown to possess a large number of functions leading to its description under various names: Raf-1 kinase inhibitory protein (RKIP) [4], decapacitation factor-receptor (DF-R) [5] or hippocampal

cholinergic neurostimulating peptide precursor protein (HCNPpp) [3,6]. Concerning intracellular signaling pathways, in addition to its RKIP activity, PEBP has been found to interact with G protein-dependent signaling through its interaction with GRK-2 [24] and to inhibit four kinases of the NFκB pathway [25]. It has also been shown that PEBP is phosphorylated by protein kinase C (PKC) and, in consequence, 1/it interacts with, and inhibits the activity of GRKs on G protein-coupled receptors (GPCR) [26] and 2/it exhibits a diminished RKIP activity [27]. Therefore, PKC-catalyzed PEBP phosphorylation increases both the phosphoinositide and MAPK pathways [28]. PEBP has also been shown to inhibit the activity of various proteases such as thrombin or neuropsin but not chymotrypsin, plasminogen activator or elastase [7]. Recently, it has also been shown to play a role in cell migration and to be the target of locostatin, a small-molecule inhibitor of cell movement [8,9]. In view of this large spectrum of intra- and extra-cellular

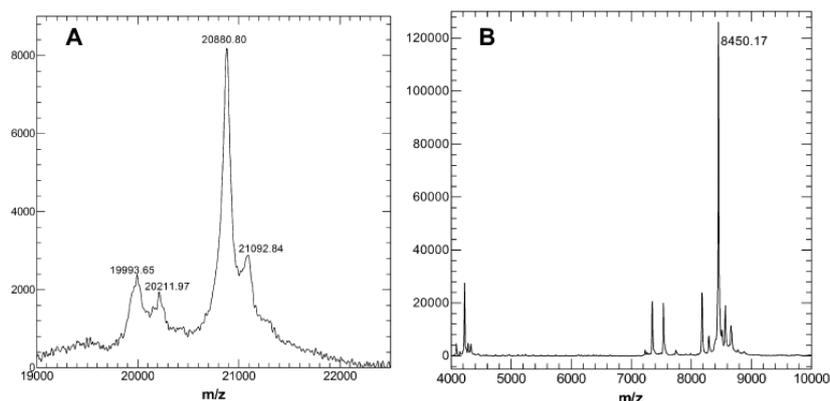


Fig. 5. (A) MALDI-TOF of fraction 3 from size-exclusion chromatography on Superdex HR 75 (Fig. 3). (B) MALDI-TOF of fraction 4 from size-exclusion chromatography on Superdex HR 75 (Fig. 3).

functions, it is of utmost interest to obtain this molecule in high amount in purified form in order to study its structure–functions relationships.

Isolation [1] and characterization [29–33] of bovine brain PEBP were performed a long time ago but the isolation of large quantities of the protein in a highly purified form appeared very cumbersome. We thus developed a more straightforward procedure for its purification.

The classical ammonium sulfate precipitation technique was found particularly efficient for PEBP isolation as the protein was one of the few ones remaining soluble at 80% ammonium sulfate saturation. Rather than getting rid of ammonium sulfate by dialysis we tested if phenyl-sepharose could be used at 80% ammonium sulfate saturation and if the protein could be retained in these conditions and eluted by diminishing ammonium sulfate concentration. PEBP was indeed retained and it was mainly found in the 0.5 M ammonium sulfate fraction during HIC stepwise elution. Not only HIC permits separation of PEBP from most of its contaminants but it is also a convenient step to concentrate the proteins from the bulky S80 fraction. Size-exclusion chromatography was found to be efficient as the final step of PEBP isolation (Fig. 3).

Two close PEBP bands were detected by SDS–PAGE and Western-blotting in non-reducing conditions. If one band is obviously expected to be authentic PEBP, the second one can be either slightly heavier or slightly lighter than it. It is important to notice that only one band is detected in SDS–PAGE in reducing conditions indicating that this second PEBP-1 form is not due to a longer or shorter amino-acid sequence.

Mass spectrometry data clearly indicate that the most abundant form is authentic PEBP-1 and that the minor form exhibits a molecular mass that is approximately 212 Da higher. Since the two forms were still detected in SDS–PAGE even after heating at 100 °C for 10 min, the form with the higher molecular weight is not simply PEBP-1 with a ligand but is rather due to a covalent post-translational adduct. The molecular weight of this conjugate (~212 Da) led us to hypothesize that the high-molecular weight PEBP-1 might possess a S-thioester palmitoyl chain. This modification which is known to be dynamic would explain the presence of PEBP-1 in cytoplasmic as well as in membrane compartments of the cell. However, concentrated hydroxylamine treatment did not affect the ratio of the two isoforms thus strongly arguing against this hypothesis. Another opposing argument is the fact that the same two isoforms are detected in recombinant PEBP-1 expressed in *E. coli* (Fig. 4). Since bacteria are not known to possess S-palmitoyl

transferase, it is very likely that the covalent modification leading to the second isoform is not S-palmitoylation.

PEBP is known to be phosphorylated by protein kinase C [28] but it is unlikely that the second isoform is phosphorylated PEBP as it disappears upon reduction with mercaptoethanol. Nevertheless it cannot be ruled out that non-phosphorylated and phosphorylated PEBPs exhibit similar mobilities in reductive conditions. If so, the second isoform might be phosphorylated PEBP but this remains to be checked.

The ubiquitous protein PEBP exhibits a considerable variety of functions that have been previously described. As it is a small protein and does not possess various domains, it can be expected that it plays these diverse roles through a common physico-chemical property. The isolation of natural PEBP isoforms from various sources is thus essential to decipher their structure–function relationships. The straightforward isolation process described here should contribute to the achievement of this goal.

5. Conclusion

The availability of PEBP in large amounts using this straightforward isolation technique will allow to more thoroughly study the very diverse functions of PEBP-1 in relation with its structure. Moreover, as the procedure described in this paper is simple and convenient for the purification of PEBP-1 from bovine testes, it can most probably be used for the isolation of PEBP-1 from other tissues and from other species as well. Finally, the feasibility of hydrophobic interaction chromatography on phenyl-sepharose at much higher ammonium sulfate concentration than that recommended by the manufacturer has also been shown efficient for ubiquitin purification and could be of interest for other highly soluble proteins as well.

Acknowledgements

We are indebted to Dr Françoise Schoentgen (CNRS, IMPMC, Paris, France) for her generous gift of recombinant bovine PEBP produced in *E. coli*, to Mr Guillaume Tsikis (INRA-CNRS PRC, Nouzilly, France) for performing 2D-SDS–PAGE, to Pascal Papillier and Jean-Noël Couët (INRA-CNRS PRC, Nouzilly, France) for collecting the organs very early in the morning at the slaughterhouse and to Lucie Spina and Valérie Labas (Laboratoire de Spectrométrie de Masse du Centre de Recherches INRA de Tours, PAIB, Nouzilly, France) for mass spectrometry analyses. Thanks are due to INRA and to the

Région Centre Council (Orléans, France) for a joint PhD grant to MHH.

References

- [1] I. Bernier, P. Jolles, *Biochim. Biophys. Acta* 790 (1984) 174.
- [2] J. Frayne, C. Ingram, S. Love, L. Hall, *Cell Tissue Res.* 298 (1999) 415.
- [3] K. Ojika, S. Mitake, N. Tohdoh, S.H. Appel, Y. Otsuka, E. Katada, N. Matsukawa, *Prog. Neurobiol.* 60 (2000) 37.
- [4] K. Yeung, T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K.D. Katsanakis, D.W. Rose, H. Mischak, J.M. Sedivy, W. Kolch, *Nature* 401 (1999) 173.
- [5] R. Gibbons, S.A. Adeoya-Osiguwa, L.R. Fraser, *Reproduction* 130 (2005) 497.
- [6] K. Ojika, S. Kojima, Y. Ueki, N. Fukushima, K. Hayashi, M. Yamamoto, *Brain Res.* 572 (1992) 164.
- [7] U. Hengst, H. Albrecht, D. Hess, D. Monard, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 535.
- [8] J. Ma, F. Li, L. Liu, D. Cui, X. Wu, X. Jiang, H. Jiang, *Liver Int.* 29 (2009) 567.
- [9] W.M. Bement, *Chem. Biol.* 12 (2005) 953.
- [10] A.N. Shemon, E.M. Eves, M.C. Clark, G. Heil, A. Granovsky, L. Zeng, A. Imamoto, S. Koide, M.R. Rosner, *PLoS One* 4 (2009) e6028.
- [11] S. Sperandio, K.S. Poksay, B. Schilling, D. Crippen, B.W. Gibson, D.E. Bredesen, *J. Cell. Biochem.* 111 (2010) 1401.
- [12] L. Cortesi, A. Barchetti, E. De Matteis, E. Rossi, L. Della Casa, L. Marcheselli, G. Tazzioli, M.G. Lazzaretti, G. Ficarra, M. Federico, A. Iannone, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 4916.
- [13] K. Lin, S. Baritaki, L. Militello, G. Malaponte, Y. Bevelacqua, B. Bonavida, *Genes Cancer* 1 (2010) 409.
- [14] A.J. George, R.M. Holsinger, C.A. McLean, S.S. Tan, H.S. Scott, T. Cardamone, R. Cappai, C.L. Masters, Q.X. Li, *Neurobiol. Aging* 27 (2006) 614.
- [15] T. Sagisaka, N. Matsukawa, T. Toyoda, N. Uematsu, T. Kanamori, H. Wake, C.V. Borlongan, K. Ojika, *Brain Res.* 1327 (2010) 107.
- [16] K. Berg, P. Puntervoll, S. Valdersnes, A. Goksoyr, *Aquat. Toxicol.* 100 (2010) 51.
- [17] T. Koenig, B.H. Menze, M. Kirchner, F. Monigatti, K.C. Parker, T. Patterson, J.J. Steen, F.A. Hamprecht, H. Steen, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 3708.
- [18] B. Vallee, C. Teyssier, R. Maget-Dana, J. Ramstein, N. Bureaud, F. Schoentgen, *Eur. J. Biochem.* 266 (1999) 40.
- [19] C. Atmanene, A. Laux, E. Glattard, A. Muller, F. Schoentgen, M.H. Metz-Boutigue, D. Aunis, A. Van Dorsselaer, G.B. Stefano, S. Sanglier-Cianferani, Y. Goumon, *Med. Sci. Monit.* 15 (2009) BR178.
- [20] C. Cahoreau, L. Garnier, J. Djiane, G. Devauchelle, M. Cerutti, *FEBS Lett.* 350 (1994) 230.
- [21] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680.
- [22] P.M. Steinert, S.Y. Kim, S.I. Chung, L.N. Marekov, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 26242.
- [23] R. Chakravarty, R.H. Rice, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 625.
- [24] T. Kroslak, T. Koch, E. Kahl, V. Hollt, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39772.
- [25] K.C. Yeung, D.W. Rose, A.S. Dhillon, D. Yaros, M. Gustafsson, D. Chatterjee, B. McFerran, J. Wyche, W. Kolch, J.M. Sedivy, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 7207.
- [26] K. Lorenz, M.J. Lohse, U. Quitterer, *Nature* 426 (2003) 574.
- [27] K.C. Corbit, N. Trakul, E.M. Eves, B. Diaz, M. Marshall, M.R. Rosner, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13061.
- [28] W. Kolch, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 827.
- [29] F. Schoentgen, F. Saccoccio, J. Jolles, I. Bernier, P. Jolles, *Eur. J. Biochem.* 166 (1987) 333.
- [30] F. Schoentgen, N. Seddiqi, S. Bucquoy, P. Jolles, L. Lemesle-Varloot, K. Provost, J.P. Mornon, *Protein Eng.* 5 (1992) 295.
- [31] I. Bernier, J.P. Tresca, P. Jolles, *Biochim. Biophys. Acta* 871 (1986) 19.
- [32] S. Bucquoy, P. Jolles, F. Schoentgen, *Eur. J. Biochem.* 225 (1994) 1203.
- [33] F. Schoentgen, L.M. Bonanno, G. Pignede, P. Jolles, *Mol. Cell. Biochem.* 98 (1990) 35.

Article 5 - Immunodetection of RKIP/PEBP by Enzyme-ImmunoAssay (EIA) and Immunohistochemistry (IHC) (In preparation)

L'anticorps anti-PEBP de poule est spécifique, il reconnaît la PEBP recombinante, il donne des résultats pareils aux résultats déjà publiés en immunohistochimie, mais son titre était faible. L'obtention de la PEBP testiculaire purifiée nous a permis de développer des nouveaux anticorps faits chez le lapin de titre plus importants. Ces deux anticorps sont utilisées pour développer des Elisa (sandwich et compétition) pour essayer de chercher la PEBP dans différents tissus chez divers espèces en se basant sur la sensibilité de l'Elisa et sur le fait que la PEBP est bien conservée depuis les bactéries, les plantes jusqu'aux animaux.

Dans ce papier en cours de préparation, on expose les différents résultats obtenus en immunohistochimie et en immunofluorescence avec les conditions de l'Elisa développé.

Immunodetection of RKIP/PEBP by Enzyme-ImmunoAssay (EIA) and Immunohistochemistry (IHC)

Maya HAJ HASSAN, Mélanie VOSGES, Matthieu KELLER, Danièle KLETT,
Claire CAHOREAU & Yves COMBARNOUS

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unit « Physiologie de la Reproduction et des Comportements », 37380 Nouzilly (France)

Abstract

Bovine Phosphatidyl-Ethanolamine Binding Protein (PEBP-1 or RKIP) isolated as we previously described was used as an immunogen for the production of antisera in two rabbits. These antisera were used to set-up a competitive EIA and to detect PEBP/RKIP by IHC in various tissues.

This competitive EIA was found to detect bovine PEBP/RKIP with a threshold of 60 ng/ml and an ED50 of 500 ng/ml. It was also found to detect PEBPs in other species such as mouse, human, chicken, xenopus) but not in invertebrates (amphioxus, oyster) or a plant (Pervenche). PEBP/RKIP was detected by immunohistochemistry (IHC) in bovine blastocysts and testis, in mouse and zebrafish brain as well as at the surface of bovine and porcine spermatozoa.

1. Introduction

Phosphatidyl-Ethanolamine Binding Protein (PEBP) has been named after its ability to bind phosphatidyl-ethanolamine (Bernier and Jolles, 1984) but it has also been shown to bind various other molecules such as morphine-6-glucuronide (Goumon et al., 2006, Atmanene et al., 2009), fructose, phosphodiesterase inhibitors (Dadvar et al., 2009) and various nucleotide derivatives such as FMN, ATP, GTP (Bucquoy et al., 1994). The 3D-structure and dynamics of its pocket has been studied in order to identify new ligands (Shemon et al., 2010) that could permit to control its activities for therapeutical applications (Granovsky et al., 2009). Indeed, a large variety of functions relating to growth and differentiation have been ascribed to members of the Phosphatidyl-Ethanolamine Binding Protein (PEBP) family. PEBP-1 is often named Raf Kinase Inhibitory Protein (RKIP) as it has been shown to inhibit

the interaction between Raf and MEK and therefore inhibits the MAPK (ERK) signalling pathway (Rosner, 2007, Yeung et al., 2000, Shin et al., 2009).

RKIP/PEBP has also been shown to regulate the NF κ B signaling cascade and exogenously expressed RKIP can associate with NIK and TAK1 and inhibit TNF α and IL-1 β activation of NF κ B (Yeung et al., 2001, Tang et al., 2010, Nikolov et al., 2009). When phosphorylated by protein kinase C, RKIP/PEBP no longer inhibits the MAPK pathway but inhibits GPCR-Kinase (GRK) activity (Lorenz et al., 2003, Ribas et al., 2007, Huang et al., 2007).

RKIP/PEBP has also been reported to inhibit serine proteases, namely thrombin, neuropsin and chymotrypsin, although it shares no homology to any of the known families of serine protease inhibitors (Hengst et al., 2001, Chen et al., 2006, Mima et al., 2005, Palmieri et al., 2009).

PEBP-1 also promotes human keratinocyte differentiation and is induced during dendritic cell and macrophage differentiation (Tsao et al., 2009). RKIP/PEBP can also potentiate apoptosis induced by chemotherapeutic agents in breast (Li et al., 2009) and prostate cancer cells (Fu et al., 2003, Chatterjee et al., 2004). More recently, overexpressed RKIP was shown to inhibit Yin Yang 1 (YY1) expression in prostate and melanoma tumor cells, leading to induction of the DR5 death receptor and sensitizing the cells to TRAIL-mediated apoptosis (Odabaei et al., 2004, Bonavida and Baritaki, 2011).

In addition, RKIP/PEBP has been shown to be associated to the spermatozoa acrosome membrane and has been found to play a role in the capacitation process (Gibbons et al., 2005, Moffit et al., 2007). Amino acids 2-12 of RKIP/PEBP are identical to the hippocampal cholinergic neurostimulatory peptide (HCNP) that stimulates acetylcholine synthesis in rat septal nuclei (Ojika et al., 2000) and an enzyme capable of cleaving PEBP to form HCNP has been detected in rat hippocampi. RKIP/PEBP has also been found associated with plaques from Alzheimer's patients : there was a significant correlation between decreased PEBP and accumulation of Abeta plaque in Tg2576 mice (George et al., 2006). In spite of its numerous roles, the KO of mouse PEBP/RKIP was not lethal, and the phenotypes observed were relatively modest (Moffit et al., 2007, Theroux et al., 2007).

Most data obtained so far are obtained by inhibition or overexpression of the RKIP/PEBP gene but only a few concerns the protein itself. In order to gain information concerning the concentration variations of the RKIP/PEBP protein in physiological and physiopathological conditions, we produced specific antisera and set-up specific EIA and IHC.

2. Materials and Methods

2.1. EIA

RKIP/PEBP from bovine testis was purified as previously described (Haj Hassan et al., 2011). Eight hundred eighty micrograms of this material were used for immunization of two rabbits at Eurogentech (Liège, Belgium) using a 28-day fast protocol. The two antisera were diluted v/v with glycerol for long-term conservation at -20°C. For convenience, part of the sera were diluted 1/100 in glycerol/phosphate buffer v/v and also conserved at -20°C. This diluted stock solution was used for the extemporaneous preparation of assay dilutions.

A two-ml fraction of the two antisera was used to isolate their γ G fraction by protein G affinity chromatography. Part of this γ G fraction was biotinylated using biotin/ γ G ratios of 6 and 30 respectively. These biotinylated γ G fractions were added with glycerol (v/v) for long term stable conservation at -20°C.

The conditions selected for the competitive EIA were the following.

The conditions selected for the sandwich EIA were the following.

2.2. IHC

Tissue preparation

Testis were cut into small pieces (1x2 cm with a flat and smooth cutting surface) and fixed for 24 hours with freshly prepared 4% RNase-free paraformaldehyde. Pieces were dehydrated first in 50% ethanol in water (2 x 30 minutes), then immersed in 70% ethanol in water (2 hours), followed by 90%(1hour), 95% (1 hour) and 100% (3 x 20 minutes) solutions. Pieces were then immersed in a mixed of butanol-ethanol (v/v) for one hour before immersion in pure butanol overnight at 4°C. The second day, the samples were immersed in butanol for 2 hours, in butanol-paraffin preheated overnight for 3 hours at 56°C, in paraffin for 3 hours at 56°C and in paraffin overnight at 56°C. The material was embedded in paraffin wax. The

sections were cut at 5 μm with a microtome at room temperature. Superfrost slides were used to prevent detaching of tissue. The slides were dried at 37°C for 24 hours.

Sperm cell preparation

Frozen bovine ($12 \times 10^6/\text{mL}$) and porcine ($800 \times 10^6/\text{mL}$) spermatozoa were thawed at 35°C and 37°C respectively for 30 seconds. Motile spermatozoa were obtained by centrifugation through a discontinuous Percoll (Amersham, Pharmacia Biotech, Orsay, France) gradient 45% and 90%. Sperm cells were collected at the bottom of the 90% fraction and washed in 6 mL PBS 1X (Dulbecco) for bovine spermatozoa and in 4 mL Beltsville Thawing Solution (BTS) (Cobiporc, Saint Gilles, France) by centrifugation at 100 g for 10 minutes. Heparine and caffeine were used to capacitate bovine and porcine spermatozoa respectively.

For experiments, the pelleted spermatozoa were fixed on slides by centrifugation at 150 x g for 5 minutes high acceleration on a cytospin (Shandon, England). This method permits to obtain a monolayer of cells on slides while maintaining cellular integrity. Slides were fixed with freshly prepared 4% RNase-free paraformaldehyde.

Mice and zebrafish brain frozen sections

Immunostaining of PEBP on mice and zebrafish brain were performed respectively by Mathieu Keller (INRA, Nouzilly, France) and Melanie Vosges (Ineris, Paris, France).

Immunohistochemistry Protocol

Slides were deparaffinized for 2 times in toluene for 3 min each, rehydrated twice in 100% Ethanol for 3 minutes each and then in 95%, 70%, 50% ethanol for 3 minutes. They were washed in PBS 1X for 2 minutes. The tissue peroxidase activity was inhibited by incubation for 15 minutes in 0.3% (v/v) hydrogen peroxide in PBS. Sections were washed again in PBS-0.1% (v/v) Tween for 5 minutes. Finally, an additional washing step in PBS-0.1% (v/v) Triton X100 for 5 minutes is required to permeabilize the section. Non-specific antibody binding was blocked with 2% (w/v) BSA in PBS for one hour. The tissue sections were incubated with the primary antibody anti-PEBP (1/1000) overnight AT 4°C. Sections were washed for 3 times in PBS – 0.1% (v/v) Tween for 10 minutes each and incubated with the HRP donkey anti-chicken IgY for 1 hour (1/1000). Sections were washed 3 times in PBS-0.1% (v/v) Tween for 10 minutes. The reaction was developed in chromogenic diaminobenzidine DAB revelation system (Dako, France). Sections were finally

washed in water to stop the DAB reaction, counterstained in hematoxylin, dehydrated and mounted in depex (VWR, England). All incubations were carried out at room temperature unless otherwise indicated. In case of use of an Alexa Fluor 547 or 477-conjugated donkey anti-chicken IgY (1/1000, Interchim) as a secondary antibody, sections were counterstained in DAPI and mounted in fluoromount-G (SouthernBiotech). The same immunocytochemistry protocol was used for spermatozoa and frozen sections except that the first steps of deparaffinization and hydration were omitted. To control the specificity of the staining, sections were processed without the primary antibody, or when the primary antibody was preabsorbed with the purified PEBP, or with the pre-immune serum when provided.

3. Results

3.1. IEA

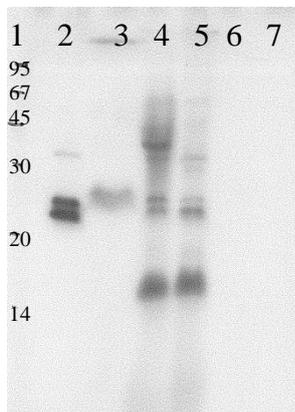


Figure 1. Western Blot obtained with rabbit anti-PEBP (1/10000). Horseradish peroxidase anti-rabbit antibodies was used as secondary antibodies (1/100000, one hour room temperature) and chemiluminescent eCL 20 min exposure. Lane 1: Low Molecular Weight markers (MW) are indicated in kDa. Lane 2: P50 testicular fraction. Lane 3: human spermatozoa extraction. Lane 4 : Chicken liver extraction. Lane 5: Chicken testis extraction. Lane 6 : Oyster extraction. Lane 7 : *Catharanthus roseus* (Plant) extraction.

3.2. IHC

Immunolocalisation of PEBP in young bovine Testes

Staining was detected in the apical compartment of the seminiferous tubules (stage IV) precisely in elongated spermatids and residual bodies on section of young bovine testes .It was stage dependent staining. The omission of the primary antibody served as negative control (Fig.1) but when the bovine testicular PEBP was purified and to confirm the positive PEBP staining found in seminiferous tubules, an antigen blocking assay was performed. As shown in figure 2, PEBP staining was completely abolished when the antibody was preabsorbed with the purified PEBP showing the specificity of the antibody used. (Fig.2)

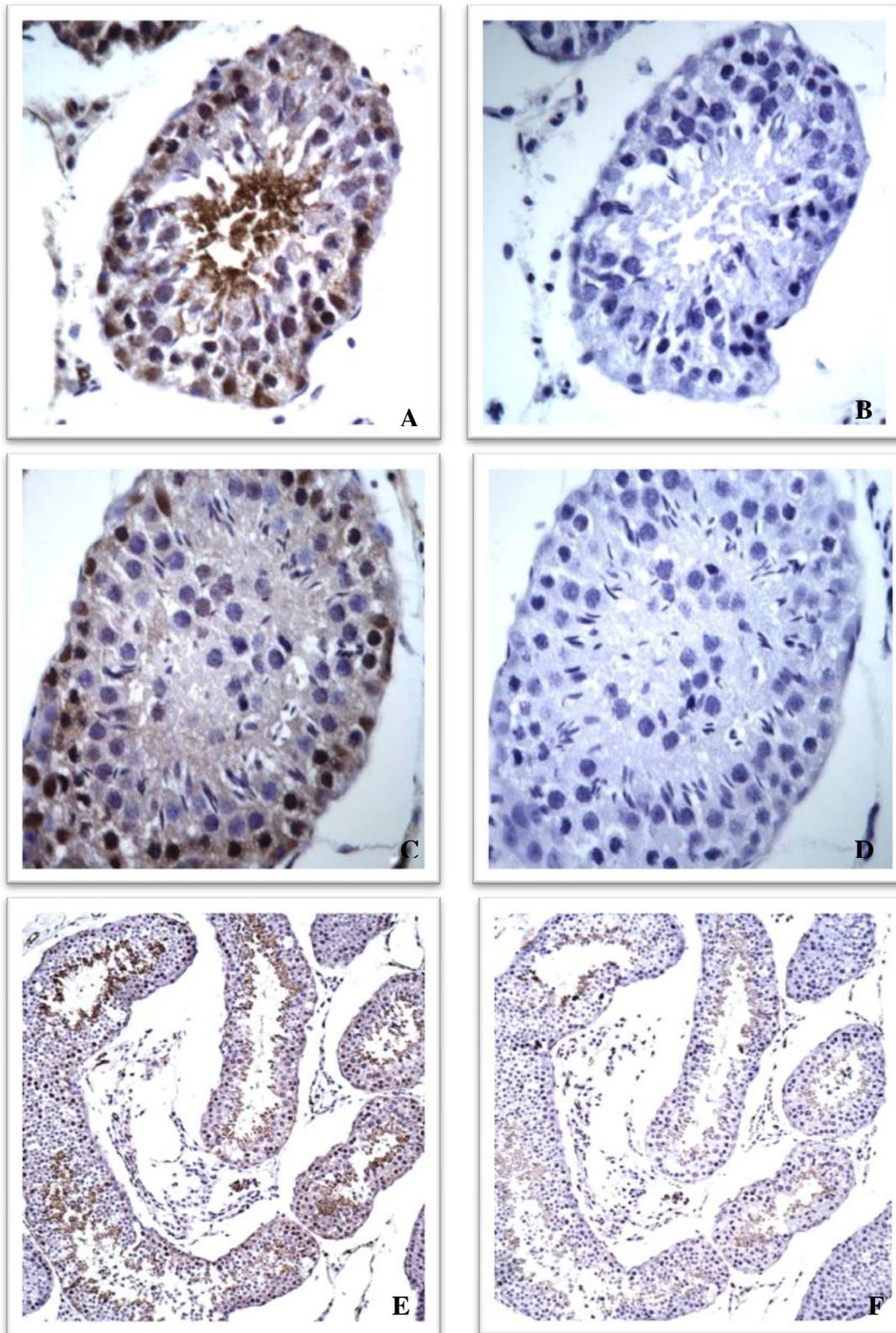


Figure 1. Immunolocalisation of PEBP in young bovine testes, using an anti-PEBP antiserum.

A- Intense staining was detected in elongated stage IV.

C- No staining in stage X on the same section. B, D- Negative control.

E - Section of young testis incubated with PEBP antibody.

F - Control section of young testis probed with anti-PEBP preabsorbed with purified PEBP.

Immunolocalisation of PEBP in bovine and porcine spermatozoa

Two conditions were evaluated; capacitated and non capacitated spermatozoa. Immunochemical results showed, first that PEBP is located on the acrosomal region and the post-acrosomal region at the junction of the head and the mid piece and on some parts of the flagellum in both bovine and porcine spermatozoa and, secondly, that the intensity of the signal is capacitation state dependent. The signal was stronger in uncapacitated spermatozoa especially on the acrosomal cap. To control the specificity of the staining, sections were processed without the primary antibody (Fig.3)

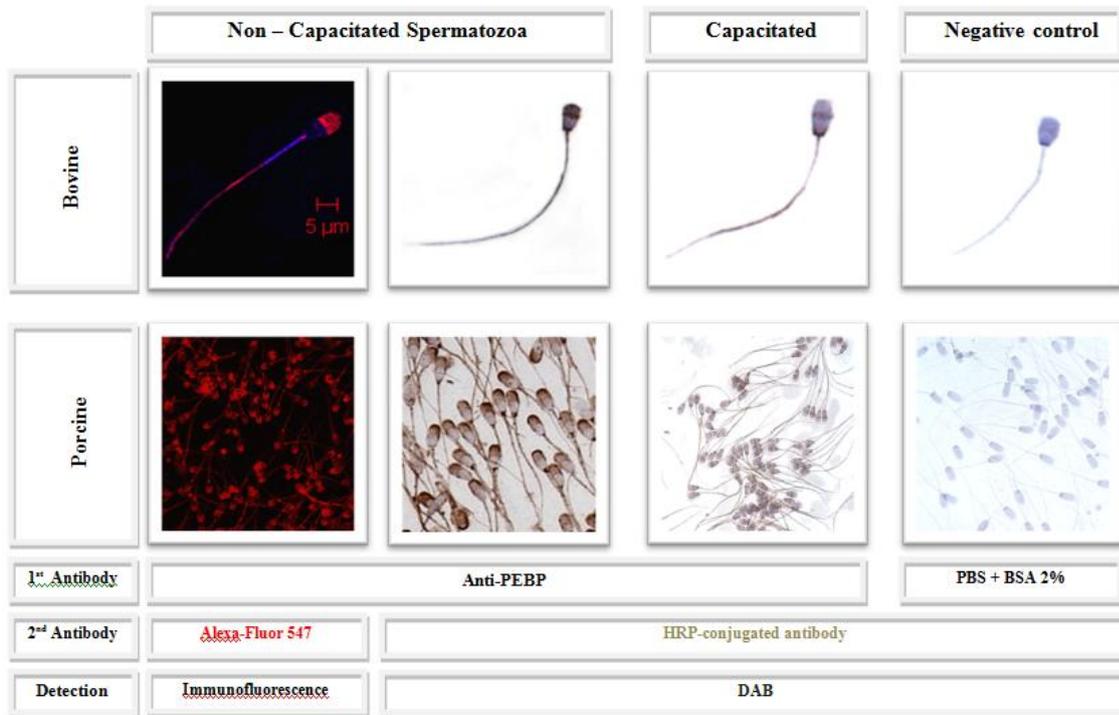


Figure 3. Immunolocalisation of PEBP on bovine and porcine spermatozoa in both conditions noncapacitated and experimentally capacitated.the intensity of staining was capacitation state-dependent and was observed in both the head and the flagellum. The red bar represents 5 μm.

Immunolocalisation of PEBP in bovine blastocysts

Blastocysts from different developmental stages were used for immunocytochemistry, some for the staining with the anti-PEBP and others as a control. PEBP was detected in the whole embryo included the inner cell mass (ICM) and the zona pellucid (Fig.4).

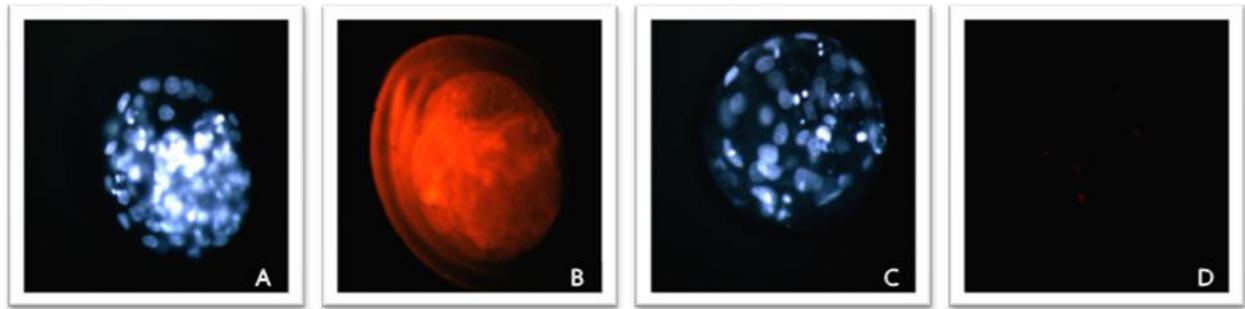


Figure 4. Localization of PEBP in an expanded bovine blastocyst viewed under fluorescent microscopy at 200X.

A - DAPI staining to visualize the nuclei.

B - PEBP staining in the whole embryo even zona pellucida.

C - DAPI staining on control blastocyst.

D - PEBP-Staining is not visible in the control embryo.

Immunolocalisation of PEBP in adult zebrafish brain by immunofluorescence

PEBP immunostaining was faint in the prosencephalon (forebrain), more intense in the mesencephalon (midbrain) and very important in the rhombencephalon (hindbrain). At the forebrain, immunoreactive cells were detected in the glomerular layer of olfactory bulb and the ventral forebrain. The glomerular layer is the most superficial layer, consisting of mitral cell dendritic arborizations (glomeruli), olfactory nerve fibers, and periglomerular cells.

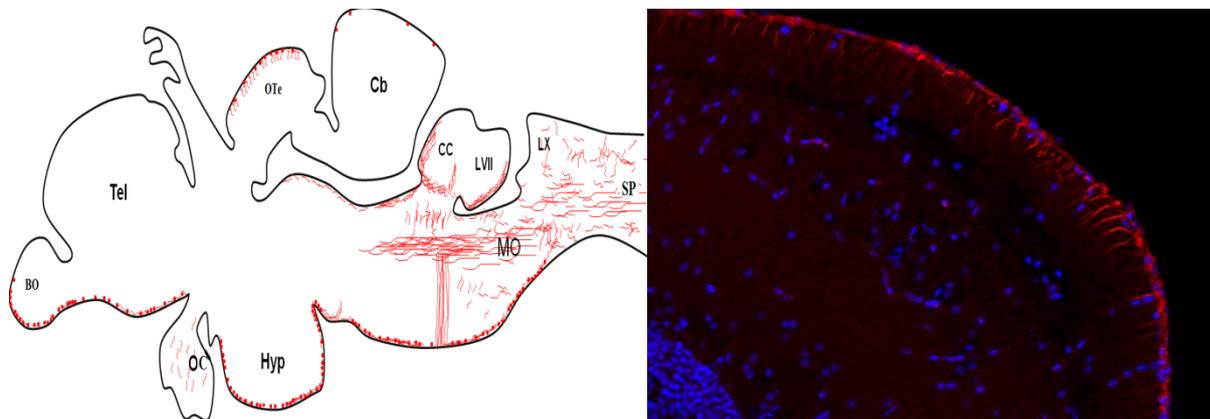


Figure 5. Schematic representation of PEBP distribution on sagittal meridional section of adult zebrafish with one micrograph of the optic tectum. PEBP is represented in red.

OB, olfactory bulb; Tel, telencephalon; OC, optic chiasm ; OTe, optic tectum ; Hyp, hypothalamus; Cb, cerebellum ; CC, *crista cerebellaris*; LVII facial lobe I; LX, vagal lobe; MO, *medulla oblongata* ; Sp, spinal cord.

At the optic chiasm few immunoreactive extensions were observed. A layer of immunoreactive cells was also observed in the ventral region of the hypothalamus. At the midbrain, cells and immunoreactive extensions are highlighted on the surface of optic tectum. More posteriorly, numerous immunoreactive cells were observed in the ventral region of the hindbrain. Immunoreactive extensions are highlighted at the crista cerebellar, facial lobe and vagal lobe. Finally, intense staining was observed on fibers in the myelencephalon (medulla oblongata) that extends to the spinal cord (Fig. 5).

Immunolocalisation of PEBP in mouse brain by immunofluorescence

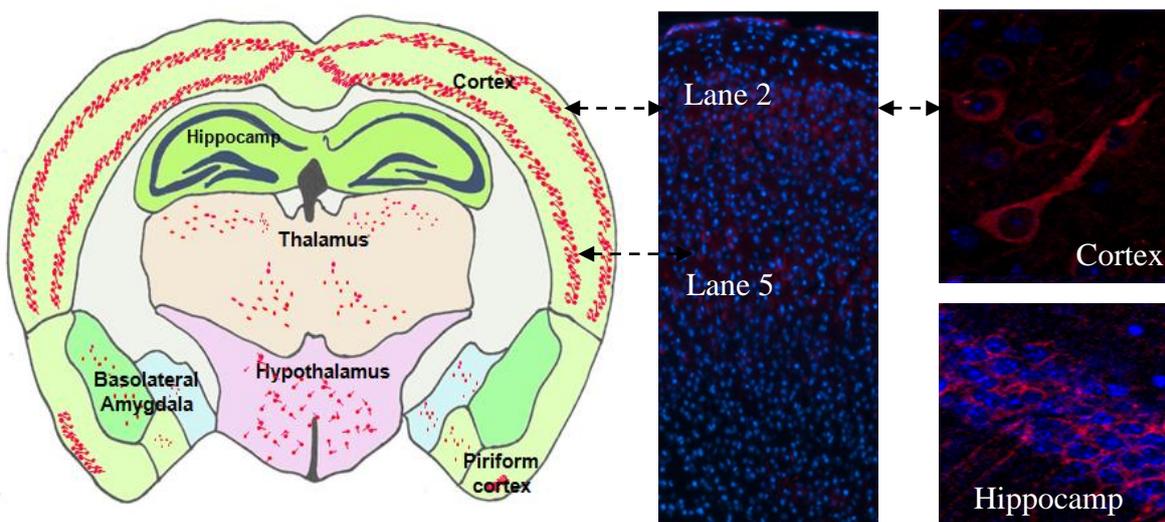


Figure 7. Schematic representation of PEBP distribution on coronal section of adult mouse brain with some micrographs.

As we can see from the schematic representation, PEBP is well distributed in lane 2 and lane 5 of the cortex; it continues also to be present in the Piriform cortex, in the hypothalamic region, the thalamus and the hippocampal regions. No immunostaining was observed with negative controls.

4. Discussion

During spermatogenesis, spermatozoa undergo extensive cellular and membrane remodeling mainly in the epididymis of the male including significant modifications in lipid composition, depletion of phosphatidylcholine, and phosphatidylethanolamine, and alterations in the proportions of fatty acids in spermatozoa. These changes also continue during the capacitation processes in the female reproductive tracts, when the non fertilizing-spermatozoa acquire the

capacity to fertilize the oocyte. Once capacitated, the spermatozoa undergo an acrosome reaction and lose proteins from the sperm surface. These surface proteins that reversibly prevent fertilization are called decapacitation factor (DFs).

PEBP has been described in mammalian sperm (Frayne et al., 1998) and testicular and epididymal fluids (Jones and Brown, 1987, Jones and Hall, 1991). In rodents, RKIP-1 and RKIP-2 are expressed at high levels in the seminiferous tubules and elongated spermatids (Hickox et al., 2002, Moffit et al., 2007, Saunders et al., 1995), or expressed in all cells of the testis (Perry et al., 1994), all depends on the techniques or antisera used. The function of PEBP in spermatozoa is unclear, but it has been suggested that it plays a role in membrane biogenesis and maintenance: PEBP may be responsible for the transfer of phosphatidylethanolamine between domains during reorganization of the plasma membrane or in anchoring phosphatidylethanolamine on the surface of the spermatid. In the present paper, localization of PEBP was consistent with what has been described before: within the bovine testis, PEBP staining was mainly detected in the elongated spermatids, concentrated in cytoplasmic droplets then finally resorbed by the Sertoli cells. It was stage dependent staining. In the testis, PEBP was also located outside the cells, on bovine and porcine sperm plasma membranes where its distribution was mainly on the acrosomal region of the head and it was capacitation state-dependent. Gibbons and his group showed that DFs interact with the plasma membrane indirectly through specific receptors which they isolated, purified, sequenced and finally determined to be RKIP-1. Their work provided the first strong evidence for a role of RKIP-1 in mammalian fertility; RKIP-1 is implicated in sperm capacitation (Gibbons et al., 2005). In another study, RKIP-1 has been identified as one of the decapacitation factors that are released from the surface of mammalian spermatozoa during capacitation *in vitro*. It was amongst a subset of predominant glycoproteins which appear to be elaborated by the epididymis and coat the surface of spermatozoa (Nixon et al., 2006). Additional studies are needed to determine whether RKIP-1 acts as a decapacitation receptor or as a decapacitation factor. Although RKIP-1 Knockout mice were found to be close to normal, Moffit et al, showed that RKIP-1^{-/-} were found to be over 90% capacitated compared to 50% in the wildtype counterparts. RKIP-1 is important in the process of fertilization and acts as a modulator of the sperm surface properties (Moffit et al., 2007).

Localization of the PEBP is not restricted to reproductive tissues but also it has been described in neuronal tissues : in oligodendrocytes (Roussel et al., 1988) and Schwann cells (Moore et al., 1996) which led again to the hypothesis that PEBP plays a role in the

biogenesis and maintenance of membranes, without forgetting that the phosphatidylethanolamine is the major phospholipid component of the myelin elaborated by these cells. Another possible role of the PEBP is the precursor of a 2-12 amino acids peptide that is identical to the hippocampal cholinergic neurostimulatory peptide (HCNP) that stimulates acetylcholine synthesis in rat septal nuclei (Ojika et al., 2000). An enzyme capable of cleaving PEBP to form HCNP has been detected in rat hippocampi. RKIP/PEBP has also been found associated with plaques from Alzheimer's patients and may contribute to the disease process (George et al., 2006). We used the same antibody to localize PEBP on mice and zebrafish brain sections, ubiquitous expression of PEBP was found in the forebrain of zebrafish especially in the glomerular layer, in the midbrain and in the hindbrain as extensions. While in mice brain, PEBP was observed in cortexes and olfactory nuclei. It was interesting to find that PEBP was detected in the olfactory bulbs of zebrafish and mice. In *Drosophila*, PEBP orthologs were found in antenae and olfactory hairs and play a role in odorant binding. RKIP-1 knock out mouse display an olfaction deficit that is apparent by 4 months of age and increases in severity by 5-8 months (Theroux et al., 2007). The decline in olfactory perception is one of the prominent features of Alzheimer disease (Solomon et al., 1998) and RKIP has been implicated in AD (George et al., 2009, Tsugu et al., 1998).

We have studied the PEBP expression at both the tissue level by using western blots and the cellular level by immunocytochemistry in order to shed light on the functions of PEBP. The distribution of the PEBP in the whole bovine blastocysts as its apparent location in regions of cell growth (testes, developing brain...) and its ability to bind biological membranes (spermatozoa), imply that the PEBP may act as a messenger between the cell membrane and the cytosol and may be involved in the modification of membrane structures during growth. The anti-PEBP used was able to recognize the PEBP in different species, and was useful to develop an enzyme-immunoassay that will be a valuable tool to measure the variation of the RKIP/PEBP protein concentration in physiological and physiopathological conditions.

Acknowledgements

We would like to thank Christine PERROU and Leslie ANGULO for providing us bovine spermatozoa and blastocytes, Christophe STAUB for providing porcine spermatozoa and his valuable advices and excellent explanations, Ghylene GOUDET for samples and technical advices. Pascal PAPILLIER and Jean-Noel COUET for collecting the testes very early in the morning at the slaughterhouse.

References

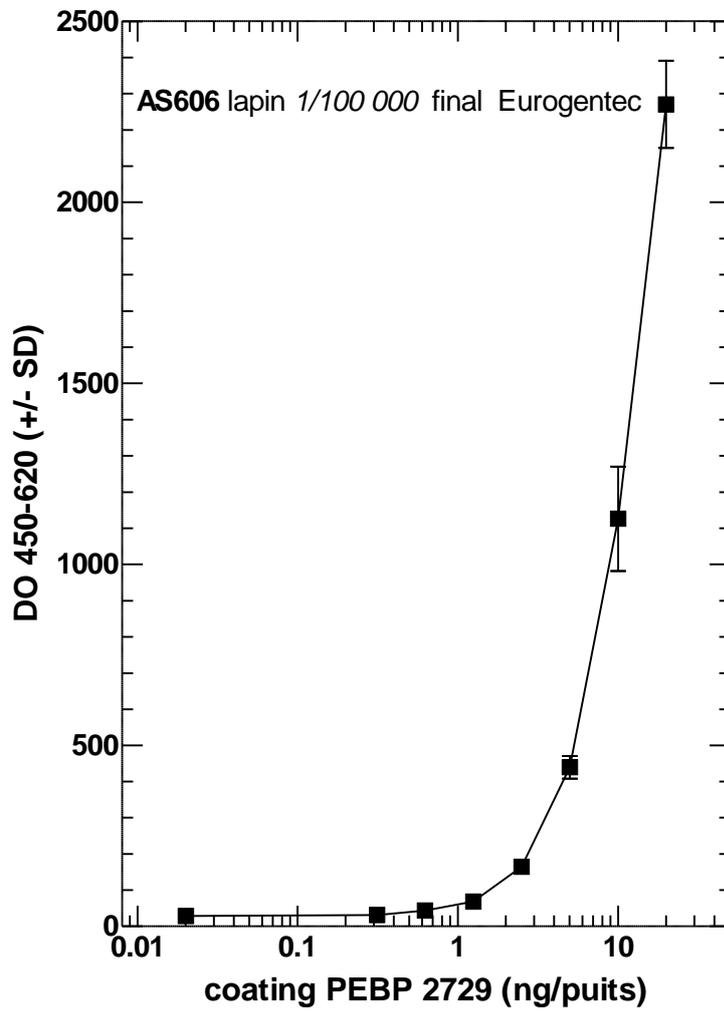
- ATMANENE, C., LAUX, A., GLATTARD, E., MULLER, A., SCHOENTGEN, F., METZ-BOUTIGUE, M. H., AUNIS, D., VAN DORSSELAER, A., STEFANO, G. B., SANGLIER-CIANFERANI, S. & GOUMON, Y. (2009) Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med Sci Monit*, 15, BR178-87.
- BERNIER, I. & JOLLES, P. (1984) Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain. *Biochim Biophys Acta*, 790, 174-81.
- BONAVIDA, B. & BARITAKI, S. (2011) Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: Downregulation of the NF-kappaB/Snail/YY1/RKIP circuitry. *Nitric Oxide*, 24, 1-7.
- BROOKS, D. E. (1985) Characterization of a 22 kDa protein with widespread tissue distribution but which is uniquely present in secretions of the testis and epididymis and on the surface of spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*, 841, 59-70.
- BUCQUOY, S., JOLLES, P. & SCHOENTGEN, F. (1994) Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur J Biochem*, 225, 1203-10.
- CHATTERJEE, D., BAI, Y., WANG, Z., BEACH, S., MOTT, S., ROY, R., BRAASTAD, C., SUN, Y., MUKHOPADHYAY, A., AGGARWAL, B. B., DARNOWSKI, J., PANTAZIS, P., WYCHE, J., FU, Z., KITAGWA, Y., KELLER, E. T., SEDIVY, J. M. & YEUNG, K. C. (2004) RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 17515-23.
- CHEN, Q., WANG, S., THOMPSON, S. N., HALL, E. D. & GUTTMANN, R. P. (2006) Identification and characterization of PEBP as a calpain substrate. *J Neurochem*, 99, 1133-41.
- COMBARNOUS, Y. (1992) Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr Rev*, 13, 670-91.
- DADVAR, P., KOVANICH, D., FOLKERS, G. E., RUMPEL, K., RAIJMAKERS, R. & HECK, A. J. (2009) Phosphatidylethanolamine-binding proteins, including RKIP, exhibit affinity for phosphodiesterase-5 inhibitors. *Chembiochem*, 10, 2654-62.
- FRAYNE, J., MCMILLEN, A., LOVE, S. & HALL, L. (1998) Expression of phosphatidylethanolamine-binding protein in the male reproductive tract: immunolocalisation and expression in prepubertal and adult rat testes and epididymides. *Mol Reprod Dev*, 49, 454-60.
- FU, Z., SMITH, P. C., ZHANG, L., RUBIN, M. A., DUNN, R. L., YAO, Z. & KELLER, E. T. (2003) Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 95, 878-89.
- GEORGE, A. J., GORDON, L., BEISSBARTH, T., KOUKOULAS, I., HOLSINGER, R. M., PERREAU, V., CAPPAL, R., TAN, S. S., MASTERS, C. L., SCOTT, H. S. & LI, Q. X. (2009) A serial analysis of gene expression profile of the Alzheimer's disease Tg2576 mouse model. *Neurotox Res*, 17, 360-79.
- GEORGE, A. J., HOLSINGER, R. M., MCLEAN, C. A., TAN, S. S., SCOTT, H. S., CARDAMONE, T., CAPPAL, R., MASTERS, C. L. & LI, Q. X. (2006) Decreased phosphatidylethanolamine binding protein expression correlates with Abeta accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27, 614-23.

- GIBBONS, R., ADEOYA-OSIGUWA, S. A. & FRASER, L. R. (2005) A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine-binding protein 1. *Reproduction*, 130, 497-508.
- GOUMON, Y., MULLER, A., GLATTARD, E., MARBAN, C., GASNIER, C., STRUB, J. M., CHASSEROT-GOLAZ, S., ROHR, O., STEFANO, G. B., WELTERS, I. D., VAN DORSSELAER, A., SCHOENTGEN, F., AUNIS, D. & METZ-BOUTIGUE, M. H. (2006) Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *J Biol Chem*, 281, 8082-9.
- GRANOVSKY, A. E., CLARK, M. C., MCELHENY, D., HEIL, G., HONG, J., LIU, X., KIM, Y., JOACHIMIAK, G., JOACHIMIAK, A., KOIDE, S. & ROSNER, M. R. (2009) Raf kinase inhibitory protein function is regulated via a flexible pocket and novel phosphorylation-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, 29, 1306-20.
- HAI HASSAN, M., KLETT, D., CAHOREAU, C. & COMBARNOUS, Y. (2011) Straightforward isolation of phosphatidyl-ethanolamine-binding protein-1 (PEBP-1) and ubiquitin from bovine testis by hydrophobic-interaction chromatography (HIC). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879, 2935-2940.
- HENGST, U., ALBRECHT, H., HESS, D. & MONARD, D. (2001) The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem*, 276, 535-40.
- HICKOX, D. M., GIBBS, G., MORRISON, J. R., SEBIRE, K., EDGAR, K., KEAH, H. H., ALTER, K., LOVELAND, K. L., HEARN, M. T., DE KRETZER, D. M. & O'BRYAN, M. K. (2002) Identification of a novel testis-specific member of the phosphatidylethanolamine binding protein family, pebp-2. *Biol Reprod*, 67, 917-27.
- HUANG, J., MAHAVADI, S., SRIWAI, W., GRIDER, J. R. & MURTHY, K. S. (2007) Cross-regulation of VPAC(2) receptor desensitization by M(3) receptors via PKC-mediated phosphorylation of RKIP and inhibition of GRK2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G867-74.
- JONES, R. & BROWN, C. R. (1987) Identification and characterization of the 2D6 and Mr 23,000 antigens on the plasma membrane of rat spermatozoa. *Biochem J*, 241, 353-60.
- JONES, R. & HALL, L. (1991) A 23 kDa protein from rat sperm plasma membranes shows sequence similarity and phospholipid binding properties to a bovine brain cytosolic protein. *Biochim Biophys Acta*, 1080, 78-82.
- LI, H. Z., GAO, Y., ZHAO, X. L., LIU, Y. X., SUN, B. C., YANG, J. & YAO, Z. (2009) Effects of raf kinase inhibitor protein expression on metastasis and progression of human breast cancer. *Mol Cancer Res*, 7, 832-40.
- LORENZ, K., LOHSE, M. J. & QUITTERER, U. (2003) Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature*, 426, 574-9.
- MIMA, J., HAYASHIDA, M., FUJII, T., NARITA, Y., HAYASHI, R., UEDA, M. & HATA, Y. (2005) Structure of the carboxypeptidase Y inhibitor IC in complex with the cognate proteinase reveals a novel mode of the proteinase-protein inhibitor interaction. *J Mol Biol*, 346, 1323-34.
- MOFFIT, J. S., BOEKELHEIDE, K., SEDIVY, J. M. & KLYSIK, J. (2007) Mice lacking Raf kinase inhibitor protein-1 (RKIP-1) have altered sperm capacitation and reduced reproduction rates with a normal response to testicular injury. *J Androl*, 28, 883-90.
- MOORE, C., PERRY, A. C., LOVE, S. & HALL, L. (1996) Sequence analysis and immunolocalisation of phosphatidylethanolamine binding protein (PBP) in human brain tissue. *Brain Res Mol Brain Res*, 37, 74-8.
- NIKOLOV, S., VERA, J., RATH, O., KOLCH, W. & WOLKENHAUER, O. (2009) Role of inhibitory proteins as modulators of oscillations in NFB signalling. *IET Syst Biol*, 3, 59-76.

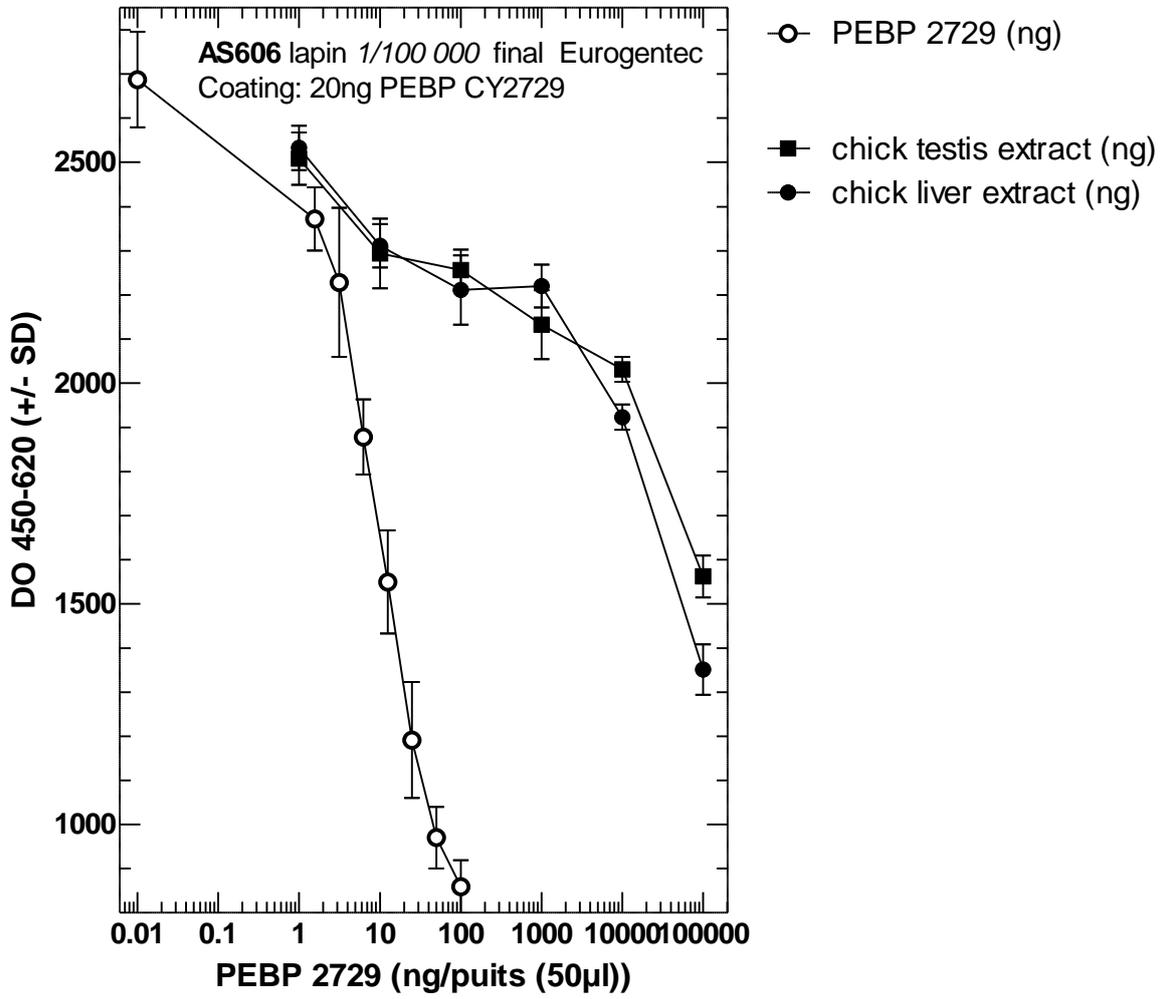
- NIXON, B., MACINTYRE, D. A., MITCHELL, L. A., GIBBS, G. M., O'BRYAN, M. & AITKEN, R. J. (2006) The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biol Reprod*, 74, 275-87.
- ODABAEI, G., CHATTERJEE, D., JAZIREHI, A. R., GOODGLICK, L., YEUNG, K. & BONAVIDA, B. (2004) Raf-1 kinase inhibitor protein: structure, function, regulation of cell signaling, and pivotal role in apoptosis. *Adv Cancer Res*, 91, 169-200.
- OJIKI, K., MITAKE, S., TOHDOH, N., APPEL, S. H., OTSUKA, Y., KATADA, E. & MATSUKAWA, N. (2000) Hippocampal cholinergic neurostimulating peptides (HCNP). *Prog Neurobiol*, 60, 37-83.
- PALMIERI, G., CATARA, G., SAVIANO, M., LANGELLA, E., GOGLIETTINO, M. & ROSSI, M. (2009) First Archaeal PEPB-Serine Protease Inhibitor from *Sulfolobus solfataricus* with Noncanonical Amino Acid Sequence in the Reactive-Site Loop. *J Proteome Res*, 8, 327-34.
- PERRY, A. C., HALL, L., BELL, A. E. & JONES, R. (1994) Sequence analysis of a mammalian phospholipid-binding protein from testis and epididymis and its distribution between spermatozoa and extracellular secretions. *Biochem J*, 301 (Pt 1), 235-42.
- PIERCE, J. G. & PARSONS, T. F. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 50, 465-95.
- RIBAS, C., PENELA, P., MURGA, C., SALCEDO, A., GARCIA-HOZ, C., JURADO-PUEYO, M., AYMERICH, I. & MAYOR, F., JR. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 913-22.
- ROSNER, M. R. (2007) MAP kinase meets mitosis: a role for Raf Kinase Inhibitory Protein in spindle checkpoint regulation. *Cell Div*, 2, 1.
- ROUSSEL, G., NUSSBAUM, F., SCHOENTGEN, F., JOLLES, P. & NUSSBAUM, J. L. (1988) Immunological investigation of a 21-kilodalton cytosolic basic protein in rat brain. *Dev Neurosci*, 10, 65-74.
- SAUNDERS, P. T., MCKINNELL, C., MILLAR, M. R., GAUGHAN, J., TURNER, K. J., JEGOU, B., SYED, V. & SHARPE, R. M. (1995) Phosphatidylethanolamine binding protein is an abundant secretory product of haploid testicular germ cells in the rat. *Mol Cell Endocrinol*, 107, 221-30.
- SHEMON, A. N., HEIL, G. L., GRANOVSKY, A. E., CLARK, M. M., MCELHENY, D., CHIMON, A., ROSNER, M. R. & KOIDE, S. (2010) Characterization of the Raf kinase inhibitory protein (RKIP) binding pocket: NMR-based screening identifies small-molecule ligands. *PLoS One*, 5, e10479.
- SHIN, S. Y., RATH, O., CHOO, S. M., FEE, F., MCFERRAN, B., KOLCH, W. & CHO, K. H. (2009) Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *J Cell Sci*, 122, 425-35.
- SOLOMON, G. S., PETRIE, W. M., HART, J. R. & BRACKIN, H. B., JR. (1998) Olfactory dysfunction discriminates Alzheimer's dementia from major depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 10, 64-7.
- TANG, H., PARK, S., SUN, S. C., TRUMBLY, R., REN, G., TSUNG, E. & YEUNG, K. C. (2010) RKIP inhibits NF-kappaB in cancer cells by regulating upstream signaling components of the I-kappaB kinase complex. *FEBS Lett*, 584, 662-8.
- THEROUX, S., PEREIRA, M., CASTEN, K. S., BURWELL, R. D., YEUNG, K. C., SEDIVY, J. M. & KLYSIK, J. (2007) Raf kinase inhibitory protein knockout mice: expression in the brain and olfaction deficit. *Brain Res Bull*, 71, 559-67.

- TSAO, D. A., YU, H. S. & CHANG, H. R. (2009) Nitric oxide enhances expression of raf kinase inhibitor protein in keratinocytes. *Exp Dermatol*, 18, 571-3.
- TSUGU, Y., OJIKA, K., MATSUKAWA, N., IWASE, T., OTSUKA, Y., KATADA, E. & MITAKE, S. (1998) High levels of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) in the CSF of some patients with Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 5, 561-569.
- YEUNG, K., JANOSCH, P., MCFERRAN, B., ROSE, D. W., MISCHAK, H., SEDIVY, J. M. & KOLCH, W. (2000) Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol*, 20, 3079-85.
- YEUNG, K. C., ROSE, D. W., DHILLON, A. S., YAROS, D., GUSTAFSSON, M., CHATTERJEE, D., MCFERRAN, B., WYCHE, J., KOLCH, W. & SEDIVY, J. M. (2001) Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, 21, 7207-17.

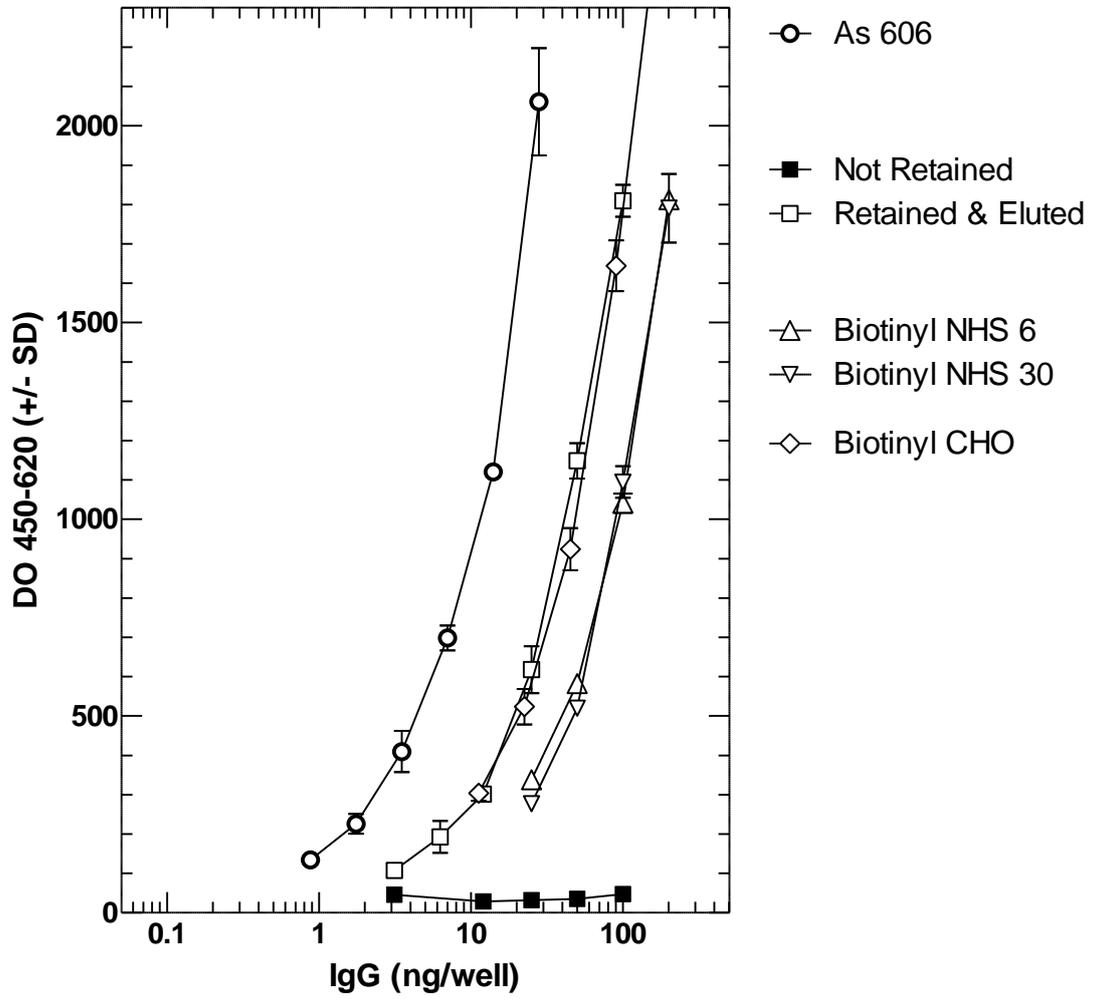
EIA PEBP CY2769



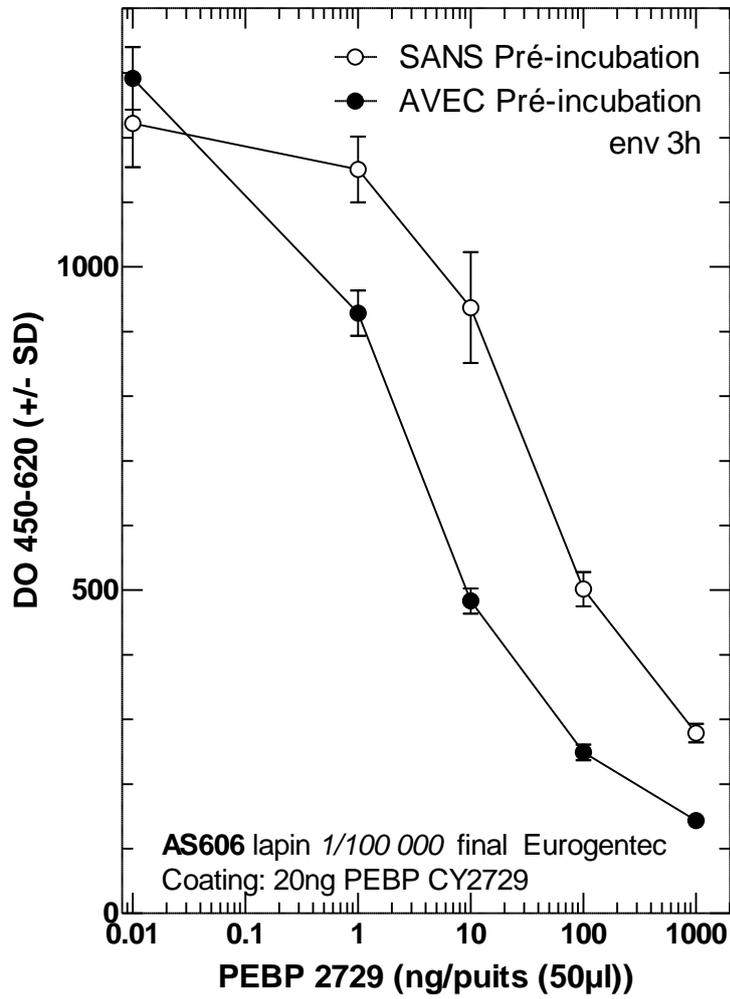
EIA PEBP CY2768



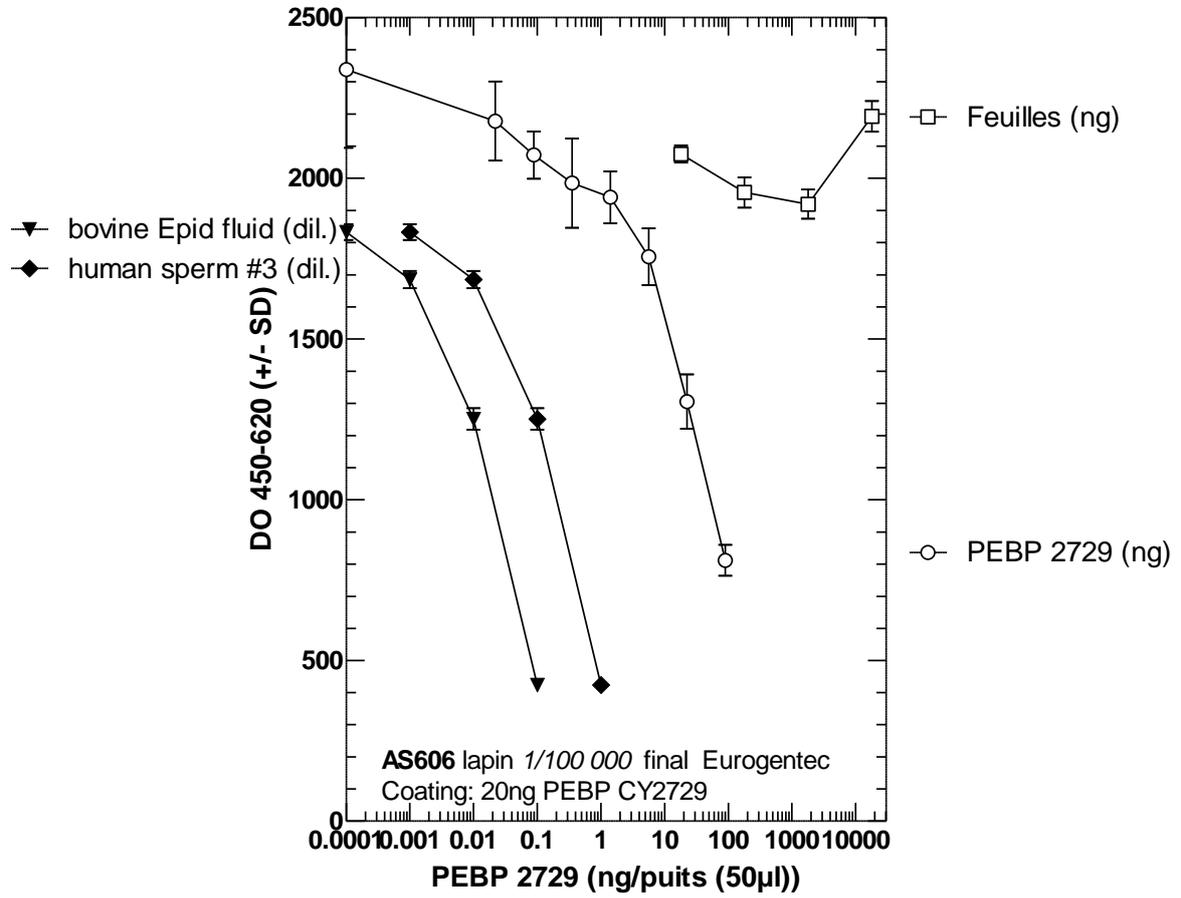
EIA PEBP CY2770b



EIA PEBP CY2762



EIA PEBP CY2763



Matériels & Méthodes

Technique de biologie moléculaire

Manipulation des acides nucléiques

Extraction d'ARN

Toutes les manipulations ont été effectuées avec des gants et des lunettes de protection.

Extractions d'ARN totaux avec le kit NUCLEOSPIN® RNA

Les ARN sont extraits de chaque tissu avec le kit NUCLEOSPIN®RNA – MACHEREY-NAGEL (Cat.No.740955.50). Les tampons utilisés contiennent du thiocyanate de guanidine qui désactive la RNase et la DNase par dénaturation. Les tissus (10 à 30 mg) sont broyés dans 350 μL de tampon RA1 (**composition**) additionné de β mercaptoéthanol. La viscosité du lysat est réduite par filtration après passage sur colonne NucleoSpin® Filter L. Le lysat est récupéré par centrifugation pendant 1 minute à 11 000 g. Trois cent cinquante microlitres d'éthanol 70% sont mélangés avec le lysat par pipetage. L'application de l'échantillon sur la colonne NucleoSpin®RNA II fournie par le kit (par volume successif de 700 μL) permet de fixer les ARN totaux sur la membrane de silice. L'éluat est éliminé dans le tube collecteur par centrifugation de la colonne de 30 secondes à 11 000 g. La colonne est ensuite lavée par 350 μL de tampon MDB (Membrane Desalting Buffer). Une deuxième centrifugation pendant 1 minute à 11 000 g est nécessaire pour bien se débarrasser du tampon MDB.

La digestion d'ADN se fait par addition de 95 μL du mixte DNase (10 μL rDNase dans 90 μL de tampon rDNase) directement au centre de la membrane. Une incubation de 15 minutes à température ambiante est nécessaire. Afin d'inactiver ensuite la rDNase il faut laver la colonne avec 200 μL de tampon RA2 (**composition**) puis la centrifuger pendant 30 s à 11000 g. Le deuxième lavage se fait par 600 μL de tampon RA3 (**composition**) après changement du tube collecteur. L'éluat est éliminé par centrifugation pendant 30 s à 11000 g. Un dernier lavage est réalisé par 250 μL de tampon RA3. La membrane est totalement séchée par centrifugation pendant 2 minutes à 11 000 g. Enfin, les ARN totaux sont élués par 60 μL d'eau RNase-free après transfert de la colonne dans un nouveau tube de 1,5 mL, nucléase-free,

fourni dans le kit et une centrifugation d'une minute à 11 000 g. La quantité d'ARN est déterminée par un spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000 (Thermo science).

Extractions d'ARN totaux au TRIZOL

Le Trizol (Invitrogen) est ajouté immédiatement sur les morceaux de tissu récupérés de l'abattoir sans les décongeler dans un ratio 10 volumes de Trizol pour un volume de tissu. Le tout est homogénéisé avec l'Ultra-turax dans des tubes de 12 mL (Greiner bio-one PP-tube 12 mL Stérile 17,0/77 mm No.184261) jusqu'à homogénéisation totale. Le broyeur est lavé dans des bains successifs d'eau et d'alcool entre chaque broyage. La lyse des tissus s'effectue pendant 10 minutes sur de la glace. Le surnageant doit être transparent sinon une centrifugation est nécessaire pour se débarrasser des débris. Après cette étape, le surnageant peut être stocké à -80°C soit précipité directement au chloroforme en vortexant pendant 20 s (1 Volume de chloroforme pour 1/5 Volume de Trizol).

On laisse 15 minutes à température ambiante afin d'obtenir la répartition des phases. Une centrifugation pendant 15 minutes à 12 000 g à 4°C permet de séparer le mélange en trois phases ; une phase inférieure rouge (phase de phénol-Chloroforme), une interphase et une phase aqueuse supérieure incolore qui contient exclusivement les ARNs. Le volume de la phase aqueuse constitue environ 60% du volume de Trizol utilisé pour l'homogénéisation. La phase aqueuse est transférée dans des tubes eppendorf de 1,5 mL pour précipiter l'ARN avec de l'isopropanol (1 Volume Trizol pour 1/2 V d'isopropanol). Les tubes sont agités au vortex et incubés une nuit à -20°C.

Le lendemain, le surnageant est éliminé après centrifugation pendant 25 minutes à 12 000 g à 4°C. Le précipité d'ARN souvent invisible avant centrifugation, forme un culot colloïdal du côté du fond du tube. Deux lavages successifs avec de l'éthanol à 75% sont suivis chacun d'une centrifugation pendant 10 minutes à 12 000 g à 4°C pour éliminer les sels ayant précipités avec l'ARN. Le dernier lavage est réalisé avec de l'éthanol à 100%. Le maximum de surnageant est éliminé après centrifugation pendant 10 minutes à 12 000 g à 4°C. L'ARN est dissous dans 30 µL d'eau RNase-free après séchage du culot à vide pendant 10 minutes. Les ARNtx sont alors conservés à -20°C. La quantité d'ARN est déterminée par un spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000 (Thermo science).

Synthèse des ADNc

Transcription inverse des ADNc

La transcriptase inverse ou RT (pour **r**everse **t**ranscriptase) catalyse la synthèse d'un ADN complémentaire ou ADNc à partir d'un ARN et nécessite une amorce s'hybridant spécifiquement à cet ARN. Les RT sont d'origine virale comme la RT du virus **AMV** pour **A**vian **M**yeloblastosis **V**irus, du **MMLV** pour **M**oloney **M**urine **L**eukemia **V**irus ou du **HIV** **H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus. La transcriptase inverse utilisée pour notre étude est la MMLV, Invitrogen Cat.No.28025-013, à 200 U/ μ L. L'ARN est préalablement chauffé pendant 5 à 10 minutes à 65°C. L'extension ou l'élongation se fait à partir de 1 μ L d'amorce spécifique oligo (dT) qui se lie à la queue poly-A des ARN messagers. Elle se fait en présence de 1 μ L de dNTP 10 mM et de 1 μ g d'ARN totaux. Ce mélange est chauffé pendant 5 minutes à 65 °C puis rapidement refroidi sur la glace. Ensuite, on ajoute 1 μ L de RNasine et 2 μ L de DTT avec 4 μ L de tampon de synthèse 5X du premier brin. Ce mélange est incubé à 37°C pendant 2 minutes, puis 1 μ L de MMLV RT est mélangé par pipetage. La réaction est poursuivie pendant 50 minutes à 37°C. Enfin l'enzyme est inactivée par passage au bain marie à 70°C pendant 15 minutes. L'ADNc obtenu est utilisé pour la PCR ou stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Amplification par PCR à partir des ADNc

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier plusieurs milliards de fois le nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN, même si la quantité initiale est faible. Cette amplification est réalisée grâce à une polymérase et aux amorces dessinées qui encadrent la région à amplifier.

La technique comporte 20 à 35 cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases : **i**) une phase de dénaturation thermique de l'ADN, **ii**) une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques, **iii**) une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces.

Les réactions d'amplification sont effectuées dans un volume final de 25 μ L contenant 1 à 2,5 unités la Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 0,5 μ M de chaque amorce (*Tableau 2*), 200 μ M de chaque dNTP, 60 mM de Tris pH 8,9, 18 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgSO₄ et 100 ng d'ADN.

Les PCR sont réalisées dans un thermo-cycleur GeneAmp 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems). En début de réaction, une période de 2 minutes à 94°C est réalisée pour libérer la Platinum Taq DNA polymérase de l'anticorps qui l'inactive afin de réaliser une "hot start" PCR. Vingt à 35 cycles d'amplification sont réalisés à raison de 30 secondes à 94°C pour la dénaturation, 30 s à une température inférieure de 5-10°C à la T_m des amorces pour l'hybridation et 1 minute par kpb à 68°C pour la polymérisation. De plus, un temps supplémentaire de 7 minutes à 72°C est ajouté à la fin de chaque réaction afin de terminer l'extension des brins d'ADN. L'amplicon obtenu sera visible macroscopiquement sur un gel d'agarose après électrophorèse et coloration (ci-dessous).

Les premiers couples d'amorces utilisés correspondent à l'amplification de l'actine ou du gène protéique ribosomale L19. Ces deux gènes sont considérés comme des gènes de ménage (housekeeping genes) appelés aussi gènes constitutifs. Ils sont exprimés d'une façon plus ou moins identique dans toutes les cellules d'un organisme, ce qui permet de les utiliser comme références pour la quantification relative des ADNc.

Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse

La taille du produit d'amplification obtenu par PCR est vérifiée sur un gel d'agarose 1 % dans du TAE 1% (Tris Acetate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7.65). Avant d'être déposés sur gel, les échantillons sont mélangés avec 0,1V de tampon de charge (**composition**) contenant du bromophénol permettant la visualisation de la migration. Les molécules d'ADN chargées négativement migrent dans le champ électrique vers l'anode en se séparant selon leur taille à travers les mailles d'agarose. Afin de visualiser les fragments d'ADN après électrophorèse, le gel est immergé dans une solution contenant du bromure d'éthidium (BET) à 1µg/µL dans de l'eau distillée. Le BET s'intercale entre les bases des acides nucléiques et émet une fluorescence rouge orange lorsqu'il est excité à 306 nm. La taille ainsi que la quantité sont estimées par comparaison avec un marqueur de taille de type "échelle" de 1kb (Interchim) ou de 100 pb (Biolabs).

Purification des fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose

La purification des fragments d'ADN est effectuée après séparation des fragments dans un gel d'agarose low melting NUSIEVE[®] GTG[®] agarose-BMA (Cat.No.50081) à 1% dans une cuve réfrigérée. L'agarose contenant le fragment d'intérêt est découpé à l'aide d'une lame de scalpel et mise dans un tube de 1,5 mL. Ce tube est chauffé pour dissoudre l'agarose à

65°C pendant 5 minutes puis à 37°C pendant 5 minutes avant de l'utiliser pour la ligation dans le vecteur pGEM-T-Easy.

Clonage des produits PCR

Insertion de l'ADNc dans le pGEM-T-Easy

Le plasmide pGEM-T Easy commercialisé par Promega (Cat.No.A1360) est vendu linéarisé. Il a la particularité de posséder des bases « T » sortantes permettant un appariement direct avec un fragment d'ADN présentant des « A » à ses extrémités et évitent la recircularisation du vecteur. Cette technique est appelée « TA cloning ». En effet, la Taq polymérase possède une activité terminale transférase qui ajoute des A à l'extrémité 3' des produits de PCR.

L'ADN ligase du phage T4 fourni avec le kit pGEM-T-easy catalyse la liaison entre deux molécules d'ADN en formant des liaisons phosphodiester entre l'extrémité 3' hydroxyl de l'une et l'extrémité 5' phosphate de l'autre. La ligation est réalisée dans un volume réactionnel de 10 µL contenant 1 à 3 µL de produit de PCR récupéré sur gel (ci-dessus), 1 µL du vecteur pGEM-T Easy, 5 µL de tampon 2X et 1 µL de T4 DNA ligase. La ligation est effectuée à 4°C pendant une nuit, puis le mélange réactionnel est utilisé pour la transformation des bactéries DH5α ou des JM83.

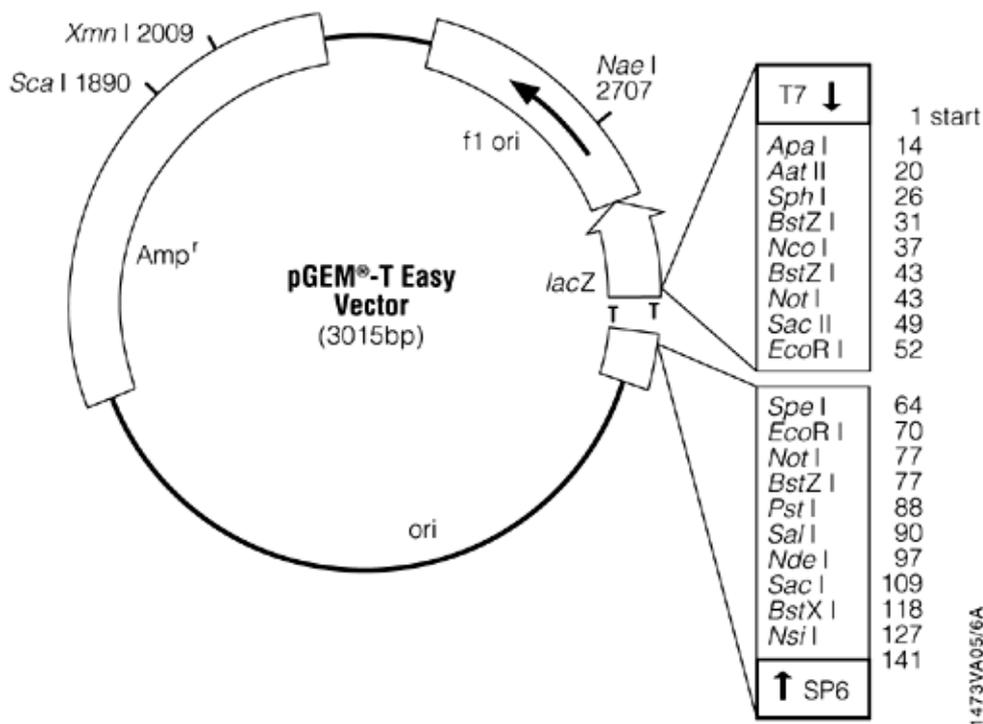


Figure 1. Carte et site de multiclonaage du vecteur pGEM-T-Easy

Bactériologie

Après clonage du fragment d'ADNc dans un vecteur, il faut intégrer ce vecteur recombinant portant l'insert d'ADN exogène dans un micro-organisme comme *Escherichia coli* par exemple, afin d'amplifier le gène qu'il contient. Cette intégration se fait par transformation génétique, en utilisant des bactéries compétentes.

Préparation des bactéries compétentes

Pour les JM83

Pour obtenir des bactéries compétentes, 100 µL de JM83 déjà compétentes sont incubées dans 3 mL de LB préchauffé à 37°C pendant 3 à 4 heures. Les bactéries sont étalées sur des boîtes d'agar avec ou sans la streptomycine (200 µg/mL). Dix microlitres de la solution bactérienne sont étalés par boîte puis sont laissés une nuit à 37°C. Le lendemain une colonie JM83 bien isolée est repiquée pour lancer une pré-culture dans 3 mL de LB. Après 3 heures de culture à 37 °C, la DO à 600 nm est mesurée. A partir de 1 mL de pré-culture, une culture de JM83 est lancée dans 200 mL de LB préchauffé à 37 °C, 250 RPM, pendant 2h. La DO est mesurée au fur et à mesure jusqu'à une DO de 0,375. La culture est arrêtée sur de la glace, puis transmise et incubé 10 min sur glace dans des tubes Nalgene (25 mL/tube). Une centrifugation de 5 minutes à 1600 g à 4 °C et sans décélération a lieu pour récupérer le culot qui est repris dans 5 mL de solution froide de PIPES-CaCl₂ (CaCl₂ 60mM, glycérol bi-distillé 15% v/v, PIPES 10mM, pH 7). Une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 11 000 g à 4°C est nécessaire pour l'apparition des culots en couronne. Ce culot est repris délicatement dans une solution de PIPES-CaCl₂ et incubés 30 minutes sur la glace. Les bactéries sont finalement centrifugées 5 minutes à 11 000 g à 4°C, et repris dans 1 mL/par tube de PIPES-CaCl₂ pour être aliquotées (400 µL) dans des eppendorfs et stockées à -80°C.

Pour les DH5α

Les bactéries DH5α sont rendues compétentes par un traitement au CaCl₂ afin de faciliter la pénétration des molécules d'ADN à travers leur paroi. Les bactéries sont cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance ($A_{600\text{ nm}} = 0,4$) dans du milieu LB, puis refroidies sur de la glace 5 à 10 minutes avant d'être centrifugées 7 minutes à 16 000 g à 4°C (décélération très lente). Le culot bactérien est remis en suspension dans une solution froide et stérile de PIPES-CaCl₂ et centrifugé 5 minutes à 11 000 g à 4°C. Le culot bactérien, en forme de couronne, est repris délicatement dans une solution froide de PIPES-CaCl₂ et incubés 30 minutes sur la

glace. Les bactéries sont centrifugées 5 minutes à 11 000 g à 4°C, repris dans la solution de PIPES-CaCl₂ et stockées à -80°C.

Transformation des bactéries

Après décongélation dans la glace de 100 µL de bactéries compétentes, 10 à 30 µL du produit de ligation sont ajoutés. La suspension est incubée dans la glace 20 minutes avant de subir un choc thermique de 45 secondes à 42°C suivi de 2 minutes dans la glace. Ce choc thermique perméabilise la membrane plasmique momentanément par la formation transitoire de micropores. Les bactéries sont ensuite mises en culture pendant 45 minutes à 37°C, sous agitation, dans 900 µL de milieu LB sans agent de sélection, puis 100 µL de bactéries sont étalées sur boîte LB/agar contenant le/ou les agents de sélection.

Dans le cas des DH5α, les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu LB/agar (32g/l) (Luria Bertani : peptone 140 10g/l, extrait de levure 5g/l et NaCl 10g/l ; Invitrogen) additionné d'ampicilline à 100 µg/mL, de X-Gal à 80 µg/mL et IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) à 0,5 mM. Le gène de résistance à l'ampicilline est porté par le pGEM-T-easy, ainsi seules les bactéries ayant intégré ce plasmide peuvent pousser sur la gélose tandis que le gène LacZ en présence de X-Gal et de l'IPTG permet de différencier les bactéries compétentes ayant intégré le plasmide recombinant de celles ayant intégré un plasmide non recombinant. En effet, l'insertion du produit de PCR a lieu dans le gène LacZ (β-galactosidase ce qui permet la sélection "blanc/bleu". Rendu non fonctionnel dans le cas d'un plasmide recombinant car il est coupé par l'insert, la cellule hôte demeure blanche ; en revanche dans le cas d'un plasmide non recombinant, la colonie se colore en bleu.

Extraction d'ADN plasmidique

La minipréparation est la technique qui va nous permettre d'extraire une petite quantité (100 ng à 5 µg) d'ADN plasmidique provenant des bactéries qui ont subi la transformation. Pour cela, des colonies bien isolées sur les boîtes de pétri sont repiquées dans 3 mL de milieu liquide LB additionné de 100 µg/mL d'ampicilline et incubées à 37°C pendant une nuit. Deux techniques d'extraction d'ADN plasmidique sont utilisées, l'une basée sur la lyse alcaline qui dérive de la technique de Birnboim et Doly, en utilisant le kit « Miniprepération», **MACHEREY-NAGEL** Cat. No.740588.250, utilisée pour purifier l'ADN plasmidique et l'autre est la technique dite de "boiling" utilisée uniquement pour la sélection des clones recombinants.

Purification d'ADN plasmidique avec le kit minipréparation

Le culot bactérien récupéré après une centrifugation d'1 minute à 11 000 g du milieu LB contenant la colonie bactérienne qui a poussé pendant la nuit, est resuspendu dans 250 µL de tampon A1 (Tris-HCl 20 mM, EDTA 10mM, pH8, glucose 50 mM). Les bactéries sont ensuite lysées par 250 µL de tampon A2 (NaOH 0,2 N, SDS 1%). Après un maximum de 5 minutes à température ambiante, l'ADN génomique et les protéines sont précipités par 350 µL de tampon A3 (acétate de sodium 3M, pH 5,5). Le précipité blanc est séparé par centrifugation pendant 10 minutes à 11 000 g à température ambiante. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique, est déposé sur la colonne. Par centrifugation d'une minute à 11 000 g, l'ADN est adsorbé sur la membrane de silice. Un premier lavage par le tampon AW (**composition**) préalablement chauffé à 50°C permet de d'inactiver les endonucléases. Après centrifugation d'1 minute à 11 000 g, la colonne est lavée avec 600 µL de tampon A4. Afin d'éliminer toute trace d'éthanol, deux centrifugations successives ont lieu pendant 1 et 2 minutes à 11 000 g. Enfin, l'ADN est élué de la colonne par addition de 50 µL de tampon d'éluion EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5), puis il est soumis à une centrifugation d'1 minute à 11 000 g.

Extraction d'ADN plasmidique par "BOILING"

La culture est centrifugée à 17 000 g pendant 2 minutes, le culot bactérien obtenu est repris dans 500 µL de STET (Saccharose 8%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, 5% Triton 100X, pH 8,0) et incubé 5 minutes à température ambiante. La libération de l'ADN génomique et plasmidique se fait par lyse des parois bactériennes en ajoutant 50 µL de lysozyme à 10 mg/mL. Afin de dénaturer l'ADN bactérien d'une façon irréversible, ce mélange est porté à ébullition pendant 45 secondes et refroidi aussitôt sur glace. Après une centrifugation de 7 minutes à 17 000 g, le précipité formé (ADN cellulaire et débris) est retiré à l'aide d'un cure-dent.

Le surnageant qui contient l'ADN plasmidique est précipité par addition d'éthanol absolu froid. Une centrifugation de 10 minutes à 17 000 g permet de sédimenter l'ADN qui est lavé par de l'éthanol à 70% pour dissoudre les sels. Les culots sont séchés à l'air avant d'être repris dans 50 µL de TE 1 X (Tris HCl à 10 mM pH 8,0, EDTA à 1 mM pH 8,0). Enfin, le mélange est porté à 65°C pendant 10 minutes afin d'inactiver les DNases potentiellement présentes dans la préparation. La sélection des clones portant le gène d'intérêt se fait par digestion enzymatique de l'ADN plasmidique. En effet, sur un gel d'agarose on choisit les clones ayant la taille calculé après digestion enzymatique.

Maxipréparation d'ADN plasmidique

Ce système assure une méthode rapide, simple et bien efficace pour purifier l'ADN plasmidique en plus grande quantité que les minipréparations pour être directement utilisé. Les ADN plasmidiques sont purifiés à l'aide du kit NUCLEOBOND®XTRA MIDI/MAXI MACHEREY-NAGEL Cat. No .70410.50, selon le même principe que le kit de « Minipreparation » décrit précédemment. L'ADN est solubilisé dans 100 µL TE 1X et repris dans 100 µL TE 1X.

Digestion de l'ADN et insertion dans les vecteurs d'expression

Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction proviennent de bactéries et permettent de cliver l'ADN au niveau d'une séquence spécifique. Les enzymes utilisées ainsi que leurs tampons sont commercialisées par Biolabs (Ozyme). Les digestions d'ADN plasmidique par les endonucléases de restriction sont réalisées en utilisant 2 à 5 unités d'enzyme par µg d'ADN. Les réactions sont effectuées dans un volume final allant de 10 à 100 µL, en présence du tampon de réaction spécifique ou dans le tampon optimal en cas de double digestion. Les réactions sont réalisées pendant 1 h à la température optimale d'action de l'enzyme.

Création de sites de restriction

Une fois que les séquences de gpa2 et de gpb5 sont entièrement sous-clonées dans le pGEM-T-Easy, les plasmides ont été utilisés comme matrice pour les PCR avec les couples d'amorces qui contiennent les sites de restriction correspondants. Ces derniers vont servir pour intégrer les séquences dans les vecteurs d'expression (avec et sans TAG HIS) utilisés dans le labo pour l'expression en système baculovirus/cellules d'insectes. Ceci nécessite l'introduction de la séquence codante dans le génome d'un virus, puis l'utilisation de celui-ci pour infecter les cellules.

Tableau 1. Les différents clones gpa2 et gpb5.

1 ^{ère} étape	Fabrication du plasmide contenant l'ADN d'intérêt. pGEM-T-Easy - GPA2Bt- clone 4 – MP 01/04/2008 pGEM-T-Easy - GPB5Bt- clone 1 et clone 3 – MP 13/02/2008
2 ^{ème} étape	Création de sites de restriction pour insertion dans des vecteurs d'expression pGEM-T-Easy –BamHI GPA2Bt HindIII - clone 13 et clone 14 – MP 10/02 /2009 pGEM-T-Easy - BglII GPB5Bt HindIII - clone 1 – MP 01/ 04 /2008
3 ^{ème} étape	Création de sites de restriction pour insertion dans des vecteurs d'expression avec un TAG HIS pGEM-T-Easy –BamHI GPA2Bt HindIII STOP- clone 2 et clone 3- miniprep31/07/2008. pGEM-T-Easy - BglII GPB5Bt HindIII STOP- clone 6 MP 24/09/2008 et clone 12 miniprep 31/07/2008. pGEM-T-Easy –BamHI GPA2Bt HindIII STOP- clone 2 - miniprep31/07/2008.

Double digestion de l'ADN et des vecteurs d'expression

L'insert amplifié est récupéré par double digestion des plasmides par BglII et HindIII pour gpb5 et BamHI et HindIII pour gpa2 en utilisant 10 U μ L de chaque enzyme. BamHI (g/gatcc) et BglII (a/gatct) donnent des bouts cohésifs qui sont compatibles. La digestion est précipitée à l'Ethanol à 100% pour concentrer l'ADN. Ensuite, l'ADN est déposé sur un gel low melting et récupéré pour être inséré dans un vecteur d'expression digéré aussi par BglII et HindIII.

Les vecteurs utilisés sont le p119 et le p119-His qui sont des vecteurs non commercialisés (Saint Christol – Les Ales) possèdent les sites d'insertion BglII et HindIII. Ils contiennent un promoteur fort, le signal de la polyadénylation et les régions flanquantes du gène tardif de la protéine p10 du baculovirus *Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus ou AcMNPV. La protéine p10 est une protéine qui constitue la totalité de la structure fibrillaire nucléaire et cytoplasmique, dont le rôle serait de favoriser l'éclatement des cellules en fin de cycle.

Le p119-His est un vecteur d'expression qui permet l'obtention d'une protéine recombinante qui possède une queue histidine en C-terminal pour faciliter sa purification par affinité sur une résine d'agarose chargé en nickel.

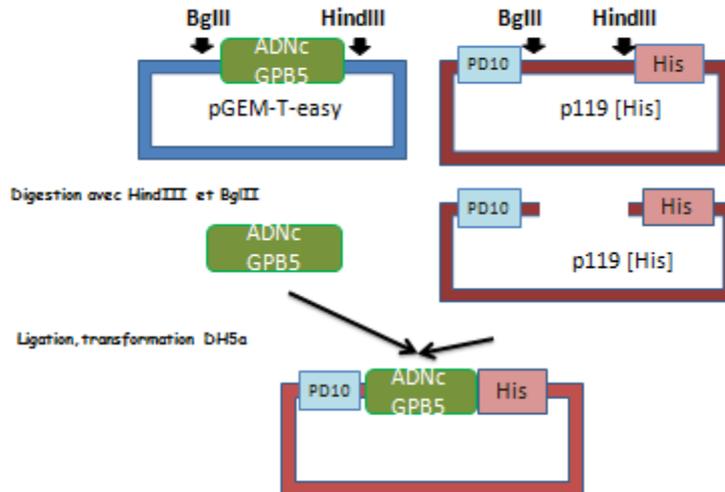


Figure 2. Construction de vecteur d'expression.

Séquençage d'ADN

Le séquençage automatique a été effectué par la Société Genome Express (Grenoble, France). Il est réalisé à partir du plasmide pGEM-T ayant intégré le gène d'intérêt en utilisant les amorces T7 ou Sp6. L'ADN plasmidique est repris dans 100 μL de TE 1X et précipité en présence de 1/10 de ce volume en acétate de sodium 3M ainsi que 2 volumes d'éthanol absolu. Le tout est centrifugé à 20 000 g pendant 20 minutes. Le culot d'ADN est lavé avec de l'éthanol à 70% pour éliminer les sels restants. Après une centrifugation de 5 minutes à 20 000 g, le culot d'ADN est séché sous cloche à vide avant d'être repris dans de l'eau filtrée stérile à une concentration finale de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Les conditions de préparation des échantillons pour le séquençage ont changé en novembre 2009, il fallait préparer un volume minimum de 15 μL pour les plasmides à une concentration de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Synthèse des ribosondes

Les ribosondes sont des séquences nucléiques complémentaires des séquences ARNm recherchés. Ces sondes sont couplées à un marqueur ; la digoxigénine détectable avec des anticorps spécifiques. La digoxigénine présente un avantage comme c'est une molécule d'origine végétale donc pas présente de manière endogène dans les tissus animaux. Une ribsonde d'environ 400 nucléotides de longueur incorpore 16 à 20 molécules de XTP-dioxigénine. Des sondes radioactives peuvent aussi être utilisées mais pour une localisation intracellulaire fine des ARNm elles ont une résolution faible.

L'orientation de la séquence de la sonde doit être antisens par rapport à celle de l'acide nucléique cible. Les sondes ARN simple brin présentent des avantages : elles augmentent l'efficacité de l'hybridation en évitant l'appariement de sondes entre elles (pareil pour les sondes ADN simple brin) et elles augmentent la stringence des lavages ce qui diminue le bruit de fond. Aussi, le traitement par la Rnase A détruit les molécules de sondes d'ARN non hybridés. ci-dessous les différentes étapes nécessaire pour la fabrication des ribosondes.

Fabrication du plasmide contenant l'ADNc d'intérêt

gpa2 et gpb5 sont déjà clonés dans le pGEM-T-Easy qui contient deux promoteurs phagiques en orientation inverse séparé par un polylinker.

Linéarisation du plasmide contenant l'ADNc d'intérêt

Le plasmide est linéarisé par digestion enzymatique entre l'insert (ADNc) et le promoteur non utilisé après établissement de la carte de restriction sur l'ensemble de la séquence.

La linéarisation permet de transcrire seulement la séquence d'intérêt sans les séquences plasmidiques qui peuvent générer de bruits de fond lors de l'hybridation. L'équivalent de 10 µg de plasmide (10 µL) est digéré par 2,5 µL d'enzyme (25 U) dans 10 µL de Tampon 10X (Volume du tampon = 1/10 du volume totale) correspondant à l'enzyme utilisée. Dix microlitres de BSA (1 mg x mL⁻¹) sont ajoutés pour augmenter la stabilité de l'enzyme et pour se lier aux contaminants de la préparation. Le volume total est complété par 67,5 µL d'eau. La digestion se fait pendant 4 h à 37°C.

Purification de l'ADN par QIAquick PCR purification kit

L'ADN digéré est purifié pour se débarrasser des réactifs enzymatiques. Cinq cent microlitres de tampon PB (guanidine hydrochloride et isopropanol) sont ajoutés au volume à purifier (5 Volume PB = 1 Volume ADN digéré) puis déposés sur une colonne QIAquick spin. Le tube collecteur est vidé et remis sous la colonne après centrifugation à 4000 g pendant 1 minute. La colonne est lavée par 500 µL de tampon PE. Le tube collecteur est de nouveau vidé par une même étape de centrifugation. La colonne est finalement déposée sur un tube eppendorf stérile de 1,5 mL pour être élué dans 30 µL d'eau sigma nuclease free. Le plasmide linéarisé et purifié est gardé à 4°C jusqu'à le lendemain pour la suite des expériences.

Synthèse d'ARN par transcription in Vitro

L'ARN polymérase permet de transcrire in vitro la sonde ARN simple brin que ce soit la sonde sens (selon le sens de l'ARNm et sert de contrôle négatif) ou la sonde anti-sens (complémentaire à la séquence de l'ARNm cible codant pour la protéine).

La transcription a lieu au site d'insertion du promoteur et la chaîne en croissance s'allonge dans le sens 5' -> 3'. Une fois l'ARN polymérase arrive au site de coupure enzymatique, elle se décroche et peut servir pour une nouvelle transcription de l'insert. La sonde doit être suffisamment longue pour que l'hybride ARN-ARN soit stable et spécifique et suffisamment petite pour pouvoir pénétrer facilement dans le tissu fixé et accéder à l'ARNm.

Le kit DIG RNA Labelling Mix, 10 X conc. Cat.No.11277073910 est utilisé pour la fabrication de ces sondes marquées à la DIG. Cinq microgrammes (14 µL) de plasmide purifié sont ajoutés à 2 µL DIG labelling mix 10X, 2 µL de Tampon de transcription 10X et 2 µL ARN polymérase correspondante (SP6 ou T7). Le tout est incubé pendant 2h30 à 37°C. Une incubation supplémentaire de 30 minutes à 37°C est réalisée en ajoutant 0,5 µL DNase (10 U/µL). Ce traitement à la DNase est nécessaire pour se débarrasser de l'ADN qui a servi de matrice et du vecteur.

Purification des ribosondes marqués à la DIG

Les ribosondes sont précipitées au chlorure de lithium LiCl 4 M en ajoutant aux produits de transcription, 2 µL de LiCl 4 M (0,1 Volume de LiCl pour 1 Volume de produits de transcription) et 60 µL d'éthanol à 100% (3 Volume éthanol pour 1 Volume de produits de transcription). Le mélange est agité doucement comme les sondes sont fragiles, puis il est incubé à -80°C pendant 30 minutes. Le surnageant est éliminé après centrifugation pendant 30 minutes à 15 000 g à 4°C. Le culot d'ARN est lavé par 50 µL d'éthanol à 70% par tube. Les tubes sont centrifugés pendant 20 minutes à 15 000 g à 4°C. L'alcool est pipeté et les tubes sont laissés à sécher. Le culot est repris dans 30 µL d'eau Nuclease free. L'estimation de la quantité d'ARN est faite sur un nanodrop en mesurant la DO. Une fois la quantité d'ARN est estimé, le produit est aliquoté dans des tubes de 0,2 mL puis conservés à -80°C.

Hybridation sur lame

La technique d'hybridation sur lame consiste à détecter l'ARN messager (ARNm) témoignant la transcription des gènes *gpa2* et *gpb5* dans la préparation histologique.

Cette technique se base sur la complémentarité de deux séquences nucléiques qui sont capables de s'apparier avec une forte affinité en formant des liaisons hydrogène au niveau de bases qui constituent la séquence nucléiques : entre adénine et uracile (thymine pour l'ADN) et entre guanine et cytosine.

Il faut bien immobiliser la cible par fixation du tissu. Souvent la morphologie du tissu est modifiée lorsqu'on essaye d'avoir un signal maximal par une pénétration complète de la sonde dans le matériel biologique. L'hybridation se déroule sur 4 jours.

Premier jour - Préparation des tampons

Les tampons suivants sont préparés et autoclavés : EDTA 0,5 M pH 8,0 ; KPBS 10X pH 7,3 ; SSC 20X ; Tris-HCl 1M pH7,5 ; Tris-HCl 1 M pH 8,0; Tris-HCl 1 M pH 9,0 ; anhydride acétique 0,25 % (242845 Sigma); TEA pH 8,0 (90278 Sigma) ; Tampon RNase A ; Solution de lavage (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,5) ; Tampon d'hybridation (Sulfate de dextrane, SSC 20X, formamide désionisée, denhardtts 50X, ARNt de levure (10109495 Roche) ,ADN de sperm de saumon, Tween 20(91585 Dutscher) ; solution de détection (Tris HCl 1M pH 9,5, MgCl₂ 1 M, NaCl).

Deuxième jour - Prétraitements et hybridation

Les prétraitements ont pour rôle de faciliter l'accès de la sonde à l'acide nucléique. Il existe 4 étapes de prétraitements qui sont assez importants à réaliser avant l'hybridation.

Perméabilisation et Post fixation

La paraffine est dissoute par deux bains successifs de Xylène pendant 10 minutes chacun. Des bains d'éthanol de concentrations décroissantes (100%,96%,80%,70% et 50% pendant 5 min) sont utilisés pour réhydrater le tissu et solubiliser les phospholipides, principaux constituants des membranes cellulaires. L'éthanol est dilué dans du KPBS 1X. Ensuite, une post-fixation par le PAF 4% (F1635 Sigma) pendant 10 minutes permet de fixer les métabolites cellulaires et d'inactiver les RNases endogènes. Une étape finale de lavage par du KPBS 1X est réalisée pendant 5 minutes.

Déprotéinisation et Post-fixation

Lors de la fixation au PAF 4%, les protéines associées aux acides nucléiques sont stabilisées. Un traitement à la protéinase K permet d'éliminer ces protéines et rendre la cible plus accessible surtout dans le cas de tissus inclus en paraffine. C'est une étape à contrôler et à tester pour savoir la durée d'incubation et la concentration de l'enzyme utilisée. D'un coté, une déprotéinisation excessive détériore la morphologie cellulaire et détruit les ARNm cibles et d'un autre cote, une déprotéinisation insuffisante entraine une perte de pénétration de la sonde. Les lames sont incubées pendant 5 minutes avec une solution de 0,05 M Tris HCl de pH 7,5 préalablement chauffé à 37°C à l'étuve et puis les lames sont traitées par 5 µg/mL de protéinase K (P 2308 Sigma) pendant 5 et 15 minutes pour tester les deux conditions. Les lames sont lavées de nouveau par deux bains successifs de 0,05 M Tris HCl de pH 7,5 et de KPBS 1X. Une post-fixation par du PAF 4% dilué dans du KPBS 1X est suivie deux lavages au KPBS 1X pendant 5 minutes.

Acétylation

Le traitement à l'anhydride acétique (AA) permet de fixer un groupement acétyl sur les groupements aminés $-NH_3^+$ de protéines tissulaires, ce qui réduit la fixation non spécifique de la sonde ainsi le bruit de fond est éliminé. Cette étape est utile pour les oligonucléotides. Les lames sont lavées par deux bains respectifs de 0,1 M TEA à pH 8,0 et 0,1 M TEA à pH 8,0 additionné de 0,25 % AA. Ces lavages sont suivis par trois d'autres pendant 5 minutes chacun avec du KPBS 1X.

Préhybridation

Cette étape est aussi importante pour diminuer le bruit de fond et saturer les sites non spécifiques. Elle consiste à saturer les coupes avec le tampon d'hybridation sans la sonde que ce soit à température ambiante ou à la température d'hybridation.

Le tampon d'hybridation est formé des composants suivants :

Le sulfate de dextrane (D 8906 Sigma) : Le sulfate de dextrane possède de nombreuses applications. Il peut être utilisé comme un accélérateur pour diminuer le temps d'hybridation de la sonde. Il peut être ajouté dans le tampon d'hybridation lors de la détection de séquences rares et quand la quantité de la sonde est limitée. Il augmente la concentration de la sonde en excluant l'acide nucléique du volume de la solution. Il occupe la place comme étant un polymère.

Il est difficile dissoudre. Il est stocké à -20°C.

Le tampon SSC 20X Les hybrides vont se former à des pH voisins de la neutralité en présence d'ions Na⁺. L'ion Na⁺ est l'ion principal intervenant dans la concentration en cations (force ionique) sur laquelle on agit pour abaisser la T_m (température de fusion). Sa concentration est le facteur capital de la stabilité de l'hybride et intervient directement sur la constitution de celui-ci. Plus la force ionique de la solution est élevée plus l'hybride est stabilisé t_m élevée.

La Formamide désionisée (091531 Dutscher) est utilisée pour maintenir le pH du tampon pour diminuer la température d'hybridation permettant la réalisation de l'hybridation dans des conditions moins agressives pour la morphologie du tissu.

La solution de Denhardt (D 2532 Sigma) est constituée par un mélange d'agents bloquants. La solution contient du Ficoll 1% (type 400), du polyvinylpyrrolidone et de BSA 1%.

ARNt et ADN de sperm de saumon (D 9156 Sigma) Les ARNt et les fragments d'ADN permettent de saturer les sites de liaisons non spécifiques.

Eau DEPC (95284 Sigma) On parle d'eau DEPC pour désigner l'eau ayant subi un traitement par le diéthyl pyrocarbonate (DEPC) 0.1% (v/v) pendant 12h à température ambiante pour inhiber les ribonucléases. Le DEPC est ensuite éliminé par autoclavage.

Les lames sont séchées avec un papier absorbant sans toucher aux coupes qui sont entourées avec du super pap-Pen (**008899 Invitrogen**). L'incubation avec 250 µL de tampon d'hybridation pendant 2 heures se fait dans une chambre humide préparé avec du SSC 5X et à température ambiante.

L'hybridation est réalisée en incubant les coupes avec la sonde marquée en présence du tampon d'hybridation à une température permettant une hybridation spécifique. Il faut dénaturer les sondes pour s'assurer qu'elles sont en simple brin.

Il existe plusieurs facteurs dont la stabilité cible-sonde va dépendre :

- 1- La température-l'hybride est déstabilisé de plus en plus avec l'augmentation de la température.
- 2- Les hybrides ARN-ARN (notre cas) sont beaucoup plus stable qu'entre deux ADN ou entre un ARN et un ADN.
- 3- La longueur de l'hybride : plus elle est grande, plus l'hybride est stable (T_m élevé).
- 4- La richesse en GC: plus elle est élevée, plus l'hybride est stable, trois liaisons H au lieu de deux.

5- Le taux de mésappariements: plus il y a des mésappariements plus l'hybride est déstabilisé. Dans notre cas on ne prend pas compte de ce facteur comme la séquence nucléotidique de la sonde est exactement complémentaire à celle de la cible.

6- Le pH de la solution : on ne fait pas varier le pH des solutions utilisées pour l'hybridation, leur pH est toujours proche du pH physiologique.

7- La force ionique : plus elle est élevée, plus l'hybride est stabilisé. (T_m élevé).

8- La présence de formamide : plus sa concentration est élevée, plus l'hybride est déstabilisé (T_m faible).

Les sondes DIG-AP-cRNA sont préparées dans le tampon d'hybridation pour avoir 400 ng. Ce mélange est chauffé sur un bloc chauffant pour 5 minutes à 80°C puis placée directement sur glace. Les lames sont incubées avec 250 μ L par coupes une nuit à 60°C dans la chambre humide.

Troisième jour - Post-hybridation et immunohistochimie

Cette étape est caractérisée par des lavages successifs pour éliminer les hybrides non spécifiques et l'excès de sonde non hybridés. Ces lavages sont réalisés dans des conditions très strictes de stringence élevée : ainsi seuls les hybrides spécifiques et stables persistent. Dans la pratique, des bains de concentration décroissante en tampon SSC sont utilisés avec des températures croissantes. Les lames sont donc lavées pendant 30 minutes à température ambiante avec du SSC 5X, ensuite pendant 15 minutes à 60 °C avec du formamide 30 % dilué dans du SSC 5X. Deux lavages successives pendant 15 minutes chacun à 60°C avec du SSC 0,2 X sont réalisées avant de laisser le bain du dernier lavage se refroidir sur la paillasse. La post hybridation est terminée par un dernier bain au SSC 0,2 X pendant 5 minutes à température ambiante.

Traitement RNase

Encore une étape pour diminuer le bruit de fond. La RNase A va dégrader toutes les molécules de sonde non hybridés. Le traitement à la RNase doit se faire dans une autre chambre de travail. Les lames sont incubées pendant 30 minutes à 37°C par 500 μ L du mélange suivant : 2,5 μ L Rnase 5mg/mL + 5 μ L Tris-HCl 1 M pH 7,5 + 492,5 μ L eau distillé. Les lames sont ensuite lavées à 37°C pendant 5 minutes avec du tampon RNase, à température ambiante avec du SSC 0,2 X pendant 30 minutes, deux fois de suite et pendant 5 minutes avec la solution de lavage. Les coupes sont saturées pendant une heure avec la

solution de blockage avant d'être incubées dans la chambre humide, une nuit à 4°C, avec du Sheep anti-DIG au 1/2000 dilué dans la solution de blockage.

Quatrième jour - Révélation – Réaction phosphatase alcaline

L'utilisation de la phosphatase alcaline est la technique la plus sensible pour l'hybridation in situ avec des sondes froides, la peroxydase et les marqueurs fluorescents étant d'une sensibilité moindre. Les chromogènes utilisés avec la phosphatase alcaline sont le NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) et BCIP (5 -Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt). La réaction avec NBT-BCIP donne des précipités bleu insolubles dans l'eau (oxydation du BCIP et réduction du NBT) mais soluble dans l'éthanol. Ainsi, pour monter les lames, il est préférable d'utiliser un montage aqueux de type Moviol.

La phosphatase alcaline étant présente dans les tissus biologiques (enzyme extraite de l'intestin de veau), il faut inhiber son activité endogène par le levamisole. Les lames sont lavées trois fois de suite avec la solution de lavage pendant 5 minutes et une fois avec la solution de détection. pour révéler, 500 µL du mélange suivant est déposée par lames : 45 µL NBT + 35 µL BCIP + 50 µL Levamisole 100 mM + 10 mL solution de détection. La réaction a lieu à l'abri de la lumière, une nuit à 4°C. La réaction est arrêtée avec le tampon Stop reaction avant que les lames soient montées avec du Moviol.

Technique de Biochimie

Purification et isolement des protéines

Les étapes de la purification

La purification a nécessité plusieurs étapes comme toute purification allant d'une extraction initiale à une précipitation différentielle ou fractionnée à une dialyse et à divers types de chromatographies. La pureté de la purification de la protéine est évaluée qualitativement par électrophorèse sur un gel d'acrylamide, ainsi le nombre de protéines contaminantes est suivi au fur et à mesure du processus de la purification pour arriver à une seule protéine.

Homogénéisation du matériel

La première étape se résume par l'homogénéisation du matériel dans du sulfate d'ammonium 0.15 par un blender. Pour cela, les échantillons sont coupés en petits morceaux, puis broyés dans un blender. L'homogénat obtenue est clarifié par centrifugation pendant 30 minutes à 3 000 g à 4°C pour éliminer les grosses particules peu ou mal broyées.

Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Une des méthodes les plus adaptés aux grands volumes est la précipitation fractionnée ou précipitation différentielle au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Une méthode peu spécifique mais qui permet de se débarrasser des gros contaminants et préserve généralement l'intégrité fonctionnelle des protéines au contraire de la précipitation totale. Le sulfate d'ammonium est très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il est très hydrophile et entre en compétition avec les protéines pour l'eau causant leur déshydratation. Il possède l'avantage de peu dénaturer les protéines et permet de maximiser l'obtention de protéines biologiquement actives. Son addition se traduit par une augmentation du volume de la solution. La technique consiste à ajouter progressivement une masse donnée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, jusqu'à avoir un certain pourcentage de saturation.

Pour déterminer la quantité à ajouter, le tableau présent à la page suivante est utilisé. Il existe aussi un site Web (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>) où les données de base

sont rentrées comme le volume, la température et le pourcentage initial de saturation et par suite le site calcule automatiquement la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter.

Les différentes fractions de protéines obtenues sont nommées P25, P50 et P80 ce qui correspond à 25, 50 et 80% de saturation en sulfate d'ammonium. Le surnageant de la dernière fraction est gardé et il est nommé S80. La protéine qu'on cherche se trouve dans l'une de ces fractions P25, P50, P80 ou S80.

Tableau 2. Quelle quantité de sulfate d'ammonium, faut-il ajouter ?

		Per Cent Saturation Final Concentration of Ammonium Sulfate																			
		10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Per Cent Saturation Initial Concentration of Ammonium Sulfate	10		28	57	86	118	137	150	183	216	261	288	326	365	406	449	484	540	592	640	684
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619	669
	30				18	30	62	94	127	162	198	235	273	314	358	401	449	496	546	596	646
	35					31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506	554	604	654
	45						31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469	519	569	619
	55							33	66	101	137	178	219	264	312	362	414	469	524	579	634
	65								34	68	103	141	179	220	264	312	362	414	469	524	579
	75									34	70	107	147	190	232	275	320	369	419	469	519
	85										36	74	115	156	198	242	289	339	389	439	489
	95											39	77	118	161	204	250	299	349	399	449



PLbiochemicals, inc.
1037 WEST MCKINLEY AVENUE, MILWAUKEE, WIS. 53205

Dialyse et/ou passage sur PD10

Les différentes fractions qu'on a récupéré contiennent encore une grande quantité de sulfate dont il faut se débarrasser. La méthode qui correspond aussi à un grand volume est la dialyse. Les protéines à dialyser sont séparées par une membrane poreuse (**Reference**) d'une autre solution où la concentration du sel est différente. Les sels auront tendance à équilibrer leur concentration de part et d'autre de la membrane. On peut changer rapidement la teneur en sel dans la solution protéique en utilisant un volume de dialyse beaucoup plus grand que celui de

la solution. S'il s'agit de petit volume, des colonnes PD10 (Reference) sont utilisées pour charger 2,5 mL d'échantillon et dessaler avec 3,5 mL de tampon correspondant.

Chromatographie d'interaction hydrophobe Phényl-Sepharose

Cette étape est suivie par une chromatographie d'interaction hydrophobe. Le gel de chromatographie d'interaction hydrophobes porte un groupement hydrophobe ; un noyau phényl à l'extrémité d'une chaîne carbonée. Les protéines se lient avec une affinité variable aux groupements hydrophobes portés par le gel (Phényl-Sepharose) et la séparation des protéines se fera en fonction de leur hydrophobicité. Ensuite, elles sont éluées en diminuant la concentration des sels (1, 0,5 et 0,2 et 0 M sulfate d'ammonium dans de l'hydrogénocarbonate d'ammonium) et en augmentant la concentration d'un solvant moins polaire que l'eau (50% Ethylène Glycol). Les fractions sont éluées dans à 0,2 M et 0M sulfate d'ammonium. Ces deux fractions sont mélangées, dialysées contre l'eau déminéralisé à 4°C pendant la nuit, puis lyophilisées et dessalées sur une colonne de Séphadex G25 dont la capacité de fractionnement est entre 1 et 5 KDa (Reference) pour se débarrasser du sulfate d'ammonium restant. La détection des protéines en sortie de colonne est effectuée par un spectrophotomètre (Hitachi, U200) à 280 nm. Le pic de protéines est récupéré, lyophilisé et caractérisé.

Chromatographie d'exclusion

La dernière étape de purification est par chromatographie d'exclusion sur une Séphadex HR75 (reference) pour se débarrasser de la légère contamination d'une part des protéines de hauts poids moléculaires et d'autres part par d'autres protéines de petits poids moléculaire.

Analyse des protéines

Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Le principe de l'électrophorèse monodimensionnelle en présence de dodécyl sulfate de sodium ou SDS est de séparer un mélange protéique par la migration de ces constituants sous l'effet d'un champ électrique. La séparation des protéines se fait en fonction de leur poids moléculaires. Le SDS, détergent anionique, confère à la protéine une charge électrique constante, largement supérieure à la charge intrinsèque de la protéine.

Les échantillons sont préparés dans un tampon de charge (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2%, glycérol 10% (V/V), bleu de bromophénol 0,02%) (Laemmli, 1970) dans des

conductions réductrices (tampon de charge avec du β -mercaptoethanol 5% et chauffage à 100°C pendant 10 minutes) ou non. Le β -mercaptoethanol dissocie les ponts disulfures en réduisant les liaisons disulfures. Le glycérol confère aux échantillons une forte densité, les mettant en contact avec le gel et leurs permettant de ne pas se diluer dans le tampon lors du dépôt.

Un gel de polyacrylamide s'obtient par polymérisation de monomères d'acrylamide. Cette polymérisation est initiée chimiquement par le persulfate d'ammonium combiné au TEMED. L'objectif du gel d'électrophorèse en deux parties est de pallier aux problèmes liés aux faibles quantités de protéines et aux volumes parfois non négligeables déposés dans les puits. On réalise donc une étape de concentration des échantillons jusqu'à l'obtention de zones protéiques très fines dans le gel de concentration (stacking gel), qui migreront dans le gel de séparation (resolving gel).

Tableau 3. Composition des gels d'électrophorèse monodimensionnelle.

Produit	Gel de Concentration	Gel de Séparation
% Acylamide	5%	15%
Tris-HCl pH 6,8	1,25 mL
Tris-HCl pH 8,8	...	4 mL
Acrylamide 30/Bis 0,8	1,67 mL	10 mL
H₂O milliQ QSP	10 mL	20 mL
SDS 10% Biorad	100 μ L	200 μ L
Persulfate 10 %	100 μ L	200 μ L
TEMED	10 μ L	20 μ L

La migration des échantillons est réalisée à voltage constant de 150 Volts pendant 80 minutes dans un tampon de migration composé de Tris-glycine pH 8,6 et de 0,1 % de SDS (V/V).

Electrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide (2D-PAGE)

Cette méthode très résolutive permet de séparer un mélange complexe de protéines selon leurs pH isoélectrique pendant l'isoelectrofocalisation ou IEF (dans un gradient de pH de 3.5-4 à 9-9.5) puis une deuxième séparation selon leurs tailles moléculaires pendant la SDS-PAGE (de 10 à 200 kilodalton). Deux cents microgrammes de protéines sont déposés sur gel. Pour la première séparation des ampholytes (pH 3,0 -10,0) sont ajoutés au gel d'acrylamide (strips de 7 cm). La focalisation nécessite deux phases distinctes :

Phase 1 : 700 V, 20 mA, 1Watt jusqu'à 10000Volts/heure pendant 20 heures

Phase 2 : 3000V, 20mA, 1Watt jusqu'à 2000Volt/heures pendant 2 heures.

L14a deuxième dimension est réalisée sur un gel de 10-20% d'acrylamide (14*16cm*1.5mm) à 40 mA. Les protéines sont ensuite révélées différemment selon le besoin.

Révélation des protéines sur gel

Deux types de coloration ont été utilisés pour visualiser les protéines séparées par électrophorèse selon la sensibilité désirée : La coloration au bleu de coomassie et la coloration au nitrate d'argent. On peut aussi les colorer après transfert sur membrane : La coloration au rougeponceau.

La coloration au bleu de Coomassie

Le gel est incubé pendant 2 heures dans une solution contenant 0,4% (P/V) de bleu de Coomassie R250 (Sigma, B0149), 20 % d'isopropanol (CarloErba, 309501) et 10% d'acide acétique (ProLabo, 20102.298). Le gel est ensuite décoloré dans une solution de 10% d'isopropanol et 10 % d'acide acétique. Les bains de décoloration sont renouvelés sur du charbon actif autant de fois que nécessaire.

La coloration au nitrate d'argent

La révélation au nitrate d'argent est 10 fois à 100 fois plus sensible que la révélation au bleu de Coomassie. Une fois les protéines sont séparées par électrophorèse, les gels sont fixés pendant 30 minutes dans une solution de fixation (50% éthanol, 12 % acide acétique glaciale, 0,5% de formaldéhyde 37% (p/V) ajouté extemporanément), lavés 3-4 fois dans de l'éthanol 50 % pendant 2 minutes et puis post-fixés dans du thiosulfate de sodium 0,2% pendant 2 minutes. Les gels sont ensuite rincés 3-4 fois dans de l'eau milliQ et colorés dans une solution de nitrate d'argent contenant 0,75% de formaldéhyde ajouté extemporanément. Quelques rinçages rapides avec de l'eau mQ sont suivis d'une révélation par incubation des gels dans une solution de Carbonate de sodium à 0,5 M contenant 2% de formaldéhyde 37% et 4% de thiosulfate de sodium. La réaction est arrêtée avec une solution de 10% d'acide acétique-Eau. Si les protéines sont à récupérer pour la spectrométrie de masse, le formaldéhyde est exclu.

Immunodetection des protéines par Western Blot

Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose

Les gels d'électrophorèse sont transférés sur des membranes de nitrocellulose renforcées 0,22(reference) dans un tampon de transfert contenant du Tris-Glycine (Amresco) et d'isopropanol (CarloEbra). Le transfert peut durer de deux heures jusqu'à une nuit à 4°C à un ampérage de 150 mA.

Immunblot

Les membranes de nitrocellulose sont colorées avec une solution diluée au 1/10 de rouge ponceau concentré (Sigma). Ensuite, elles sont rincées avec de l'eau déminéralisée et sont saturées avec du TBS-Tween-Lait

Dosage des protéines

En générale, les étapes de purification doivent être suivies par un dosage pour vérifier si les techniques utilisées sont bien fonctionnelles. Deux méthodes ont été utilisées, la méthode BC assay, qui est un dosage colorimétrique des protéines ou l'Elisa qui est basée sur la détection immunoenzymatique du complexe antigène-anticorps.

BCassay

Cette technique est basée sur la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines dans un milieu alcalin où l'acide bicinchoninique chélate les ions Cu^+ avec une très forte spécificité pour former un complexe soluble coloré en violet. On peut analyser plusieurs échantillons en même temps comme la réaction est suffisamment lente. La réaction est mesurée par l'absorbance du complexe Cu^+ final à une longueur d'onde de 562 nm. Le protocole du kit BC Assay (Uptima, Interchim) est utilisé.

Elisa

Le principe de l'Elisa repose sur la détection immunoenzymatique du complexe antigène-anticorps formé en utilisant un anticorps spécifiques de la protéine à doser.

Elisa compétition

L'antigène est absorbé sur la plaque. L'antigène à doser est ajouté avec l'anticorps spécifique. Ainsi la compétition se fait entre l'antigène fixé et l'antigène à doser. (Voir matériel et méthodes, article V).

Elisa sandwich

Cette fois c'est l'anticorps spécifique qui est fixé sur la plaque. Il permet de capter l'antigène à doser. Un deuxième anticorps est utilisé pour reconnaître le complexe formé par le premier anticorps-antigène formé. Ce deuxième anticorps sera reconnu par un anti-anticorps couplé à la peroxydase par exemple qui va hydrolyser son substrat. La quantité de substrat hydrolysé est liée à la quantité d'antigène présent dans le puits à doser.

Immunodétection par immunohistochimie

Préparation des échantillons

Préparation et inclusion des testicules bovins en paraffine

Les testicules sont récupérés sur des animaux de 2 ans de l'abattoir et sont découpés rapidement sur place sur un papier aluminium en petits morceaux (1x2 cm avec des surfaces de coupures lisses sans coups de pince ni déchirures). Les morceaux sont plongés immédiatement dans des piluliers contenant 10 mL de fixateur en veillant à ce qu'ils n'adhèrent ni au fond ni aux parois des piluliers. Le fixateur utilisé est le paraformaldéhyde 4% RNase-free (PAF 4%)*, préparé la veille du prélèvement. Une fois dans le laboratoire, il est laissé à fixer toute la nuit à 4°C dans du PAF à 4% renouvelé. Cette étape permet de figer la structure des tissus et d'immobiliser les antigènes in situ pour qu'ils ne soient pas élués par les différents bains réactionnels. Le lendemain, les morceaux sont immergés dans des solutions d'éthanol en concentrations croissantes pour l'élimination complète de l'eau. Les morceaux sont au début déshydratés dans 50% d'éthanol deux fois pendant 30 minutes, puis immergés dans 70% d'éthanol pendant deux heures, suivis d'une heure dans de l'éthanol à 90% , puis 95 % et finalement trois fois pendant 20 minutes dans de l'éthanol à 100%. Les morceaux sont ensuite immergés dans un mélange butanol-éthanol (v/v) pendant une heure avant immersion la nuit à 4°C dans du butanol pur. Le butanol est un déshydratant lent qui permet moins de rétrécissement et plus de durcissement. Le troisième jour, le bain de butanol est changé puis laissé pendant deux heures à température ambiante. Toutes les étapes précédentes sont réalisées sous la hotte. Les morceaux sont ensuite plongés dans un mélange butanol-paraffine (v/v) pendant trois heures à 56°C. Ce mélange est préparé la veille et gardé à 56°C. Finalement, les échantillons sont transférés dans de la paraffine fondue pendant trois heures avant d'être transférés dans un dernier bain de paraffine pendant la nuit à 56°C. Le quatrième jour, les échantillons sont inclus dans des moules en inox et sont

laissés une nuit à température ambiante. Le cinquième jour, les coupes de 5 μM d'épaisseur sont réalisées par un microtome à température ambiante. Les coupes sont fixées sur des lames superfrost pour éviter le décollement des tissus. Les lames sont séchées à 37°C pendant une nuit.

Préparation des spermatozoïdes bovins et porcins : Fixation sur lame par cytocentrifuge

La cytocentrifuge par cytospin3 permet de déposer les spermatozoïdes en monocouche dans une zone définie sur la lame par force centrifuge. Cent microlitres de spermatozoïdes dilués sont déposés par pipette dans un cytofunnel qui sera attaché à une lame par une bride de blocage en acier. La centrifugation est faite pendant 5 minutes à 150 g avec une accélération au maximum. Les lames sont séchées une minute à l'air, puis immergés 10 minutes dans du PAF 4% pour une meilleure fixation.



Figure 3. Un cytofunnel.

Les spermatozoïdes bovins

Les spermatozoïdes congelés sont conservés dans des paillettes de congélation de l'ordre de 12 millions par mL. Ils ont été collectés le 02/05/2006 de Rio Bravo, un taureau « Limousin ». Ils ont été fournis par Christine Perrou. Les spermatozoïdes sont décongelés à 35 °C pendant 30 secondes puis lavés par un gradient de Percoll (90%-45%) par centrifugation à 700 g pendant 20 minutes. Les spermatozoïdes mobiles sont collectés du fond des tubes dans la fraction de 90 % de Percoll. Ils sont ensuite lavés dans 6 mL du milieu STL* par centrifugation à 100 g pendant 10 minutes. Pour les expériences, le culot est repris et dilué dans du milieu STL et les spermatozoïdes sont prêts pour être fixés sur lames. Par contre pour les spermatozoïdes capotés, une incubation avec de l'héparine (1V/100V milieu FIV*) est réalisée dans l'étuve pendant 4h à 38 °C, 5% O₂ avant d'être centrifugé à 100 g pendant 10 minutes.

Les spermatozoïdes frais sont fournis par Olivier Gérard de l'UNCEIA, 5 mL de la semence tamponnée dans 5 mL de HEPES*. Dès la réception de la semence, 1 mL est lavé avec du PBS 1X par centrifugation 100 g pendant 4 minutes. Le culot est dilué dans du PBS 1X et les spermatozoïdes sont fixés sur lame par cytocentrifuge.

Les spermatozoïdes porcins

Les paillettes sont décongelés dans le bain Marie à 37°C pendant 20 secondes puis vidées dans 10 mL de milieu BTS* pour les laver. Le culot est récupéré après centrifugation pendant 10 minutes à 100 g à température ambiante pour être laver de nouveau par un gradient de Percoll (45-90). Le culot est récupéré après centrifugation pendant 30 minutes à 700 g puis repris dans 4 mL de milieu TBM* avec ou sans caféine pour avoir des spermatozoïdes capacités ou non capacités. Les spermatozoïdes sont lavés par centrifugation pendant 10 min à 100 g pour se débarrasser du reste de Percoll. Le culot est dilué dans du PBS 1X et les spermatozoïdes sont fixés sur lame par cytocentrifuge soit dans du PAF 4% pour immunomarquage en suspension.

Les spermatozoïdes frais sont fournis par Christophe Staub de l'UEICP de l'INRA de Nouzilly, 80 mL de la semence tamponnée dans du BTS. Dès la réception de la semence, 1 mL (25×10^6 spermatozoïdes) est lavé avec du PBS 1X par centrifugation 100 g pendant 4 minutes. Le culot est dilué dans du PBS 1X et les spermatozoïdes sont fixés sur lame par cytocentrifuge.

Protocoles d'immunohistochimie

Plusieurs protocoles ont été suivis suivant le type de tissus utilisés.

Immunofluorescence en suspension

Sur les spermatozoides

Les spermatozoïdes sont préparés de la même façon décrite dans les paragraphes précédents mais au lieu d'être fixés sur lames, les 0,5 mL de spermatozoïdes dilués sont fixés dans 0,5 mL de PAF 4% dans un tube eppendorf. Le tube est agité (vortexé) et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant contenant le PAF est éliminé par centrifugation pendant 3 minutes à 500 g. Le culot est resuspendu dans du 1 mL PBS 1X puis séparé en 0.5 mL dans deux tubes. Un tube qui servira de contrôle et un autre pour la réaction.

La membrane des spermatozoïdes est perméabilisée par 0.5 mL de Triton X100 pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant contenant le Triton X100 est éliminé par centrifugation pendant 3 minutes à 500 g. Le culot est resuspendu dans 0.5 mL de PBS + BSA 2% pour saturer les sites aspécifiques. Après une heure, le surnageant est éliminé par centrifugation pendant 3 minutes à 500 g. Le culot est repris 0.5 mL d'anticorps primaire anti-PEBP au 1/1000 (dilué dans du PBS 1X + BSA 2%) pendant 60 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé par centrifugation pendant 3 minutes à 500 g. Une étape de lavage est nécessaire pendant 3 minutes à température ambiante pour éliminer l'anticorps primaire excédentaire. Le surnageant est éliminé par centrifugation pendant 3 minutes à 500 g et le culot est repris dans 0.5 mL d'anticorps secondaire anti-IGY de poule couplé à un fluophore 547 ou 477 pendant 60 minutes à l'abri de la lumière. Le surnageant est éliminé par centrifugation pendant 3 minutes à 500 g et le culot est suivie d'une étape de lavage comme celle d'avant pour éliminer l'anticorps secondaire excédentaire. Le surnageant est éliminé par centrifugation pendant 3 minutes à 500 g et le culot est repris dans 0.5 mL de PBS 1X. Deux gouttes de 8 µL sont déposées sur la lame, la lamelle est montée en appuyant légèrement pour essayer d'avoir les spermatozoïdes dans le même plan focal et finalement la lamelle est fixée au vernis à ongles.

Sur les blastocystes bovins

Les blastocystes au 7^{ème} jour de développement sont issus d'une fécondation *in vitro* et fournis par Leslie Angulo.

Dans un premier temps, les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur lames (même protocole que pour les spermatozoïdes) mais les embryons se décrochaient de la lame et étaient donc perdus pendant les étapes de lavage. C'est pourquoi, les expériences ont été par la suite effectuées en suspension dans des boîtes de 96 puits à base arrondie et sous loupe binoculaire. Le transfert des embryons de puits en puits nécessite l'utilisation d'une seringue Hamilton. Le premier jour, trois lavages de dix minutes dans du PBS 1X + BSA 0.1% + Tween 0.05% sont effectués. Les embryons sont ensuite perméabilisés dans du PBS 1X + Triton 0.1 % (15-30-45 minutes). La saturation des sites non spécifiques est faite dans du PBS 1X + Sérum de cheval 10% pendant 2 heures. Les embryons sont incubés toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-PEBP au 1/1000 toute la nuit. Le lendemain, quatre lavages de 30 minutes chacun sont réalisés dans du PBS 1X + BSA 0.1% + Tween 0.05 % afin

d'éliminer l'anticorps excédentaire. Puis, ces embryons sont incubés pendant 2 heures avec l'anticorps secondaire anti-IGY poule couplé au fluorophore 547 au 1/2000. Ils sont ensuite lavés 4 fois dans du PBS 1X + BSA 0.1% + Tween 0.05 %. Le montage des lames se fait dans du Mowiol additionné de Hoechst (1µg/µl) pour marquer l'ADN.

Immunohistochimie et immunofluorescence sur lames (a revoir)

Les coupes congelées sont lavées deux fois dans du PBS 1X pendant 5 minutes et puis saturées pendant 60 minutes dans une solution de PBS 1X + Triton X100 0.2 % + lait 0.5%. Elles sont ensuite incubées avec l'Anti-PEBP (1/1000 dilué dans du PBS 1X + Lait 0.5 %) toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-IGY de poule couplé au fluorophore 547 au 1/1000 après être lavées 3 fois dans du PBS 1X + Triton X100 0.2% (10 minutes/lavage). finalement, les lames sont lavées comme précédemment et montées dans du vectashield additionnée de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) pour marquer l'ADN.

Les lames sont déparaffinées dans deux bains successifs de toluène pendant 3 minutes. Elles sont réhydratées dans des bains d'éthanol de concentrations décroissantes de 100%, 95%, 70%, 50% pendant 3 minutes chacune. Les lames sont lavées dans des bains de PBS 1X* pendant 2 minutes, puis elles sont incubées dans du peroxyde d'hydrogène 0.3% dans du PBS 1X (v/v préparé extemporanément) pendant 15 minutes pour inhiber l'activité peroxydase endogène. Les lames sont encore une fois lavées dans du PBS 1X + Tween 0.1% (v/v) pendant 5 minutes. Une dernière étape de lavage avec du PBS 1X + Tween 0.1% + triton X100 0.1 % (v/v) est nécessaire pour perméabiliser les coupes. Les sites aspécifiques sont bloqués par de la BSA 2% (W/V) pendant une heure. Les coupes sont incubées avec le premier anticorps (anti-PEBP au 1/1000 ou autre) la nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont lavées 3 fois dans du PBS 1X + Tween 0.1 % pendant 10 minutes puis incubées avec l'anticorps secondaire (anti-IgY de poule produit chez l'âne couplé à la peroxydase au 1/1000 ou autre) pendant 1 heure à température ambiante. Finalement les lames sont lavées 3 fois dans du PBS 1X + Tween 0.1 % pendant 10 minutes avant que la réaction soit révélée avec du diaminobenzidine ou DAB. La réaction est par la suite arrêtée dans de l'eau déminéralisée. Les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline, réhydratées dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes et montées en depex (référence).

Au début des expériences, une étape de démasquage des antigènes est réalisée juste avant l'étape du traitement des peroxydases endogènes. Ce traitement nécessite un chauffage des lames dans un tampon de démasquage à base de citrate pour améliorer l'intensité des marquages sur les coupes en paraffine. Par contre quand les expériences sont réalisées sans démasquage, le marquage attendu est plus spécifique.

Le protocole d'immunohistochimie appliqué sur les coupes de testicules en paraffine est utilisé pour l'immunohistochimie sur les spermatozoïdes fixés sur lames avec la seule différence que les lames ne sont pas déparaffinées ni hydratées. Dans le cas de l'immunofluorescence, l'anticorps secondaire est remplacé par un anti-IgY de poule couplé à un fluophore 547 ou 477 et l'incubation se fait à l'abri de la lumière. Les lames sont ensuite colorées au DAPI, qui est une molécule fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN, pendant 2 minutes. Enfin, les lames sont lavées dans de l'eau déminéralisée, séchées dans l'étuve à 37°C avant d'être monté en Fluoromount, un milieu de montage anti-fading.

Acquisition des résultats

Les photos sont prises au microscope AXIOPLAN Zeiss avec les objectifs 10, 20 et 40X avec les filtres correspondants dans le cas d'un anticorps secondaire couplé à un fluophore.

Conclusion et perspectives

Nous ne présentons pas ici les discussions de chacun des articles présentés au chapitre résultats.

Les circonstances et les aléas de notre travail nous ont conduite à l'obtention de ces résultats qui nous apparaissent intéressants mais ne forment pas un ensemble homogène. Néanmoins, je souhaiterais tirer ici un certain nombre de conclusions et envisager quelques perspectives pour valoriser les travaux effectués.

En ce qui concerne GPA2 et GPB5 ; l'expression de GPB5-His en système baculovirus-cellules insectes a été finalement réalisé au sein de l'équipe (mais trop tardivement pour la thèse) et les résultats concernant la structure de GPB5 deviennent disponibles petit à petit. GPB5-His a été purifiée sur une colonne Ni-NTA. Une fois purifiée, elle est passée sur une colonne Sephadex HR75 relié à une HPLC. La GPB5 récupérée est utilisée pour la fabrication des anticorps anti-GPB5 chez le lapin et la poule. Les capacités potentiels de ces anticorps ont été testé sur les fractions purifiées et ils s'avèrent être spécifiques dans les conditions réduites et non réduites.

L'obtention de ces anticorps constitue un outil très important pour la recherche des protéines naturelles qui depuis 2002 n'ont jamais été mise en évidence. Le problème majeur est qu'il faut déterminer à quel moment il faut faire les prélèvements d'organes surtout pour avoir tous les stades de développement, pour un modèle bovin ce n'est pas du tout facile. Bien que ces anticorps puissent aussi être utilisés dans des tests immunohistochimiques sur des coupes de tissus ou sur des embryons *in toto*, dans des immunoblotting ou même d'immunoprécipitation, la formation de colonne d'affinité pour la recherche de partenaires protéiques, ces anticorps sont particulièrement utiles pour mettre au point un dosage Elisa, qui sera réalisé pour la première fois pour ces protéines à l'état natif.

La production de la GPA2 recombinante constitue donc une étape très importante dans l'étude de la structure de GPA2/GPB5 et étudié leur interaction si elle existe. Une fois que les deux protéines seront obtenues en quantité suffisante, l'étude de leur activité PDI pourra aussi être envisagée.

Durant cette thèse, la PEBP testiculaire bovine a été purifiée avec des étapes moins lourdes que celles qui ont été utilisées il y a quelques années. La PEBP, purifiée en quantité suffisante a permis d'entamer des études sur sa structure et la production des anticorps spécifiques chez le lapin. L'obtention des anticorps spécifiques contre la protéine purifiée a permis d'élaborer pour la première fois un dosage Elisa fiable contre la protéine native.

Le mécanisme biologique d'action de la PEBP reste à élucider, mais il a été initié par des recherches d'expression de la PEBP au niveau de certains tissus par des tests immunohistochimiques pour voir dans quel type cellulaire, cette protéine est exprimée. Les résultats d'immunohistochimie montrent que la PEBP est présente dans les testicules bovins en grande quantité et à des stades spécifiques. Turner et ses collaborateurs ont décrits un rôle de la PEBP dans la spermatogenèse chez le rat, bien qu'ils n'aient pas développé une technique sensible à la détection de la PEBP, mais ils ont suggéré qu'une technique capable de mesurer la PEBP dans le sang pourrait être un moyen efficace pour monitorer la spermatogenèse d'une façon invasive, surtout qu'ils ont montré que ce sont les cellules germinales qui sont productrices de telle protéine (Turner et al., 1996). La PEBP-2 spécifique du testicule chez la souris, est aussi stade spécifique et apparaît pendant la phase tardive de méiose suggérant un rôle dans la maturation du sperme post-testiculaire (Hickox et al., 2002). Un autre rôle probable est d'être un inhibiteur de protéines à serines comme son rôle montré par Hengst et ses collaborateurs au niveau du cerveau (Hengst et al., 2001). La présence des composants de la voie de signalisation MAP-Kinase au niveau testiculaire surtout au niveau des cellules haploïdes germinales (Berruti, 2000, Saunders et al., 1995, Wadewitz et al., 1993), suggère aussi un rôle de la PEBP, pas seulement dans l'inhibition de Raf-1 (activité RKIP) mais aussi dans la régulation de sa phosphorylation. A plus long terme, l'objectif sera de continuer la caractérisation biologique, physicochimique et structurale de cette PEBP bovine testiculaire.

Nous envisageons ainsi une re-analyse de cette protéine par une spectrométrie de masse plus sophistiquée pour une meilleure résolution et surtout aussi pour comprendre la nature du doublet ($\Delta = 212-218$) que l'on voit sur les gels, et qui ne disparaît pas en chauffant la protéine à 100°C mais qui disparaît par réduction même à température ambiante. Ceci suggère l'implication d'un pont S-S ou d'une liaison S-O dans la formation de cet adduit inconnu d'environ 215 Da de poids moléculaire. Il est certain que l'identification de cet adduit

serait d'un aide précieuse pour la compréhension de la distribution et/ou les fonctions de la PEBP. Concernant la distribution, il faut se souvenir que la séquence de la PEBP ne comporte pas de peptide signal. Or, malgré tout, la PEBP est trouvée à la membrane et même secrétée en plus de sa localisation cytoplasmique attendue. L'adduit pourrait-il être responsable de ces localisations atypiques ? Ceci serait intéressant à étudier.

Pour ma part, je serais particulièrement intéressée à étudier les PEBP chez les plantes ; d'une part parce que l'enseignement universitaire au Liban manque de spécialistes dans le domaine végétal et d'autre part, parce que les PEBP interagissent directement avec des facteurs de transcription chez les plantes et contrôlent les voies de signalisation conduisant à la floraison. Ces aspects me paraissent très intéressants et je souhaiterais me former aux études chez les plantes au cours de mon ou mes post-docs à venir.

Bibliographie

Bibliographie

- ADEOYA-OSIGUWA, S. A. & FRASER, L. R. (1996) Evidence for Ca²⁺-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. *Mol Reprod Dev*, 44, 111-20.
- AGHAJANOVA, L., LINDEBERG, M., CARLSSON, I. B., STAVREUS-EVERS, A., ZHANG, P., SCOTT, J. E., HOVATTA, O. & SKJOLDEBRAND-SPARRE, L. (2009) Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, 18, 337-47.
- AHN, J. H., MILLER, D., WINTER, V. J., BANFIELD, M. J., LEE, J. H., YOO, S. Y., HENZ, S. R., BRADY, R. L. & WEIGEL, D. (2006) A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J*, 25, 605-14.
- ALVAREZ, E., CAHOREAU, C. & COMBARNOUS, Y. (2009) Comparative structure analyses of cystine knot-containing molecules with eight aminoacyl ring including glycoprotein hormones (GPH) alpha and beta subunits and GPH-related A2 (GPA2) and B5 (GPB5) molecules. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 90.
- AMAYA, I., RATCLIFFE, O. J. & BRADLEY, D. J. (1999) Expression of CENTRORADIALIS (CEN) and CEN-like genes in tobacco reveals a conserved mechanism controlling phase change in diverse species. *Plant Cell*, 11, 1405-18.
- APPARAILLY, F. & COMBARNOUS, Y. (1994) Role of sialic acid residues in the in vitro superactivity of human choriogonadotropin (hCG) in rat Leydig cells. *Biochim Biophys Acta*, 1224, 559-65.
- ARAKAKI, T., NEELY, H., BONI, E., MUELLER, N., BUCKNER, F. S., VAN VOORHIS, W. C., LAURICELLA, A., DETITTA, G., LUFT, J., HOL, W. G. & MERRITT, E. A. (2007) The structure of Plasmodium vivax phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a functional motif containing a left-handed helix. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 63, 178-82.
- ARNOULT, C., KAZAM, I. G., VISCONTI, P. E., KOPF, G. S., VILLAZ, M. & FLORMAN, H. M. (1999) Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6757-62.
- ASQUITH, K. L., BALEATO, R. M., MCLAUGHLIN, E. A., NIXON, B. & AITKEN, R. J. (2004) Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci*, 117, 3645-57.
- ATMANENE, C., LAUX, A., GLATTARD, E., MULLER, A., SCHOENTGEN, F., METZ-BOUTIGUE, M. H., AUNIS, D., VAN DORSSELAER, A., STEFANO, G. B., SANGLIER-CIANFERANI, S. & GOUMON, Y. (2009) Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med Sci Monit*, 15, BR178-87.
- BANFIELD, M. J., BARKER, J. J., PERRY, A. C. & BRADY, R. L. (1998) Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure*, 6, 1245-54.
- BANFIELD, M. J. & BRADY, R. L. (2000) The structure of Antirrhinum centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. *J Mol Biol*, 297, 1159-70.
- BARITAKI, S., KATSMAN, A., CHATTERJEE, D., YEUNG, K. C., SPANDIDOS, D. A. & BONAVIDA, B. (2007) Regulation of tumor cell sensitivity to TRAIL-induced apoptosis by the metastatic suppressor Raf kinase inhibitor protein via Yin Yang 1 inhibition and death receptor 5 up-regulation. *J Immunol*, 179, 5441-53.

- BATES, R. W. & CONDLIFFE, P. G. (1956) Chromatography of thyroid-stimulating hormone on carboxymethylcellulose. *J Biol Chem*, 223, 843-52.
- BELGHAZI, M., KLETT, D., CAHOREAU, C. & COMBARNOUS, Y. (2006) Nitro-thiocyanobenzoic acid (NTCB) reactivity of cysteines beta100 and beta110 in porcine luteinizing hormone: metastability and hypothetical isomerization of the two disulfide bridges of its beta-subunit seatbelt. *Mol Cell Endocrinol*, 247, 175-82.
- BERNIER, I. & JOLLES, P. (1984) Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain. *Biochim Biophys Acta*, 790, 174-81.
- BERRUTI, G. (2000) A novel rap1/B-Raf/14-3-3 theta protein complex is formed in vivo during the morphogenetic differentiation of postmeiotic male germ cells. *Exp Cell Res*, 257, 172-9.
- BILEZIKJIAN, L. M., BLOUNT, A. L., LEAL, A. M., DONALDSON, C. J., FISCHER, W. H. & VALE, W. W. (2004) Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol*, 225, 29-36.
- BONIFACE, J. J. & REICHERT, L. E., JR. (1990) Evidence for a novel thioredoxin-like catalytic property of gonadotropic hormones. *Science*, 247, 61-4.
- BOOTHBY, M., RUDDON, R. W., ANDERSON, C., MCWILLIAMS, D. & BOIME, I. (1981) A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J Biol Chem*, 256, 5121-7.
- BRADLEY, D., VINCENT, C., CARPENTER, R. & COEN, E. (1996) Pathways for inflorescence and floral induction in *Antirrhinum*. *Development*, 122, 1535-44.
- BRUUN, A. W., SVENDSEN, I., SORENSEN, S. O., KIELLAND-BRANDT, M. C. & WINTHER, J. R. (1998) A high-affinity inhibitor of yeast carboxypeptidase Y is encoded by TFS1 and shows homology to a family of lipid binding proteins. *Biochemistry*, 37, 3351-7.
- BUCQUOY, S., JOLLES, P. & SCHOENTGEN, F. (1994) Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur J Biochem*, 225, 1203-10.
- CHATTERJEE, D., BAI, Y., WANG, Z., BEACH, S., MOTT, S., ROY, R., BRAASTAD, C., SUN, Y., MUKHOPADHYAY, A., AGGARWAL, B. B., DARNOWSKI, J., PANTAZIS, P., WYCHE, J., FU, Z., KITAGWA, Y., KELLER, E. T., SEDIVY, J. M. & YEUNG, K. C. (2004) RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 17515-23.
- CHAUTARD, H., JACQUET, M., SCHOENTGEN, F., BUREAUD, N. & BENEDETTI, H. (2004) Tfs1p, a member of the PEBP family, inhibits the Ira2p but not the Ira1p Ras GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 3, 459-70.
- CHEW, C. C., MAGALLON, T., MARTINAT, N., LECOMPTE, F., COMBARNOUS, Y. & GOSLING, J. P. (1995) The relative protein disulphide isomerase (PDI) activities of gonadotrophins, thioredoxin and PDI. *Biochem Soc Trans*, 23, 394S.
- CLARK, S. & HARRISON, L. C. (1985) Structure of covalent insulin-receptor complexes (I-S-S-R) in isolated rat adipocytes and human placental membranes. *Biochem J*, 229, 513-9.
- COMBARNOUS, Y. (1992) Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr Rev*, 13, 670-91.
- DI COSMO, A. & DI CRISTO, C. (1998) Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *J Comp Neurol*, 398, 1-12.
- DOCHERTY, K. & STEINER, D. F. (1982) Post-translational proteolysis in polypeptide hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol*, 44, 625-38.

- DOS SANTOS, S., BARDET, C., BERTRAND, S., ESCRIVA, H., HABERT, D. & QUERAT, B. (2009) Distinct expression patterns of glycoprotein hormone- α 2 and - β 5 in a basal chordate suggest independent developmental functions. *Endocrinology*, 150, 3815-22.
- ELION, E. A. (1998) Routing MAP kinase cascades. *Science*, 281, 1625-6.
- ERTTMANN, K. D. & GALLIN, M. Y. (1996) *Onchocerca volvulus*: identification of cDNAs encoding a putative phosphatidyl-ethanolamine-binding protein and a putative partially processed mRNA precursor. *Gene*, 174, 203-7.
- EVES, E. M., SHAPIRO, P., NAIK, K., KLEIN, U. R., TRAKUL, N. & ROSNER, M. R. (2006) Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Mol Cell*, 23, 561-74.
- FEVOLD, H. L., HISAW, F. L. & LEONARD, S. L. (1931) THE GONAD STIMULATING AND THE LUTEINIZING HORMONES OF THE ANTERIOR LOBE OF THE HYPOPHEYSIS. *American Journal of Physiology -- Legacy Content*, 97, 291-301.
- FIDDES, J. C. & GOODMAN, H. M. (1979) Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 281, 351-6.
- FOUCHER, F., MORIN, J., COURTIADÉ, J., CADILOUX, S., ELLIS, N., BANFIELD, M. J. & RAMEAU, C. (2003) DETERMINATE and LATE FLOWERING are two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *Plant Cell*, 15, 2742-54.
- FOX, K. M., DIAS, J. A. & VAN ROEY, P. (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol*, 15, 378-89.
- FRASER, L. R. (1984) Mouse sperm capacitation in vitro involves loss of a surface-associated inhibitory component. *J Reprod Fertil*, 72, 373-84.
- FRASER, L. R. (1998) Interactions between a decapacitation factor and mouse spermatozoa appear to involve fucose residues and a GPI-anchored receptor. *Mol Reprod Dev*, 51, 193-202.
- FU, Z., KITAGAWA, Y., SHEN, R., SHAH, R., MEHRA, R., RHODES, D., KELLER, P. J., MIZOKAMI, A., DUNN, R., CHINNAIYAN, A. M., YAO, Z. & KELLER, E. T. (2006) Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate*, 66, 248-56.
- FU, Z., SMITH, P. C., ZHANG, L., RUBIN, M. A., DUNN, R. L., YAO, Z. & KELLER, E. T. (2003) Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 95, 878-89.
- GEMS, D., FERGUSON, C. J., ROBERTSON, B. D., NIEVES, R., PAGE, A. P., BLAXTER, M. L. & MAIZELS, R. M. (1995) An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *J Biol Chem*, 270, 18517-22.
- GHARIB, S. D., WIERMAN, M. E., SHUPNIK, M. A. & CHIN, W. W. (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev*, 11, 177-99.
- GIBBONS, R., ADEOYA-OSIGUWA, S. A. & FRASER, L. R. (2005) A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine-binding protein 1. *Reproduction*, 130, 497-508.
- GOUMON, Y., ANGELONE, T., SCHOENTGEN, F., CHASSEROT-GOLAZ, S., ALMAS, B., FUKAMI, M. M., LANGLEY, K., WELTERS, I. D., TOTA, B., AUNIS, D. & METZ-BOUTIGUE, M. H. (2004) The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J Biol Chem*, 279, 13054-64.

- GRANOVSKY, A. E., CLARK, M. C., MCELHENY, D., HEIL, G., HONG, J., LIU, X., KIM, Y., JOACHIMIAK, G., JOACHIMIAK, A., KOIDE, S. & ROSNER, M. R. (2009) Raf kinase inhibitory protein function is regulated via a flexible pocket and novel phosphorylation-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, 29, 1306-20.
- GRASSO, P., SANTA-COLOMA, T. A., BONIFACE, J. J. & REICHERT, L. E., JR. (1991) A synthetic peptide corresponding to hFSH-beta-(81-95) has thioredoxin-like activity. *Mol Cell Endocrinol*, 78, 163-70.
- GREEP, R. (1934) Separation of a thyrotrophin from the gonadotropic substances of the pituitary. *Am. J. Physiol.* , 692-699.
- HAGAN, S., AL-MULLA, F., MALLON, E., OIEN, K., FERRIER, R., GUSTERSON, B., GARCIA, J. J. & KOLCH, W. (2005) Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, 11, 7392-7.
- HAHM, J. R., AHN, J. S., NOH, H. S., BAEK, S. M., HA, J. H., JUNG, T. S., AN, Y. J., KIM, D. K. & KIM, D. R. (2010) Comparative analysis of fat and muscle proteins in fenofibrate-fed type II diabetic OLETF rats: the fenofibrate-dependent expression of PEBP or C11orf59 protein. *BMB Rep*, 43, 337-43.
- HAUSER, F., NEUPERT, S., WILLIAMSON, M., PREDEL, R., TANAKA, Y. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. (2010) Genomics and peptidomics of neuropeptides and protein hormones present in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *J Proteome Res*, 9, 5296-310.
- HAYAMA, R., YOKOI, S., TAMAKI, S., YANO, M. & SHIMAMOTO, K. (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*, 422, 719-22.
- HENGST, U., ALBRECHT, H., HESS, D. & MONARD, D. (2001) The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem*, 276, 535-40.
- HICKOX, D. M., GIBBS, G., MORRISON, J. R., SEBIRE, K., EDGAR, K., KEAH, H. H., ALTER, K., LOVELAND, K. L., HEARN, M. T., DE KRETZER, D. M. & O'BRYAN, M. K. (2002) Identification of a novel testis-specific member of the phosphatidylethanolamine binding protein family, *pebp-2*. *Biol Reprod*, 67, 917-27.
- HOLLAND, L. Z., ALBALAT, R., AZUMI, K., BENITO-GUTIERREZ, E., BLOW, M. J., BRONNER-FRASER, M., BRUNET, F., BUTTS, T., CANDIANI, S., DISHAW, L. J., FERRIER, D. E., GARCIA-FERNANDEZ, J., GIBSON-BROWN, J. J., GISSI, C., GODZIK, A., HALLBOOK, F., HIROSE, D., HOSOMICHI, K., IKUTA, T., INOKO, H., KASAHARA, M., KASAMATSU, J., KAWASHIMA, T., KIMURA, A., KOBAYASHI, M., KOZMIK, Z., KUBOKAWA, K., LAUDET, V., LITMAN, G. W., MCHARDY, A. C., MEULEMANS, D., NONAKA, M., OLINSKI, R. P., PANCER, Z., PENNACCHIO, L. A., PESTARINO, M., RAST, J. P., RIGOUTSOS, I., ROBINSON-RECHAVI, M., ROCH, G., SAIGA, H., SASAKURA, Y., SATAKE, M., SATOU, Y., SCHUBERT, M., SHERWOOD, N., SHIINA, T., TAKATORI, N., TELLO, J., VOPALENSKY, P., WADA, S., XU, A., YE, Y., YOSHIDA, K., YOSHIZAKI, F., YU, J. K., ZHANG, Q., ZMASEK, C. M., DE JONG, P. J., OSOEGAWA, K., PUTNAM, N. H., ROKHSAR, D. S., SATOH, N. & HOLLAND, P. W. (2008) The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res*, 18, 1100-11.
- HOUBEN, R., MICHEL, B., VETTER-KAUCZOK, C. S., PFOHLER, C., LAETSCH, B., WOLTER, M. D., LEONARD, J. H., TREFZER, U., UGUREL, S., SCHRAMA, D. & BECKER, J. C. (2006) Absence of classical MAP kinase pathway signalling in Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol*, 126, 1135-42.

- HSU, S. Y., NAKABAYASHI, K. & BHALLA, A. (2002) Evolution of glycoprotein hormone subunit genes in bilateral metazoa: identification of two novel human glycoprotein hormone subunit family genes, GPA2 and GPB5. *Mol Endocrinol*, 16, 1538-51.
- HUHN, D., VON SCHILLING, C., WILHELM, M., HO, A. D., HALLEK, M., KUSE, R., KNAUF, W., RIEDEL, U., HINKE, A., SROCK, S., SERKE, S., PESCHEL, C. & EMMERICH, B. (2001) Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 98, 1326-31.
- IKEKUBO, K., HINO, M., SAIKI, Y., SON, C., IWAKURA, T., KOBAYASHI, H. & ISHIHARA, T. (2005) Immeasurably low and non-TRH-stimulatable TSH associated with normal I-123 uptake in two goitrous euthyroid patients: possible existence of other thyroid-hormone regulated thyroid stimulators other than TSH. *Endocr J*, 52, 61-8.
- JAZIREHI, A. R., VEGA, M. I., CHATTERJEE, D., GOODGLICK, L. & BONAVIDA, B. (2004) Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res*, 64, 7117-26.
- KLYSIK, J., THEROUX, S. J., SEDIVY, J. M., MOFFIT, J. S. & BOEKELHEIDE, K. (2008) Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. *Cell Signal*, 20, 1-9.
- LAPTHORN, A. J., HARRIS, D. C., LITTLEJOHN, A., LUSTBADER, J. W., CANFIELD, R. E., MACHIN, K. J., MORGAN, F. J. & ISAACS, N. W. (1994) Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 369, 455-61.
- LEE, H. C., TIAN, B., SEDIVY, J. M., WANDS, J. R. & KIM, M. (2006) Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology*, 131, 1208-17.
- LI, C., HIROOKA, Y., HABU, S., TAKAGI, J., GOTOH, M. & NOGIMORI, T. (2004) Distribution of thyrostimulin in the rat: an immunohistochemical study. *Endocr Regul*, 38, 131-42.
- MACDONALD, L. E., WORTLEY, K. E., GOWEN, L. C., ANDERSON, K. D., MURRAY, J. D., POUYMIROU, W. T., SIMMONS, M. V., BARBER, D., VALENZUELA, D. M., ECONOMIDES, A. N., WIEGAND, S. J., YANCOPOULOS, G. D., SLEEMAN, M. W. & MURPHY, A. J. (2005) Resistance to diet-induced obesity in mice globally overexpressing OGH/GPB5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2496-501.
- MAKI, M., MATSUKAWA, N., YUASA, H., OTSUKA, Y., YAMAMOTO, T., AKATSU, H., OKAMOTO, T., UEDA, R. & OJIKI, K. (2002) Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61, 176-85.
- MIMA, J., HAYASHIDA, M., FUJII, T., NARITA, Y., HAYASHI, R., UEDA, M. & HATA, Y. (2005) Structure of the carboxypeptidase Y inhibitor IC in complex with the cognate proteinase reveals a novel mode of the proteinase-protein inhibitor interaction. *J Mol Biol*, 346, 1323-34.
- MINOO, P., ZLOBEC, I., BAKER, K., TORNILLO, L., TERRACCIANO, L., JASS, J. R. & LUGLI, A. (2007) Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*, 127, 820-7.
- MOFFIT, J. S., BOEKELHEIDE, K., SEDIVY, J. M. & KLYSIK, J. (2007) Mice lacking Raf kinase inhibitor protein-1 (RKIP-1) have altered sperm capacitation and reduced reproduction rates with a normal response to testicular injury. *J Androl*, 28, 883-90.

- MOODIE, S. A., WILLUMSEN, B. M., WEBER, M. J. & WOLFMAN, A. (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*, 260, 1658-61.
- NAGASAKI, H., WANG, Z., JACKSON, V. R., LIN, S., NOTHACKER, H. P. & CIVELLI, O. (2006) Differential expression of the thyrostimulin subunits, glycoprotein alpha2 and beta5 in the rat pituitary. *J Mol Endocrinol*, 37, 39-50.
- NAKABAYASHI, K., MATSUMI, H., BHALLA, A., BAE, J., MOSSELMAN, S., HSU, S. Y. & HSUEH, A. J. (2002) Thyrostimulin, a heterodimer of two new human glycoprotein hormone subunits, activates the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Clin Invest*, 109, 1445-52.
- NAKAGAWA, M., SHIMAMOTO, K. & KYOZUKA, J. (2002) Overexpression of RCN1 and RCN2, rice TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS homologs, confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice. *Plant J*, 29, 743-50.
- NIXON, B., MACINTYRE, D. A., MITCHELL, L. A., GIBBS, G. M., O'BRYAN, M. & AITKEN, R. J. (2006) The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biol Reprod*, 74, 275-87.
- OISHI, A., GENGYO-ANDO, K., MITANI, S., MOHRI-SHIOMI, A., KIMURA, K. D., ISHIHARA, T. & KATSURA, I. (2009) FLR-2, the glycoprotein hormone alpha subunit, is involved in the neural control of intestinal functions in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*, 14, 1141-54.
- OJIKI, K. & APPEL, S. H. (1984) Neurotrophic effects of hippocampal extracts on medial septal nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 2567-71.
- OJIKI, K., KATADA, E., TOHDOH, N., MITAKE, S., OTSUKA, Y., MATSUKAWA, N. & TSUGU, Y. (1995) Demonstration of deacetylated hippocampal cholinergic neurostimulating peptide and its precursor protein in rat tissues. *Brain Res*, 701, 19-27.
- OJIKI, K., KOJIMA, S., UEKI, Y., FUKUSHIMA, N., HAYASHI, K. & YAMAMOTO, M. (1992) Purification and structural analysis of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide. *Brain Res*, 572, 164-71.
- OJIKI, K., UEKI, Y., MITAKE, S., TSUGU, Y., OTSUKA, Y. & KATADA, E. (1996) Demonstration of the biological activity of peptide fragments related to human and rat hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP). *Neurosci Lett*, 215, 127-30.
- OKADA, S. L., ELLSWORTH, J. L., DURNAM, D. M., HAUGEN, H. S., HOLLOWAY, J. L., KELLEY, M. L., LEWIS, K. E., REN, H., SHEPPARD, P. O., STOREY, H. M., WAGGIE, K. S., WOLF, A. C., YAO, L. Y. & WEBSTER, P. J. (2006) A glycoprotein hormone expressed in corticotrophs exhibits unique binding properties on thyroid-stimulating hormone receptor. *Mol Endocrinol*, 20, 414-25.
- PALMIERI, G., LANGELLA, E., GOGLIETTINO, M., SAVIANO, M., POCSSFALVI, G. & ROSSI, M. (2010) A novel class of protease targets of phosphatidylethanolamine-binding proteins (PEBP): a study of the acylpeptide hydrolase and the PEBP inhibitor from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Biosyst*, 6, 2498-507.
- PANTAZIS, P., HAN, Z., BALAN, K., WANG, Y. & WYCHE, J. H. (2003) Camptothecin and 9-nitrocamptothecin (9NC) as anti-cancer, anti-HIV and cell-differentiation agents. Development of resistance, enhancement of 9NC-induced activities and combination treatments in cell and animal models. *Anticancer Res*, 23, 3623-38.
- PARK, S., RATH, O., BEACH, S., XIANG, X., KELLY, S. M., LUO, Z., KOLCH, W. & YEUNG, K. C. (2006) Regulation of RKIP binding to the N-region of the Raf-1 kinase. *FEBS Lett*, 580, 6405-12.

- PARK, S., YEUNG, M. L., BEACH, S., SHIELDS, J. M. & YEUNG, K. C. (2005) RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells. *Oncogene*, 24, 3535-40.
- PETERSON, D. A., KELLY, B., MEHTA, N. & GERRARD, J. M. (1988) Prostaglandins as reducing agents: A model of adenylate cyclase activation? *Prostaglandins*, 36, 667-671.
- PIERCE, J. G. & PARSONS, T. F. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 50, 465-95.
- PIKIELNY, C. W., HASAN, G., ROUYER, F. & ROSBASH, M. (1994) Members of a family of Drosophila putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12, 35-49.
- PNUELI, L., CARMEL-GOREN, L., HAREVEN, D., GUTFINGER, T., ALVAREZ, J., GANAL, M., ZAMIR, D. & LIFSCHITZ, E. (1998) The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development*, 125, 1979-89.
- RATH, O., PARK, S., TANG, H. H., BANFIELD, M. J., BRADY, R. L., LEE, Y. C., DIGNAM, J. D., SEDIVY, J. M., KOLCH, W. & YEUNG, K. C. (2008) The RKIP (Raf-1 Kinase Inhibitor Protein) conserved pocket binds to the phosphorylated N-region of Raf-1 and inhibits the Raf-1-mediated activated phosphorylation of MEK. *Cell Signal*, 20, 935-41.
- RAUTUREAU, G., JOUVENSAL, L., VOVELLE, F., SCHOENTGEN, F., LOCKER, D. & DECOVILLE, M. (2009) Expression and characterization of the PEBP homolog genes from Drosophila. *Arch Insect Biochem Physiol*, 71, 55-69.
- ROBINSON, L. C. & TATCHELL, K. (1991) TFS1: a suppressor of cdc25 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 230, 241-50.
- ROUSSEL, G., NUSSBAUM, F., SCHOENTGEN, F., JOLLES, P. & NUSSBAUM, J. L. (1988) Immunological investigation of a 21-kilodalton cytosolic basic protein in rat brain. *Dev Neurosci*, 10, 65-74.
- SAUNDERS, P. T., MCKINNELL, C., MILLAR, M. R., GAUGHAN, J., TURNER, K. J., JEGOU, B., SYED, V. & SHARPE, R. M. (1995) Phosphatidylethanolamine binding protein is an abundant secretory product of haploid testicular germ cells in the rat. *Mol Cell Endocrinol*, 107, 221-30.
- SCHUIERER, M. M., BATAILLE, F., WEISS, T. S., HELLERBRAND, C. & BOSSERHOFF, A. K. (2006) Raf kinase inhibitor protein is downregulated in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 16, 451-6.
- SCULLY, K. M. & ROSENFELD, M. G. (2002) Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science*, 295, 2231-5.
- SERRE, L., PEREIRA DE JESUS, K., ZELWER, C., BUREAUD, N., SCHOENTGEN, F. & BENEDETTI, H. (2001) Crystal structures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein. *J Mol Biol*, 310, 617-34.
- SERRE, L., VALLEE, B., BUREAUD, N., SCHOENTGEN, F. & ZELWER, C. (1998) Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: a novel structural class of phospholipid-binding proteins. *Structure*, 6, 1255-65.
- SHAULIAN, E. & KARIN, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4, E131-6.
- SHEMON, A. N., EVES, E. M., CLARK, M. C., HEIL, G., GRANOVSKY, A., ZENG, L., IMAMOTO, A., KOIDE, S. & ROSNER, M. R. (2009) Raf Kinase Inhibitory Protein protects cells against locostatin-mediated inhibition of migration. *PLoS One*, 4, e6028.

- SIMISTER, P. C., BANFIELD, M. J. & BRADY, R. L. (2002) The crystal structure of PEBP-2, a homologue of the PEBP/RKIP family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58, 1077-80.
- SOLOMON, G. S., PETRIE, W. M., HART, J. R. & BRACKIN, H. B., JR. (1998) Olfactory dysfunction discriminates Alzheimer's dementia from major depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 10, 64-7.
- SOWER, S. A., FREMAT, M. & KAVANAUGH, S. I. (2009) The origins of the vertebrate hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) endocrine systems: new insights from lampreys. *Gen Comp Endocrinol*, 161, 20-9.
- SUDO, S., KUWABARA, Y., PARK, J. I., HSU, S. Y. & HSUEH, A. J. (2005) Heterodimeric fly glycoprotein hormone- α 2 (GPA2) and glycoprotein hormone- β 5 (GPB5) activate fly leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-1 (DLGR1) and stimulation of human thyrotropin receptors by chimeric fly GPA2 and human GPB5. *Endocrinology*, 146, 3596-604.
- SUN, S. C., HSU, P. J., WU, F. J., LI, S. H., LU, C. H. & LUO, C. W. (2009) Thyrostimulin, but not thyroid-stimulating hormone (TSH), acts as a paracrine regulator to activate the TSH receptor in mammalian ovary. *J Biol Chem*, 285, 3758-65.
- SUZUKI, C., NAGASAKI, H., OKAJIMA, Y., SUGA, H., OZAKI, N., ARIMA, H., IWASAKI, Y. & OISO, Y. (2009) Inflammatory cytokines regulate glycoprotein subunit β 5 of thyrostimulin through nuclear factor- κ B. *Endocrinology*, 150, 2237-43.
- TANDO, Y. & KUBOKAWA, K. (2009a) Expression of the gene for ancestral glycoprotein hormone β subunit in the nerve cord of amphioxus. *Gen Comp Endocrinol*, 162, 329-39.
- TANDO, Y. & KUBOKAWA, K. (2009b) A homolog of the vertebrate thyrostimulin glycoprotein hormone α subunit (GPA2) is expressed in Amphioxus neurons. *Zool Sci*, 26, 409-14.
- THEROUX, S., PEREIRA, M., CASTEN, K. S., BURWELL, R. D., YEUNG, K. C., SEDIVY, J. M. & KLYSIK, J. (2007) Raf kinase inhibitory protein knockout mice: expression in the brain and olfaction deficit. *Brain Res Bull*, 71, 559-67.
- TROTTEIN, F. & COWMAN, A. F. (1995) The primary structure of a putative phosphatidylethanolamine-binding protein from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 70, 235-9.
- TSUTSUI, K., SAIGOH, E., UKENA, K., TERANISHI, H., FUJISAWA, Y., KIKUCHI, M., ISHII, S. & SHARP, P. J. (2000) A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun*, 275, 661-7.
- TURNER, K. J., MCKINNELL, C., MCLAREN, T. T., QURESHI, S. J., SAUNDERS, P. T., FOSTER, P. M. & SHARPE, R. M. (1996) Detection of germ cell-derived proteins in testicular interstitial fluid: potential for monitoring spermatogenesis in vivo. *J Androl*, 17, 127-36.
- VAN ZEIJL, C. J., SUROVTSEVA, O. V., WIERSINGA, W. M., BOELEN, A. & FLIERS, E. (2010) Transient hypothyroxinemia in juvenile glycoprotein hormone subunit B5 knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol*, 321, 231-8.
- VAN ZEIJL, C. J., SUROVTSEVA, O. V., WIERSINGA, W. M., FLIERS, E. & BOELEN, A. (2011) Acute inflammation increases pituitary and hypothalamic glycoprotein hormone subunit B5 mRNA expression in association with decreased thyrotrophin receptor mRNA expression in mice. *J Neuroendocrinol*, 23, 310-9.
- VIERECK, J. C. & BEINFELD, M. C. (1992) Characterization of a cholecystokinin 8-generating endoprotease purified from rat brain synaptosomes. *J Biol Chem*, 267, 19475-81.

- WADEWITZ, A. G., WINER, M. A. & WOLGEMUTH, D. J. (1993) Developmental and cell lineage specificity of raf family gene expression in mouse testis. *Oncogene*, 8, 1055-62.
- WIGGE, P. A. (2011) FT, a mobile developmental signal in plants. *Curr Biol*, 21, R374-8.
- WU, H., LUSTBADER, J. W., LIU, Y., CANFIELD, R. E. & HENDRICKSON, W. A. (1994) Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Structure*, 2, 545-58.
- YAMADA, K. & DONNER, D. B. (1985) Evidence that non-covalent forces, thiol and disulphide groups affect the structure and binding properties of the prolactin receptor on hepatocytes from pregnant rats. *Biochem J*, 228, 383-90.
- YEUNG, K., JANOSCH, P., MCFERRAN, B., ROSE, D. W., MISCHAK, H., SEDIVY, J. M. & KOLCH, W. (2000) Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol*, 20, 3079-85.
- YEUNG, K., SEITZ, T., LI, S., JANOSCH, P., MCFERRAN, B., KAISER, C., FEE, F., KATSANAKIS, K. D., ROSE, D. W., MISCHAK, H., SEDIVY, J. M. & KOLCH, W. (1999) Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*, 401, 173-7.
- YEUNG, K. C., ROSE, D. W., DHILLON, A. S., YAROS, D., GUSTAFSSON, M., CHATTERJEE, D., MCFERRAN, B., WYCHE, J., KOLCH, W. & SEDIVY, J. M. (2001) Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, 21, 7207-17.
- YUASA, H., OJIKI, K., MITAKE, S., KATADA, E., MATSUKAWA, N., OTSUKA, Y., FUJIMORI, O. & HIRANO, A. (2001) Age-dependent changes in HCNP-related antigen expression in the human hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*, 127, 1-7.
- ZHANG, L., FU, Z., BINKLEY, C., GIORDANO, T., BURANT, C. F., LOGSDON, C. D. & SIMEONE, D. M. (2004) Raf kinase inhibitory protein inhibits beta-cell proliferation. *Surgery*, 136, 708-15.
- ZHU, S., MC HENRY, K. T., LANE, W. S. & FENTEANY, G. (2005) A chemical inhibitor reveals the role of Raf kinase inhibitor protein in cell migration. *Chem Biol*, 12, 981-91.



Maya HAJ HASSAN



Caractérisation de protéines bovines potentiellement impliquées dans la Reproduction : GPA2, GPB5, PDI, PEBP et ubiquitine

Résumé

Nous avons caractérisé cinq protéines bovines qui sont potentiellement impliquées dans la reproduction. Un travail de clonage a été initié qui permettra à terme de purifier les GPA2 et GPB5 recombinantes puis naturelles pour étudier leurs structures. GPA2 et GPB5 sont considérés comme les ancêtres moléculaires des sous-unités α et β des hormones glycoprotéiques. Nous avons montré la relative fragilité thermique de la structure quaternaire de la FSH bovine par rapport aux FSH ovine et humaine et nous avons étudié les propriétés enzymatiques de la PDI (Protein Disulfide Isomerase) en préalable à l'étude de l'activité PDI de GPA2/GPB5. Nous avons aussi purifié la phosphatidyl-ethanolamine-binding protein (PEBP) et l'ubiquitine testiculaires par chromatographie hydrophobe à très haute concentration de sulfate d'ammonium. A partir de la PEBP purifiée, on a produit des anticorps spécifiques chez le lapin qui nous ont permis d'être les premiers à développer un dosage ELISA fiable pour cette protéine.

Résumé en anglais

We characterized five bovine proteins that are potentially involved in reproduction. We started with the cloning of gpa2 and gpb5 cDNAs in order to eventually purify recombinant and natural GPA2 and GPB5 to study their possible quaternary structure. GPA2 and GPB5 are the evolutionary ancestors of Glycoprotein hormones α and β subunits respectively. Meanwhile, we have shown the relative quaternary structure fragility of bovine FSH compared to human and sheep FSH. We also studied the effect of endocrine disruptors on PDI (Protein Disulfide Isomerase) before addressing GPA2/GPB5 PDI activity of GPA2/GPB5 once purified. We succeeded to purify the phosphatidyl-ethanolamine-binding protein (PEBP) and ubiquitin from bovine testis by hydrophobic interaction chromatography at very high ammonium sulfate concentration and we produced specific antibodies (anti-PEBP) in rabbits that allowed us to be the first to develop a reliable Elisa assay for this protein.